



Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract and its main component (oleuropein) mitigate the development of morphine physical dependence in rats

Saeed Esmaeili-Mahani*, Leila Zare

Dept. of Biology, Faculty of Sciences, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 17 Jun 2012

Accepted: 25 Sept 2012

Abstract

Introduction: Recently, it has been demonstrated that olive leaf extract and its main component have calcium channel blocker, anti-inflammatory and anti-oxidative properties. However, the effects of olive leaf extract on opioid dependence have not yet been clarified.

Methods: To develop morphine dependence, morphine was injected twice daily for 7 days according to an escalating dose in rats. On day 7, the animals received naloxone (3 mg/kg, i.p.) 5 h after the last injection of morphine. Withdrawal signs (weight loss, abdominal contraction, diarrhea, teeth chattering, jumping, grooming and ptosis) were evaluated during 1h after naloxone. To determine the effect of OLE and oleuropein on the development of morphine dependence, OLE was given at doses of 200, 300 and 500 mg/kg and oleuropin with 10 mg/kg (i.p.) concomitant with morphine.

Results: Our results showed that rats chronically injected with morphine showed physical dependence. OLE (300 mg/kg) and oleuropin (10 mg/kg) could attenuate naloxone-induced withdrawal syndrome.

Conclusion: Our data revealed that olive leaf extract had a beneficial effect on chronic morphine-induced side effects such as physical dependence and can be useful in the period of drug withdrawal and its main component, oleuropein, is responsible for such observed effects.

Key words: Olive leaf extract, Oleuropein, Morphine, Withdrawal syndrome, Rats

* Corresponding author e-mail: semahani@yahoo.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

عصاره برگ زیتون (*Olea europaea*) و ترکیب اصلی آن (اولئوروپئین) بروز وابستگی فیزیکی به مرفین را در موش‌های صحرایی کاهش می‌دهد

سعید اسماعیلی ماهانی*، لیلا زارع

بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان

پذیرش: ۴ مهر ۹۱

دریافت: ۲۸ خرداد ۹۱

چکیده

مقدمه: اخیراً مشخص شده است که عصاره برگ زیتون و ترکیب اصلی آن دارای خواص بلوکه‌کنندگی کانال‌های کلسیم، ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. با این حال، اثرات عصاره برگ زیتون بر روی وابستگی اوپیوئیدی هنوز مشخص نشده است.

روش‌ها: برای القای وابستگی به مرفین در موش‌های صحرایی، مرفین به مدت یک هفته در دو نوبت بر طبق دوزهای افزایشی تزریق شد. در روز هفتم آزمایش ۵ ساعت بعد از آخرین تزریق مرفین حیوان‌ها نالوکسان (۳ میلی گرم بر کیلو گرم) دریافت کردند. علائم‌های سندرم ترک (کاهش وزن، دل پیچه، گرومینگ، اسهال، دندان قروچه، پرش و پتوزیس) به مدت یک ساعت بعد از تزریق نالوکسان ارزیابی گردید. برای تعیین اثر عصاره برگ زیتون و اولئوروپئین بر ایجاد وابستگی مرفینی، عصاره با دوزهای ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم و اولئوروپئین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم همراه با مرفین تجویز شد.

یافته‌ها: نتایج ما نشان داد که تزریق مزمن مرفین موجب بروز قابل ملاحظه علائم فیزیکی وابستگی به مرفین می‌شود و در مجموع عصاره با دوز ۳۰۰ و اولئوروپئین با دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلو گرم توانستند این علائم را کاهش دهند.

نتیجه‌گیری: مجموع نتایج این مطالعه حاکی از آن است که، عصاره برگ زیتون و اولئوروپئین یک اثر مفید در جلوگیری از بروز اثرات جانبی مصرف مزمن مرفین دارند و می‌توانند در کاهش علائم قطع دارو در زمان ترک کمک‌کننده باشند و اولئوروپئین می‌تواند مسئول چنین اثراتی باشد.

واژه‌های کلیدی: عصاره برگ زیتون، اولئوروپئین، مرفین، سندرم ترک، موش صحرایی

مقدمه

مغز ایجاد تغییراتی در بیان ژن‌ها نموده که ممکن است نوروترانسمیترها و ساختار نورون‌های هدف را تغییر دهد [۲۱].

در سال ۱۹۶۴ سازمان بهداشت جهانی با این نتیجه رسید که اصطلاح اعتیاد دیگر یک اصطلاح علمی نیست و اصطلاح وابستگی دارویی را به جای آن توصیه کرده‌اند. وابستگی به مجموعه‌ای از نشانه‌های فیزیولوژیک رفتاری و شناختی اطلاق می‌گردد که نشان دهنده تداوم مصرف داروهای شبه افیونی با وجود مشکلات ناشی از مصرف آنها است [۲۳]. به عبارت دیگر وابستگی استفاده مکرر از داروها برای حفظ تعادل فیزیولوژیکی پس از تجویز مزمن است و مدرک وجود آن ایجاد علائم ترک پس از تجویز قطع دارو می‌باشد [۱۵]. در حیوانات

داروهای اوپیوئیدی مانند مرفین برای درمان دردهای حاد و مزمن موثر می‌باشند، اما مصرف مداوم این داروها باعث ایجاد تحمل به اثرات ضد درد و وابستگی فیزیکی و روانی می‌گردد. همچنین استفاده مزمن از اوپیوئیدها می‌تواند موجب تغییرات طولانی مدت در فرایندهای مربوط به پاداش و در نتیجه اعتیاد شود. تشکیل این پلاستیسیته طولانی مدت در

semahani@yahoo.com

* نویسنده مسئول مکاتبات:

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

[۱۱]. علاوه بر این تحقیقات در زمینه اثرات محافظت نورونی عصاره برگ زیتون نشان می‌دهند که ترکیبات این عصاره در بیماری MS مفید می‌باشند [۲۵، ۲۸]. همچنین اثرات محافظت نورونی عصاره برگ زیتون در نوروپاتی دیابتی دیده شده است [۲۰]. در مطالعه قبلی ما مشخص شد که عصاره برگ زیتون از ایجاد تحمل به اثر ضددردی مرفین و از افزایش بیان کانال‌های کلسیمی القاء شده توسط مرفین مزمن جلوگیری می‌کند و مسئول این اثرات اولئوروپئین می‌باشد [۴۱]. با توجه به ماهیت و مکانیسم متفاوت ایجاد تحمل به اثر ضددردی و ایجاد وابستگی به اویپوئیدها در این مطالعه بر آن شدیم تا اثر عصاره برگ زیتون و همچنین ترکیب اصلی آن (اولئوروپئین) را بر روند بروز وابستگی فیزیکی به مرفین را مورد بررسی قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

جمع آوری برگ زیتون: برگ‌های زیتون (*Olea europaea* زیرگونه *Sevillano*) از باغچه‌های تحقیقاتی کشت شده در شهرستان خرم آباد استان لرستان (مرداد ماه ۱۳۸۸) جمع آوری شدند. برگ‌ها از سرشاخه‌های سالم و بدون آسیب دیدگی چیده شدند. عصاره اتانولی برگ زیتون در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی لرستان تهیه شد. ابتدا برگ‌های زیتون در هوا خشک شدند. ۲۰۰ گرم از برگ‌های خشک شده توسط آسیاب به ذرات پودری تبدیل شدند. پودر تهیه شده دو مرتبه به وسیله اتانول ۹۸٪ عصاره گیری شد؛ سپس الکل حاوی عصاره فیلتر شده و مایع فیلتر شده به وسیله دستگاه خشک کن (با کاهش فشار و استوانه چرخان) آبگیری شد. عصاره اتانولی باقی مانده به صورت خشک فریز شد. جهت استفاده در آزمایشات هر بار مقدار مورد نظر عصاره وزن و در سرم فیزیولوژیک حل شد. اندازه‌گیری ترکیبات تشکیل دهنده عصاره اتانولی با استفاده از روش کرماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی لرستان انجام شد. نتایج کرماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که اولئوروپئین (۳۵۶ mg/g)، تیروزول (۳/۷۳ mg/g)، هیدروکسی تیروزول (۴/۸۹ mg/g) و کافئیک اسید (۴۹/۴۱ mg/g) ترکیبات فنلی عمده تشکیل دهنده

آزمایشگاهی علامت‌های ترک شامل دل‌پیچه، پرش، افتادگی پلک، اسهال، کاهش وزن و دندان‌قروچه می‌باشد [۳۴]. گیرنده‌های اویپوئیدی جزء گیرنده‌های متصل به جی-پروتئین می‌باشند [۲۹]. مشترک‌ترین پیامد جفت شدن گیرنده‌های اویپوئیدی با جی-پروتئین‌ها عبارتست از مهار آدنیلیل سیکلاز، فعال شدن جریان پتاسیمی، مهار جریان کلسیمی و مهار رهایش ترانسمیترها [۲۷].

گزارشات زیادی نشان می‌دهد که تحمل و وابستگی مرفینی با تغییر در هم‌مستاز کلسیم ارتباط دارد آنقدر که سطح آزاد غلظت کلسیم داخل سلولی در مغز و نخاع افزایش می‌یابد [۳۹، ۳۱]. استفاده مزمن از مرفین، دانسته کانال‌های کلسیمی دی هیدروپیریدینی را افزایش می‌دهد همچنین آنتاگونیست-های کانال‌های کلسیم علامت‌های وابستگی فیزیکی را در حیوانات و انسان کاهش می‌دهد [۲، ۱۲، ۳۴]. التهاب نورونی و استرس اکسیداتیو همچنین کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی و بروز آپوپتوز نورونی بدنال مصرف مزمن اویپوئیدها از جمله مکانیسم‌های بروز تحمل و وابستگی اویپوئیدی بوده و مهار هر یک از موارد فوق نقش تعیین کننده ای در کاهش عوارض اویپوئیدی دارند [۱۸، ۱۹، ۳۰].

در سال‌های اخیر اثرات درمانی جالبی از گیاهان دارویی به دست آمده است. برگ زیتون یکی از انواع بسیار معمول این دست از داروهای گیاهی است که در میان ساکنان مناطق مدیترانه برای درمان برخی بیماری‌های خاص به کار برده می‌شود. جالب است اثرات درمانی برگ زیتون در زمینه‌های مختلف روز به روز برای دانشمندان بیشتر اثبات می‌شود. بیشترین ترکیب فنلی برگ زیتون اولئوروپئین است؛ پس از آن هیدروکسی-تیروزول، Flavone-7-glucoside، آپینگنین و ورباسکوزید به ترتیب بیشترین مقدار فنلی برگ زیتون می‌باشند. از میان ترکیبات ذکر شده هیدروکسی-تیروزول پیش ساز اولئوروپئین است همچنین ورباسکوزید از اتصال گلوکزید هیدروکسی-تیروزول و کافئیک اسید به وجود آمده است. در مطالعات گوناگونی اثرات آنتی اکسیدانی، هیپوگلاسمیک، ضد فشارخون، ضد آرتروز اسکروز، ضد التهاب، ضد میکروبی و ضد آپوپتوز برای برگ زیتون گزارش شده است [۹]. اخیراً نیز مشخص شده است که عصاره برگ زیتون نقش محافظتی در ایسکمی مغزی داشته [۲۶] و خاصیت ضد دردی نیز دارد

گروه‌های آزمایشی دریافت کننده عصاره برگ

زیتون: موش‌های صحرایی در گروه‌های ۶ تا ۸ تائی در نظر گرفته شد و به صورت زیر دسته‌بندی شدند:

۱- **گروه کنترل:** حیوان‌های سالم و بدون هیچ‌گونه درمان با عصاره برگ زیتون.

۲- **گروه دریافت کننده مرفین:** شامل موش‌های که به طور مزمن مرفین (i.p) دریافت کردند.

۳- **گروه شاهد عصاره:** شامل موش‌های که به طور مزمن مرفین (i.p) و به صورت خوراکی حلال عصاره (نرمال سالین) بر اساس mg/kg دریافت کردند.

۴- **گروه دریافت کننده عصاره:** شامل موش‌های که بطور مزمن مرفین (i.p) و به صورت خوراکی عصاره به ترتیب با دوزهای 200, 300, 500 mg/kg دریافت می‌کردند.

۵- **گروه‌های دریافت کننده اولئوروپین:** شامل موش‌های که بطور مزمن مرفین (i.p) و اولئوروپین را با دوز 10 mg/kg (i.p) دریافت می‌کردند.

آنالیز آماری: در مورد آنالیز علائم درجه بندی شده ترک ناشی از نالوکسان (کاهش وزن، میانگین تعداد دلپیچه‌ها، پرش‌ها و گرومینگ) از آزمون یک طرفه ANOVA و بدنبال آن آزمون Tukey و برای بررسی علائمی که از نظر وجود یا عدم وجود آنها بررسی می‌شوند (اسهال، افتادگی پلک و دندان قروچه) با آزمون نان پارامتریک χ^2 بر آورده می‌شوند. نتایج به صورت میانگین $\pm$ SEM ارائه می‌شوند و $P < 0.05$ به عنوان حداقل سطح معنی داری در نظر گرفته می‌شود.

یافته ها

– اثر عصاره بر علائم درجه بندی شده ترک

ناشی از نالوکسان

– اثر عصاره برگ زیتون بر روی کاهش وزن

ناشی از نالوکسان: در موش‌های که به طور مزمن فقط با مرفین درمان شده‌اند یک کاهش وزن کاملاً واضح در طی ۶۰ دقیقه بعد از تزریق نالوکسان در مقایسه با گروه کنترل که به طور مزمن سالین دریافت کرده‌اند مشاهده گردید ($P < 0.001$). اما موش‌های که همراه با مرفین عصاره دریافت کرده‌اند در مقایسه با گروه مرفین کاهش وزن ایجاد شده توسط نالوکسان

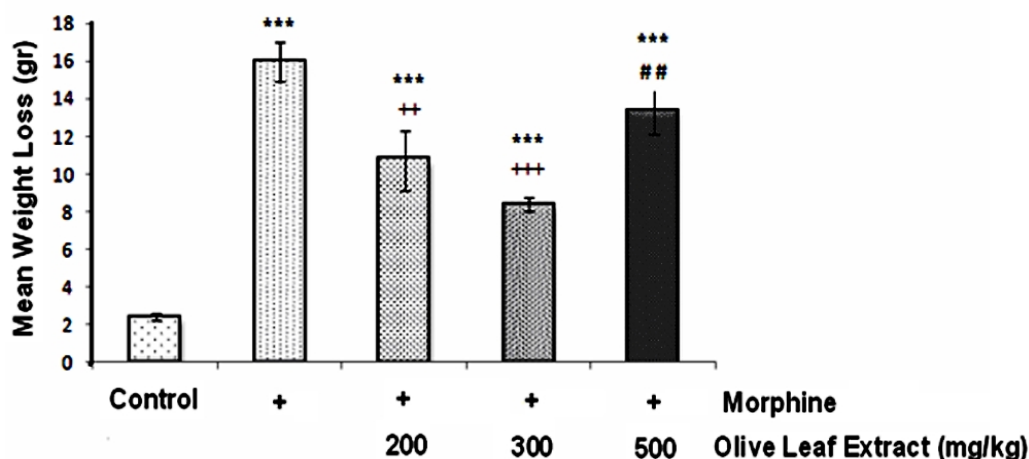
عصاره برگ زیتون مورد استفاده در این تحقیق می‌باشند [۱۱].
حیوان‌ها: در این تحقیق از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ الی ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوان‌ها از حیوانخانه مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی کرمان تهیه شدند. حیوان‌ها دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند و به صورت گروه‌های ۴ تائی در قفسه‌های مجزا نگهداری شدند. مدت زمان ۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنائی و دمای هوای ۲۵ درجه در محل نگهداری حیوان‌ها رعایت شد. ۵ روز قبل از شروع آزمایشات حیوان‌ها به خوبی دست‌آموز شدند تا به هنگام انجام تست مورد نظر، استرس در آنها بوجود نیاید.

القای وابستگی در حیوان‌ها: برای القای وابستگی

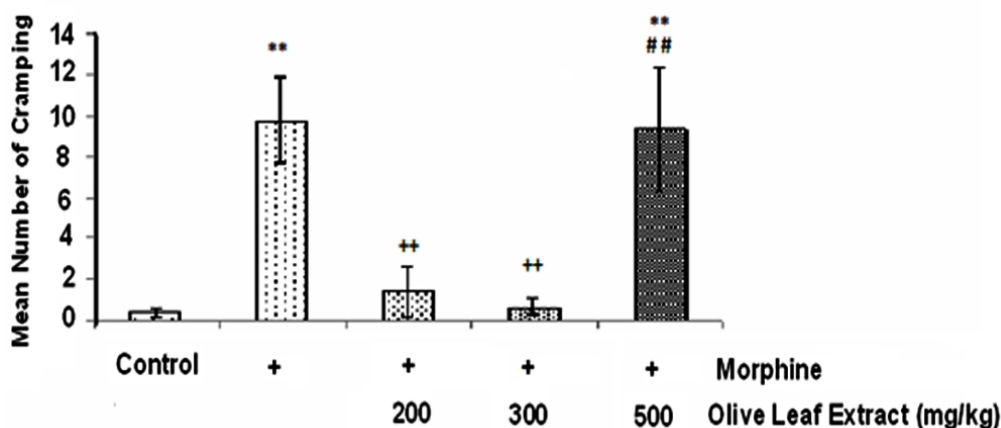
مرفینی، از دوزهای افزایشی مرفین به مدت یک هفته و دو نوبت در روز استفاده می‌شد. به این صورت که در روز اول و دوم (i.p.) ۲/۵ mg/kg، در روز سوم ۵، در روز چهارم ۱۰، در روز پنجم ۲۰، روز ششم ۴۰ mg/kg مرفین، در هر روز دو بار با فاصله زمانی ۱۰ ساعت تزریق شد. در روز هفتم که آخرین روز تزریق است ۵۰ mg/kg مرفین تزریق می‌شد [۱۰].

بررسی میزان وابستگی از طریق تست

نالوکسان: برای سنجش میزان وابستگی از تست نالوکسان استفاده می‌شد. به این صورت که ۵ ساعت بعد از آخرین تزریق مرفین حیوان‌ها ۳ mg/kg نالوکسان دریافت می‌کردند. سپس علامت‌های سندرم قطع دارو مانند کاهش وزن (Weight Loos)، افتادگی پلک (Ptosis)، دل‌پیچه - (Cramping)، پرش (Jumping)، دندان قروچه (Teeth Chattering) و اسهال (Diarrhea) هر حیوان بررسی شد. میانگین کاهش وزن، تعداد دل‌پیچه، پرش و گرومینگ به صورت عددی و وجود یا عدم وجود اسهال، دندان قروچه و افتادگی پلک در حیوانات مورد آزمایش به تعداد کل حیوانات گروه برآورد می‌شود [۱۰]. هر گروه‌های درمانی، دوزهای متفاوت عصاره (۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰) را، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق مرفین از طریق لوله دهانی - معدی دریافت می‌کردند. گروه کنترل نیز حلال عصاره (نرمال سالین) دریافت کردند. برای بررسی اثر oleuropein بر وابستگی به مرفین همانند روش‌های قبل عمل کرده با این تفاوت که دوز مصرفی (10 mg/kg) به صورت i.p تزریق می‌شد.



شکل ۱- مقایسه اثر تزریق مزمن مرفین به تنهایی یا همراه با دوزهای متفاوت عصاره (۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بر میانگین تغییرات وزن ناشی از نالوکسان. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است ($n=8$). $***p<0.001$ اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل، $++p<0.01$ ، $+++p<0.001$ اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه مرفین، $p<0.01$ ## اختلاف معنی دار در مقایسه با دوز ۳۰۰ عصاره به علاوه مرفین.



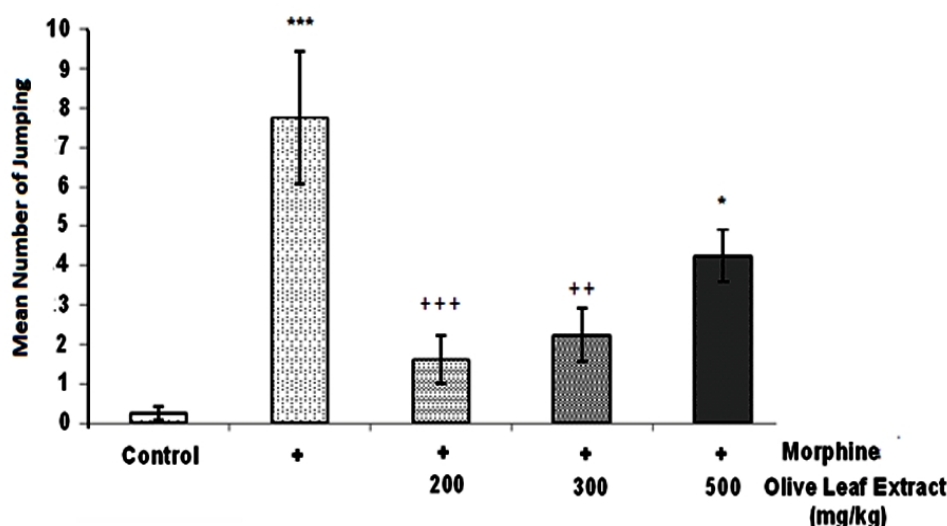
شکل ۲- مقایسه اثر تزریق مزمن مرفین و دوزهای متفاوت عصاره (۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) همراه با مرفین بر میانگین تعداد دل پیچه های ایجاد شده ناشی از نالوکسان. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است ($n=8$). $***p<0.001$ اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل، $++p<0.01$ اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه مرفین، $p<0.01$ ## اختلاف معنی دار در مقایسه با دوز ۲۰۰ و ۳۰۰ عصاره به علاوه مرفین.

دریافت کننده مرفین مشاهده گردید (شکل ۲). دوز ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثر معنی داری در این پدیده نداشت.

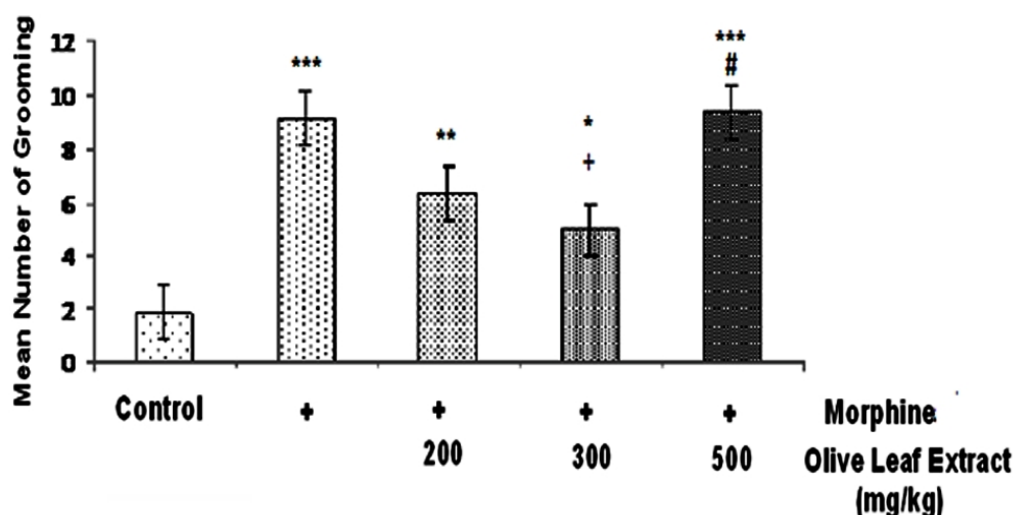
اثر عصاره برگ زیتون بر تعداد پرش های ناشی از نالوکسان: تجویز نالوکسان سبب افزایش قابل ملاحظه ای در تعداد پرش در گروه دریافت کننده مرفین مزمن می شود در حالی که چنین افزایشی در گروه های دریافت کننده دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ عصاره به علاوه مرفین رخ نمی دهد ($F_{(4,33)}=8.533$, $P=0.0001$). هر چند که میانگین تعداد پرش ها در گروه دریافت کننده دوز ۵۰۰ عصاره در مقایسه با گروه کنترل کمتر بود ولی اختلاف معنی داری را نسبت به گروه مرفین مزمن نشان نداد (شکل ۳).

کمتر می باشد [$F_{(4,32)}=11.545$, $P=0.0001$]. که این تغییرات کاهش وزن در موش های دریافت کننده عصاره با دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم معنی دار بوده است ($P<0.001$) ($P<0.01$) (شکل ۱).

اثر عصاره برگ زیتون بر روی دل پیچه ناشی از نالوکسان: در حیوان های که به طور مزمن مرفین دریافت کرده اند تعداد دل پیچه ها بعد از تزریق نالوکسان در مقایسه با گروه کنترل که به طور مزمن سالین دریافت کرده اند به طور معنی داری افزایش یافت ($p<0.01$). تجویز عصاره با دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم همراه با مرفین باعث کاهش معنی داری ($P<0.01$) در تعداد دل پیچه ها نسبت به گروه



شکل ۳- مقایسه اثر تزریق مزمن مرفین و دوزهای متفاوت عصاره (۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) همراه با مرفین بر میانگین تعداد پرش ایجاد شده به دنبال نالوکسان. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است (n=8). $p<0.05$ ، $***p<0.001$ اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل، $++p<0.01$ ، $+++p<0.001$ اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه مرفین.



شکل ۴- مقایسه اثر تزریق مزمن مرفین به تنهایی و همراه با دوزهای متفاوت عصاره (۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بر میانگین تعداد گرومینگ به دنبال تجویز نالوکسان. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است (n=8). $p<0.05$ ، $**p<0.01$ ، $***p<0.001$ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل، $+p<0.05$ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه مرفین، $\#p<0.05$ اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه عصاره در دوز ۳۰۰ به علاوه مرفین.

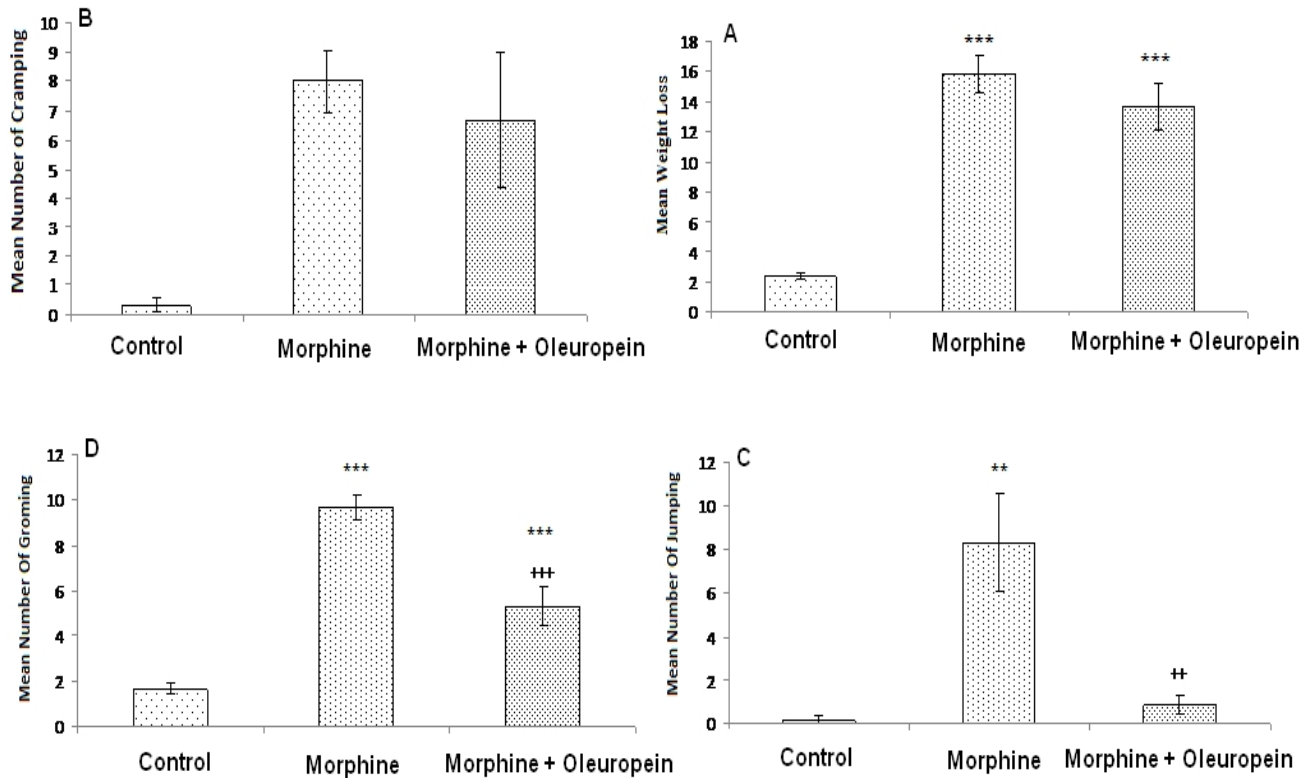
عصاره به علاوه مرفین را دریافت کرده بودند هیچ‌گونه کاهشی را در تعداد گرومینگ نسبت به گروه مرفین نشان ندادند (شکل ۴).

اثر اولئوروپتین بر علائم درجه بندی شده ترک ناشی از نالوکسان:

از آنجائی که در مطالعه قبلی ما دوزهای ۲، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم اولئوروپتین بکار رفته بود و تنها دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم آن به عنوان دوز موثر در گروه تحمل شناخته

اثر عصاره برگ زیتون بر گرومینگ ناشی از نالوکسان:

تزریق نالوکسان در گروه دریافت کننده مزمن مرفین باعث افزایش سطح معنی دار در میانگین تعداد گرومینگ می‌شود ($p<0.001$). تجویز عصاره همراه با مرفین سبب کاهش گرومینگ شد [$F_{(4,32)}=12.505$, $P=0.0001$] ولی فقط در دوز ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم اثر معناداری نسبت به گروه شاهد (مرفین) مشاهده شد ($p<0.05$). گروهی که دوز ۵۰۰



شکل ۵- مقایسه اثر تزریق مزمن مرفین و دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم اولئوروپتین همراه با مرفین بر علائم درجه بندی شده ناشی از سندرم قطع به دنبال تجویز نالوکسان. نتایج به صورت میانگین $\pm$ خطای استاندارد نشان داده شده است (n=6). (A) میانگین تغییرات وزن (B) میانگین تعداد دل پیچه (C) میانگین تعداد پرش (D) میانگین تعداد گرومینگ. ***p<0.001 **p<0.01 *p<0.05 اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه کنترل. +++p<0.001 ++p<0.01 اختلاف معنی دار در مقایسه با گروه مرفین.

شدند. هر چند که تعداد حیوانات دارای افتادگی پلک در گروه-های دریافت کننده عصاره با دوز ۲۰۰ و ۳۰۰ کمتر شده بود اما این کاهش معنی دار نبود (جدول ۱). اما تجویز عصاره در دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ همراه با مرفین باعث کاهش معنی دار در تعداد حیوانات دارای اسهال شد. در گروهی که دوز ۲۰۰ عصاره دریافت کرده بودند تعداد حیوانات دارای دندان قروچه به طور معنی داری کمتر از گروه مرفین بودند (جدول شماره ۱). حیوان‌هائی که به طور مزمن مرفین را به همراه ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم اولئوروپتین دریافت کرده‌اند به تعداد کمتری دچار افتادگی پلک، اسهال و دندان قروچه ناشی از تجویز نالوکسان شدند.

بحث

در این مطالعه برای بررسی روند ایجاد وابستگی فیزیکی ناشی از تجویز مزمن مرفین از تست نالوکسان استفاده شد. یافته‌ها نشان می‌دهند که علائم ترک ناشی از تزریق

شد [۴۱]. در اینجا نیز تنها همین دوز از اولئوروپتین بر روند وابستگی مورد آزمایش قرار گرفته است. نتایج نشان داد که تزریق مزمن مرفین باعث افزایش سطح معنی داری در ایجاد علائم ترک ناشی از نالوکسان (کاهش وزن، دندان قروچه، افتادگی پلک، پرش، اسهال، دل پیچه و گرومینگ) در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد. تجویز اولئوروپتین (۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) همراه با مرفین باعث تأثیر معنی داری بر تغییرات میانگین وزن (شکل ۵-الف) و دل پیچه (شکل ۵-ب) ناشی از نالوکسان نداشت ولی موجب کاهش معنی داری در میانگین تعداد پرش (شکل ۵-ج) و گرومینگ (P<0.001) (شکل ۵-د) در مقایسه با گروه مرفین می‌گردد.

– اثر عصاره برگ زیتون و اولئوروپتین بر افتادگی پلک، اسهال و دندان قروچه ناشی از نالوکسان:

همگی حیوان‌هائی که به طور مزمن مرفین دریافت کرده‌اند دچار افتادگی پلک (Ptosis)، ایجاد اسهال (Diarrhea) و دندان قروچه (Teeth chattering) ناشی از تجویز نالوکسان

Table 1. The number of animals exhibiting the sign/total number of animals observed in each group.

Groups	Withdrawal signs		
	Diarrhea	Ptosis	Teeth chattering
Control	0/8	0/8	0/8
Morphine	8/8***	8/8***	8/8***
Morphine+Veh	8/8***	8/8***	8/8***
Morphine+Ext (200)	3/8+	7/8***	6/8**
Morphine+Ext (300)	3/8+	6/8**	3/8+
Morphine+Ext (500)	6/8**	8/8***	7/8***
Morphine+Oleuropein (10)	1/6++	2/6+	2/6+

P<0.01 *P<0.001 versus control. +P<0.05, ++P<0.01 versus morphine treated animals

نالوکسان (کاهش وزن، دل پیچه، گرومینگ، افتادگی پلک، اسهال و دندان قروچه) در حیوان‌های که تحت مصرف مزمن مرفین قرار گرفته‌اند نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری افزایش می‌یابد. که این نتایج نیز با مطالعات گذشته مطابقت دارد [۱۰].

به علاوه، میزان بیان کانال‌های کلسیم نوع L در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی که دچار سندرم ترک شده‌اند بیشتر می‌شود که این افزایش بیان بیشتر کانال‌های کلسیم نوع L سطح کلسیم را در داخل سلول افزایش می‌دهد در نتیجه آزادسازی نوروترانسمیترهای درگیر در ترک اویپوئیدها تشدید می‌یابد [۳۵]. آنتاگونیست‌های کانال‌های کلسیم علامت‌های وابستگی فیزیکی را در حیوانات کاهش می‌دهد [۳۴، ۳۶]. در یک مطالعه گزارش شده است که بلوکرهای کانال کلسیم هم از طریق مکانیسم‌های محیطی و هم مرکزی در مهار سندرم ترک مرفینی دخالت می‌کنند [۴]. این عملکرد از طریق فعالیت گیرنده اویپوئیدی مستقل صورت می‌گیرد. زیرا هیچ یک از این عوامل جایگزین جایگاه‌های اتصالی نالوکسان نمی‌شود. هم کانال‌های کلسیم نوع L و هم کانال‌های کلسیم نوع T در وابستگی به مرفین و ایجاد سندرم ترک نقش ایفا می‌کنند [۷، ۱۰].

Scheffler و همکارانش با استفاده از آزمایشات ولتاژ کلمپ نشان داده‌اند که عصاره برگ زیتون و اولئوروپئین به

عنوان یک آنتاگونیست کانال‌های کلسیم نوع L عمل می‌کند و مشخص کردند این عصاره به طور کامل مانع از عملکرد کانال‌های کلسیم نوع L در کاردیومیوسیت‌های کشت داده شده نوزادان موش صحرایی می‌گردد [۳۳]. Gilani و همکارانش با مطالعات *in vivo* نشان داده‌اند که عصاره برگ زیتون دارای خواص مهار کننده کانال‌های کلسیمی می‌باشند [۱۶]. لذا می‌توان انتظار داشت که عصاره برگ زیتون و ترکیب اصلی آن، اولئوروپئین، با داشتن خواص بلوگری کانال کلسیم نقش مهمی در کاهش تحمل و وابستگی فیزیکی ناشی از تزریق مزمن مرفین داشته باشد.

PKA و PKC یک نقش ویژه در ایجاد تحمل و وابستگی مرفینی ایفا می‌کنند به طوری که سطح این پروتئین کینازها با مصرف مزمن مرفین در بافت‌های مختلف افزایش می‌یابد [۳۲]. فعالیت پروتئین کینازهای مانند PKC، PKA و CaMKII در مسیرهای انتقال سیگنال‌های نورونی و گلیا زیاد می‌شود و منجر به ایجاد حساسیت‌های محیطی و مرکزی می‌گردند. فعالیت پروتئین کیناز C فرایندهای متعددی را تعدیل می‌کنند از جمله: رهایش سیتوکین PGE₂، افزایش فعالیت نیتریک اکساید سنتاز، فعالیت فسفولیپاز القاء شده توسط برادی کین، فعالیت ERK القاء شده توسط مرفین و فعالیت گلیا در سیستم عصبی [۳۲]. مطالعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد ترکیبات موجود در عصاره برگ زیتون توانایی مهار PKC را

همچنین مشخص شده است ترکیبات فنولی منابع گیاهی، مانع از فعالیت COX-2 و فرایندهای التهابی حاصل از آن در رده های سلولی انسانی می شوند [۵]. پس می توان احتمال داد که در این مطالعه عصاره برگ زیتون و اولئوروپتین احتمالاً با مهار التهاب نورونی ناشی از مصرف مزمن مرفین توانسته باشند از ایجاد وابستگی جلوگیری کرده باشند.

تزریق مزمن یا طولانی مدت مرفین موجب افزایش تنظیمات پروتئین پروآپوپتوتیک کاسپاز-۳ و Bax و کاهش تنظیمات پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl2 می شوند. مهار کاسپاز از ایجاد نوروتوکسیتی مرفینی جلوگیری می کند [۴۰]. مصرف مزمن مرفین موجب القاء آپوپتوز در قسمت های مختلف مغز و نخاع می گردد [۳]. در زمینه اثر عصاره برگ زیتون بر آپوپتوز نورونی، Kaeidi و همکارانش نشان داده اند که عصاره برگ زیتون با خاصیت ضد آپوپتوزی خود باعث کاهش فعالیت کاسپاز-۳ و Bax و افزایش فعالیت پروتئین آنتی آپوپتوتیک Bcl2 در سلول های تیمار شده با گلوکز بالا و همچنین در بافت نخاعی موش های دیابتی شده با STZ می گردد [۲۰]. پس خاصیت ضدآپوپتوزی عصاره نیز می تواند نقش احتمالی در کاهش اثرات ناشی از مصرف مزمن مرفین داشته باشد.

در مجموع عصاره برگ زیتون و ترکیب اصلی آن اولئوروپتین نقش موثری در جلوگیری از روند ایجاد وابستگی فیزیکی ناشی از تجویز مزمن مرفین داشته اند، عصاره برگ زیتون و اولئوروپتین با داشتن خواص آنتی اکسیدانی، ضد آپوپتوزی، ضد التهابی و بلوگری کانال های کلسیمی نقش احتمالی مهمی در کاهش عوارض ناشی از مصرف مزمن مرفین داشته اند.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات گیاهان دارویی رازی لرستان و مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی بقیة الله (عج) و در قالب بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم لیلا زارع انجام شده است.

دارند به طوری که کورستین (بسته به غلظت آن) باعث مهار فعالیت PKC در مغز موش های صحرایی می شود [۱۴]. Xu و همکارانش نشان دادند که تزریق مزمن هروئین، ظرفیت کل آنزیم های آنتی اکسیدانی مانند گلوکاتیون پراکسیداز (GPx)، گلوکاتیون ردکتاز (GRx)، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید-دیسموتاز (SOD) [که به عنوان سیستم های آنتی اکسیدانی آنزیماتیک داخل سلولی بدن هستند] در سرم و مغز کاهش می دهند [۳۸]. مطالعات گسترده نشان می دهد که اویوئیدها قادر به ایجاد گونه های واکنشگر اکسیژنی (ROS) در چندین بافت می باشند و سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی را کاهش می دهند [۸، ۳۰]. همچنین مشخص شده است که برخی از آنتی اکسیدان ها مانند اسید اسکوربیک و ملاتونین قادر هستند سدرم ترک مرفینی یا هروئینی را تضعیف کند [۳۰]. بنابراین اگر بتوان ظرفیت آنتی اکسیدانی طبیعی بدن را بهبود بخشید می توان به صورت مطلوبی از بروز هیپرآلجریا، تحمل و وابستگی ناشی از تزریق مزمن مرفین جلوگیری به عمل آورد. خوشبختانه در این زمینه گزارشاتی از تأثیرات آنتی اکسیدانی مثبت عصاره برگ زیتون و ترکیبات پلی فنلی موجود در آن وجود دارد [۱، ۲۰]. تزریق مزمن مرفین موجب فعالیت سلول های گلیا در سیستم عصبی مرکزی و در نتیجه تولید سیتوکین های پیش برنده التهابی مانند فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF α)، اینترلوکین ۱- β (IL-1 β) و اینترلوکین ۶ (IL-6) و در نتیجه التهاب نورونی می گردند [۳۷]. عوارض مصرف مزمن اویوئیدها از طریق عوامل ضد التهابی مهار می شوند [۲۴]. مکانیسم های احتمالی فعالیت سلول های گلیا از طریق تزریق مزمن مرفین به طور کامل واضح نیست اما ثابت شده است که مرفین سلول های گلیا را برای افزایش تولید سیتوکین های پس التهابی تحریک می کند [۶].

Gong و همکاران هم نشان دادند که هیدروکسی تیروزول (یکی از ترکیبات پلی فنلی برگ زیتون) نه تنها اثرات ضد التهابی و ضد دردی داشته بلکه مانع بیان mRNA ی عوامل التهابی IL-1B و TNF α در موش های صحرایی می شود [۱۷].

antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life sci* 78 (2006) 1371-1377.

[2] Antkiewicz-Michaluk L, Michaluk J, Romanska I,

References

[1] Al-Azzawie H.F, Alhamdani MS, Hypoglycemic and

- Vetulani J, Cortical dihydropyridine binding sites and a behavioral syndrome in morphine-abstinent rats. *Eur J Pharmacol* 180 (1990) 129-135.
- [3] Atici S, Cinel L, Cinel I, Doruk N, Aktekin M, Akca A, Camdeviren, H., Oral, U. Opioid neurotoxicity: comparison of morphine and tramadol in an experimental rat model. *Int J Neurosci* 114 (2004) 1001-1011.
- [4] Baeyens J, Esposito E, Ossowska G, Samanin R, Effects of peripheral and central administration of calcium channel blockers in the naloxone-precipitated abstinence syndrome in morphine-dependent rats. *Eur J Pharmacol*. 137 (1987) 9-13.
- [5] Banerjee T, Van der, Vliet A, Ziboh V.A, Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line* 1. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66 (2002) 485-492.
- [6] Chao T.S, Foster D.A, Rapp U.R, Rosner M.R, Differential Raf requirement for activation of mitogen-activated protein kinase by growth factors, phorbol esters, and calcium. *J Biol Chem* 269 (1994) 37-73.
- [7] Dogrul A, Zagl I.U, Tulunay F.C, The role of T-type calcium channels in morphine analgesia, development of antinociceptive tolerance and dependence to morphine, and morphine abstinence syndrome. *Life Sci* 71 (2002) 725-734.
- [8] Doyle T, Bryant L, Batinic-Haberle I, Little J, Cuzzocrea S, Masini E, Spasojevic I, Salvemini D, Supraspinal inactivation of mitochondrial superoxide dismutase is a source of peroxynitrite in the development of morphine antinociceptive tolerance. *Neuroscience* 164 (2009) 702-710.
- [9] El S.N, Karakaya S, Olive tree (*Olea europaea*) leaves: potential beneficial effects on human health. *Nutr Rev* 67 (2009) 632-638.
- [10] Esmaeili-Mahani S, Fathi Y, Motamedi F, Hosseini-panah F, Ahmadiani A, L-type calcium channel blockade attenuates morphine withdrawal: In vivo interaction between L-type calcium channels and corticosterone. *Horm Behav* 53 (2008) 351-357.
- [11] Esmaeili-Mahani S, Rezaeezadeh-Roukerd M, Esmaeilpour K, Abbasnejad M, Rasouljan B, Sheibani, V, Kaeidi A, Hajializadeh Z, Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract elicits antinociceptive activity, potentiates morphine analgesia and suppresses morphine hyperalgesia in rats. *J Ethnopharmacol* 132 (2010) 200-205.
- [12] Esmaeili-Mahani S, Vahedi S, Motamedi F, Pourshanazari A, Khaksari M, Ahmadiani A, Involvement of hypothalamic pituitary adrenal axis on the analgesic cross-tolerance between morphine and nifedipine. *Pharmacol Biochem Behav* 86 (2007) 806-812.
- [13] Esmaeili Mahani S, Vahedi S, Motamedi F, Pourshanazari A, Khaksari M, Ahmadiani A Nifedipine potentiates antinociceptive effects of morphine in rats by decreasing hypothalamic pituitary adrenal axis activity. *Pharmacol Biochem Behav* 82 (2005) 17-23.
- [14] Ferriola P, Middleton J, Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanism and structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 48 (1989) 1231- 1236.
- [15] Fundytus M.E, Ritchie J, Coderre T.J, Attenuation of morphine withdrawal symptoms by subtype selective metabotropic glutamate receptor antagonists. *Br J Pharmacol* 120 (1997) 1015-1020.
- [16] Gilani A, Khan A.U, Jabbar Shah A, Connor J, Jabeen Q, Blood pressure lowering effect of olive is mediated through calcium channel blockade. *Int J Food Sci Nutr* 56 (2005) 613-620.
- [17] Gong D, Geng C, Jiang L, Cao J, Yoshimura H, Zhong L, Effects of hydroxytyrosol 20 on carrageenan induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytother Res* 23 (2009) 646-650.
- [18] Hassanzadeh K, Habibi-asl B, Farajnia S, Roshangar L, Minocycline prevents morphine-induced apoptosis in rat cerebral cortex and lumbar spinal cord: a possible mechanism for attenuating morphine tolerance. *Neurotox Res* 19 (2011) 649-59.
- [19] Jin H, Li YH, Xu JS, Guo GQ, Chen DL, Bo Y, Lipoxin A(4) analog attenuates morphine antinociceptive tolerance, withdrawal-induced hyperalgesia, and glial reaction and cytokine expression in the spinal cord of rat. *Neuroscience* 208 (2012) 1-10.
- [20] Kaeidi A, Esmaeili-Mahani S, Sheibani V, Abbasnejad M, Rasouljan B, Hajializadeh Z, Afrazi S, Olive (*Olea europaea* L.) leaf extract attenuates early diabetic neuropathic pain through prevention of high glucose-induced apoptosis: In vitro and in vivo studies. *J*

- Ethnopharmacol* 136 (2011) 188-196
- [21] Koob GF, Neurobiology of addiction: toward the development of new therapies. *Ann N Y Acad Sci* 909 (2000) 170-185.
- [22] Koob G.F, Neurobiology of addiction. *Focus* 9 (2011) 55-65.
- [23] Koob G.F, Le Moal M, Addiction and the brain antireward system. *Annu Rev Psychol* 59 (2008) 29-53.
- [24] Lewis S.S, Hutchinson M.R, Rezvani N, Loram L.C, Zhang Y, Maier S.F, Rice K.C, Watkins L.R, Evidence that intrathecal morphine-3-glucuronide may cause pain enhancement via toll-like receptor 4/MD-2 and interleukin-1beta. *Neuroscience* 165 (2010) 569-583
- [25] Miljkovic D, Dekanski D, Miljkovic Z, Momcilovi M, Mostarica-Stojkovic M, Dry olive leaf extract ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Nutr* 16 (2009) 346-350
- [26] Mohagheghi F, Bigdeli M.R, Rasouljan B, Hashemi P, Pour M.R, The neuroprotective effect of olive leaf extract is related to improved blood-brain barrier permeability and brain edema in rat with experimental focal cerebral ischemia. *Phytomedicine* 503 (2010) 32-65.
- [27] Nestler E.J, Carlezon W.A, The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol Psychiatry* 59 (2006) 1151-1159.
- [28] Ortega-Garcia F, Peragon J, The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree *Olea europaea* L. cv. Picual. *J Sci Food Agr* 89 (2009) 1565-1573.
- [29] Pasternak G.W, Molecular biology of opioid analgesia. *J Pain Symptom manage* 29 (2005) 2-9.
- [30] Qiusheng, Z, Yuntao Z, Rongliang Z, Dean G, Changling L, Effects of verbascoside and luteolin on oxidative damage in brain of heroin treated mice. *Pharmazie* 60 (2005) 539-543.
- [31] Ramkumar V, El-Fakahany E.E, Prolonged morphine treatment increases rat brain dihydropyridine binding sites: possible involvement in development of morphine dependence. *Eur J Pharmacol* 146 (1988) 73-83.
- [32] Salvemini D, Little J.W, Doyle T, Neumann W.L, Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radic Biol Med* 51 (2011) 951-966
- [33] Scheffler A, Rauwald H.W, Kampa B, Mann U, Mohr F.W, Dhein S, *Olea europaea* leaf extract exerts L-type Ca^{2+} channel antagonistic effects. *J Ethnopharmacol* 120 (2008) 233-240.
- [34] Seth V, Upadhyaya P, Moghe V, Ahmad M, Role of calcium in morphine dependence and naloxone-precipitated withdrawal in mice. *J Exp Pharmacol* 3 (2011) 7-12.
- [35] Vargas M, Martínez-Piñero M.G, Milanés M.V, Neurochemical activity of noradrenergic neurons and pituitary-adrenal response after naloxone-induced withdrawal: the role of calcium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355 (1997) 501-506.
- [36] Vitcheva V, Mitcheva M, Effects of nifedipine on behavioral and biochemical parameters in rats after multiple morphine administration. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 26 (2004) 631-634.
- [37] Watkins L.R, Hutchinson M.R, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan E.D, Maier S.F Glia as the "bad guys": Implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun* 21 (2007) 131-46.
- [38] Xu B, Wang Z, Li G, Li B, Lin H, Zheng R, Zheng Q, Heroin administered mice involved in oxidative stress and exogenous antioxidant alleviated withdrawal syndrome. *Basic clin Pharmacol Toxicol* 99 (2006) 153-161.
- [39] Yamamoto R, Yanagita T, Kobayashi H, Yokoo H, Wada A, Up Regulation of Sodium Channel Subunit mRNAs and Their Cell Surface Expression by Antiepileptic Valproic Acid: Activation of Calcium Channel and Catecholamine Secretion in Adrenal Chromaffin Cells. *J Neurochem* 68 (1997) 1655-1662.
- [40] Yin D, Woodruff M, Zhang Y, Whaley S, Miao J, Ferslew K, Zhao J, Stuart C, Morphine promotes Jurkat cell apoptosis through pro-apoptotic FADD/P53 and anti-apoptotic PI3K/Akt/NF-[kappa] B pathways. *J Neuroimmunol* 174 (2006) 101-107.
- [41] Zare L, Esmaeili-Mahani S, Abbasnejad M, Rasouljan B, Sheibani V, Sahraei H, Kaeidi A, Oleuropein, Chief Constituent of Olive Leaf Extract, Prevents the Development of Morphine Antinociceptive Tolerance through Inhibition of Morphine-induced L-type Calcium Channel Overexpression. *Phytother Res* 11 (2012) 1731-1737.