مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۱۹، آذر ۱۳۹۹، ۹۷۸-۹۶۹

تأثیر اولئوروپیین (Oleuropein) بر سطح بیان فاکتور نوروتروفیک بافت هیپوکمپ و نقص حافظه کاری القاء شده با مورفین در موش‌های صحرایی نر: یک مطالعه تجربی

جلال حسن شاهی[۱]، محمدرضا رحمانی[۲]، فرهاد شیبانی[۳]، آیت کائیدی[۴]

دریافت مقاله: ۹۹/۲/۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۹/۲/۲۰ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۹/۸/۲۶ پذیرش مقاله: ۹۹/۸/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: مصرف مورفین باعث ایجاد آسیب در ناحیه هیپوکامپ مغز می‌شود. اولئوروپیین اثر حفاظتی بر روی نورون‌های مغز دارد. مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر اولئوروپیین بر سطح بیان پروتئین فاکتور نوروتروفیک مشتق از مغز (Brain derived nerve factor; BDNF) بافت هیپوکمپ و نقص حافظه کاری القاء شده با مورفین در موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۴۰ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. حیوانات به ۵ گروه ۸تایی تقسیم شدند که شامل: گروه کنترل/سالین (دریافت سالین به‌صورت داخل صفاقی و به مدت ۴ هفته)، گروه مورفین (دریافت ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین روزانه به‌صورت زیر پوستی و به مدت ۴ هفته) و گروه‌های مورفین+اولئوروپیین (دریافت دوزهای ۵، ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اولئوروپیین به‌صورت داخل صفاقی + مورفین به‌صورت تزریق زیر پوستی به مدت ۴ هفته). در پایان با استفاده از تست اندازه گیری رفتار متناوب در ماز Y شکل، حافظه کاری حیوانات ارزیابی شد. سپس میزان بیان پروتئین BDNF هیپوکمپ با استفاده از روش الایزا اندازه‌گیری شد. برای آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی Tukey استفاده شد.

یافته‌ها: تزریق داخل صفاقی اولئوروپیین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در موش‌های دریافت کننده مورفین به‌طور معنی‌داری باعث بهبود عمکرد حافظه کاری ($P<۰/۰۱$) و افزایش میزان بیان پروتئینBDNF ($P<۰/۰۵$) نسبت به گروه‌های تیمار شده با مورفین شد.

نتیجه‌گیری: اولئوروپیین می‌تواند باعث افزایش میزان بیان پروتئین BDNF در بافت هیپوکمپ و بهبود نقص حافظه کاری القاء شده با مورفین در موش‌های صحرایی شود.

واژه‌های کلیدی: مورفین، اولئوروپیین، حافظه کاری، ماز Y شکل، پروتئین BDNF

۱- استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی - فارماکولوژی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۲- کارشناسی ارشد فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۳- استادیار فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی - فارماکولوژی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
۴- (نویسنده مسئول) استادیار فیزیولوژی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان، ایران
تلفن: ۰۳۴-۳۱۳۱۵۰۷۴، دورنگار: ۰۳۴-۳۱۳۱۵۰۰۳، پست الکترونیکی: a.kayedi@gmail.com

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

مقدمه

داروی مورفین به عنوان یک ضد درد قوی در کلینیک کاربرد دارد. علی‌رغم تأثیر قوی داروی مورفین به عنوان یک ضد درد، این ماده می‌تواند اثرات مخربی فرآیندهای مغز از جمله عصب زایی، تمایز سلولی و آپوپتوز القاء شده در نورون های سیستم عصبی مرکزی داشته باشد [۱]. علاوه بر این، گزارش شده است که مصرف مزمن مورفین موجب بروز اختلالات شناختی از جمله باعث بروز نقص حافظه می‌شود [۱].

تحقیقات نشان داده است که لوب گیجگاهی میانی مغز دارای نقشی اساسی در تشکیل حافظه بیانی و مرحله تثبیت دارد. در پستانداران هیپوکمپ دارای نقش اساسی در مرحله آغازین تثبیت حافظه دارد. به طور کلی هیپوکمپ نقش اساسی را در چندین نوع یادگیری از جمله در شکل‌گیری نقشه فضایی، یادگیری مکان‌ها و یادگیری معکوس به عهده دارد [۲].

از آن‌جایی که گیرنده‌های اوپیوئیدی در بافت مغز به ویژه در نواحی قشر پره فرونتال و هیپوکمپ به وفور بیان می‌شوند و هم‌چنین مسیرهای عصبی آوران از سایر نقاط مغز به این نواحی که حاوی نوروپپتیدهای اوپیوئیدی هستند، وارد می‌شود و این گیرنده‌ها باعث تغییراتی در انواع یادگیری و حافظه می‌گردند [۳]. علاوه بر این مورفین باعث بروز استرس اکسیداتیو، مرگ نورونی، بروز التهاب، تغییر در مسیرهای پیام رسانی درون سلولی و فاکتورهای نوروتروفیک، مانند فاکتور رشد عصبی مشتق از مغز (Brain derived nerve factor, BDNF) می‌شود [۴].

هم‌چنین مشخص شده است که مورفین از طریق شکل پذیری نامطلوب دندریتی و نیز تخریب نورونی در هیپوکمپ و ساختمان‌های وابسته به قشر لیمبیک باعث ایجاد اختلال در نورون زایی در لایه سلول‌های گرانولی هیپوکامپ موش‌های بالغ می‌گردد، به طوری که پس از مدتی، میزان نورون‌ها در این نواحی کاهش می‌یابند [۳]. علاوه بر این مشخص شده است که استفاده مزمن از مورفین از طریق تداخل با مسیرهای مربوط به پیام رسانی درون سلولی BDNF، در اعمال تنظیمی نورون‌ها مداخله می‌کند [۵] و موجب القاء استرس اکسیداتیو در نورون‌های مغز به ویژه نورون‌های هیپوکمپ حیوانات آزمایشگاهی می‌شود [۶]. پلی‌فنول‌ها ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی هستند که قادرند رادیکال‌های آزاد را جذب نموده و از بدن در برابر بسیاری از بیماری‌ها محافظت کنند [۸-۷].

اولئوروپیین (Oleuropein) جزء اصلی فعال عصاره برگ زیتون (یک محصول طبیعی از گروه سکوئیریروئید) و مهم‌ترین پلی فنول یافت شده در آن می باشد. اولئوروپیین در پوست، برگ و میوه درخت زیتون یافت می‌شود [۱۰-۹]. مطالعات نشان داده است که اولئوروپیین دارای خواص فارماکولوژیک فراوانی از جمله ضد آریتمی، محرک ایمنی، حفاظت عصبی، ضد التهاب، ضد اسپاسم و غیره می‌باشد [۶, ۱۱]. بسیاری از این خواص به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی اولئوروپیین می‌باشد [۱۳-۱۲]. اولئوروپیین به عنوان آنتی‌اکسیدان از افزایش رادیکال‌های آزاد در بدن از طریق ایجاد گروه‌های هیدروکسیل و خنثی نمودن مستقیم رادیکال‌های آزاد جلوگیری می‌کند [۱۴, ۱۱]. از آن‌جایی که

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

مشخص شده است که مصرف مزمن مورفین اثرات زیانباری را بر روی ساختارهای مغز از جمله هیپوکمپ دارد و موجب نقص حافظه می‌گردد [۳] و از طرفی گزارش شده است که اولئوروپیین می‌تواند از طریق اثرات آنتی اکسیدانی خود نقش حفاظت نورونی داشته باشد، بنابراین مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر اولئوروپیین بر سطح بیان BDNF بافت هیپوکمپ و نقص حافظه کاری القاء شده با مورفین در موش‌های صحرایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در سال ۱۳۹۷ بر روی ۴۰ سر موش صحرایی نر از نژاد ویستار با وزن ۲۳۰-۲۰۰ گرم انجام شد که این حیوانات در قفس‌های تمیز در حیوان‌خانه دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان با درجه حرارت ۲۴-۲۲ درجه سانتی گراد و دوره تاریکی - روشنایی ۱۲ ساعته و رطوبت ۴۵ درصد نگه‌داری می‌شدند و حیوانات به صورت آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. تمام مراحل آزمایشی مطابق دستورالعمل مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی در دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام شد. هم‌چنین این مطالعه دارای کد اخلاق از دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان به شماره ثبتی IR.RUMS.REC.1395.103 می‌باشد.

در این مطالعه، حیوانات به صورت تصادفی به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند که شامل: گروه ۱ (کنترل/ سالین): به حیوانات این گروه به مدت ۴ هفته محلول سالین به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه ۲ (مورفین): به حیوانات این گروه به مدت ۴ هفته، مورفین (۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت زیر پوستی تزریق شد. گروه ۳ (مورفین + اولئوروپیین با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم): به حیوانات این گروه به مدت ۴ هفته مورفین (۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت زیر پوستی) و اولئوروپیین با دوز (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی) تزریق شد [۶]. گروه ۴ (مورفین + اولئوروپیین با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم): به حیوانات این گروه به مدت ۴ هفته، مورفین (۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت زیر پوستی) و اولئوروپیین با دوز (۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی) تزریق شد [۶]. گروه ۵ (مورفین + اولئوروپیین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم): به حیوانات این گروه به مدت ۴ هفته، مورفین (۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت زیر پوستی) و اولئوروپیین با دوز (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت داخل صفاقی) تزریق شد [۶].

پودر مورفین سولفات از شرکت تولید مواد اولیه داروپخش (تماد) تهیه و برای هر بار تزریق به صورت تازه توزین و در محلول سالین حل می‌شد (۴۵ میلی‌گرم مورفین سولفات در ۱ میلی‌لیتر سالین نرمال) و تزریق به صورت زیر پوستی انجام می‌شد. به همراه تیمار با مورفین برخی حیوانات نیز دوزهای ۵، ۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اولئوروپیین حل شده در محلول سالین را به صورت روزانه و به شکل داخل صفاقی دریافت می‌کردند. تجویز مورفین با دوز ۴۵ میلی‌گرم مورفین سولفات در ۱ میلی‌لیتر سالین نرمال روشی روتین برای ایجاد نقص حافظه کاری القاء شده با این ماده می‌باشد [۶].

پس از ۴ هفته تیمار حیوانات با مورفین و اولئوروپیین، برای بررسی حافظه کاری از تست رفتاری اندازه‌گیری رفتار تناوب

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

در ماز Y- شکل (Y-maze spontaneous alternation test) استفاده شد [۱۵]. در این آزمون میزان عملکرد حیوانات از نظر حافظه کاری از طریق مشاهده و اندازه‌گیری رفتار تناوب خود به خودی حیوان در یک جلسه کاری مورد بررسی قرار گرفت. ماز مربوط به این آزمون از جنس پلکسی گلاس بود و هر بازو دارای ابعاد ۴۰×۳۰×۱۵ سانتی‌متر بود. بازوهای ماز از طریق یک محوطه مرکزی به هم متصل می‌گردیدند. برای انجام آزمون هر موش صحرایی در قسمت انتهایی یک بازو قرار داده می‌شد و امکان دسترسی آزاد آن به تمام نواحی ماز در یک دوره زمانی ۸ دقیقه فراهم می‌گردید. تعداد دفعات ورود حیوان بداخل هر بازو با مشاهده نمودن ثبت می‌شد. ورود حیوان به داخل یک بازو زمانی بود که پاهای عقبی حیوان به طور کامل در داخل بازو قرار می‌گرفت. رفتار تناوب به عنوان ورودهای موفق و پشت سر هم به داخل تمام بازوها در مجموعه‌های سه تایی در نظر گرفته شد. به این ترتیب درصد تناوب از نسبت تناوب مشاهده شده به حداکثر تناوب (۲- تعداد کل بازوهای وارد شده) ۱۰۰×محاسبه گردید [۱۵]. پس از پایان هر تست برای هر موش، ماز Y-شکل با الکل ۱۰٪ تمیز شد (البته در بین ترایال‌های آزمایش تمیزکاری با الکل انجام نمی‌شد). داده‌های آزمون ماز Y- شکل می‌تواند نشان دهنده شاخصی از حافظه فضایی کاری در کوتاه مدت (از نوع بازشناختی) در جوندگانی نظیر موش کوچک آزمایشگاهی و همچنین موش صحرایی باشد [۱۵].

پس از اتمام آزمون رفتاری، حیوانات تحت بی‌هوشی عمیق با داروی اتر قرار گرفتند و سر حیوانات جدا شد و مغز از جمجمه خارج گردید. ناحیه هیپوکمپ از مغز جدا شد و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شده و نمونه‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. بافت هیپوکمپ به قطعات کوچک‌تر تقسیم و در بافر RIPA (Radio-immuno-precipitation assay) هموژن شد. این ترکیب به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (مدل ۵۷۰۲، شرکت Eppendorf، کشور آلمان) شد و سپس محلول رویی جداسازی و در میکروتیوب‌های تمیز نگهداری شد. در آخر مطابق با استفاده از دستورالعمل کیت BDNF ELISA (ZellBio، آلمان) سطوح پروتئین BDNF در بافت هیپوکمپ گروه‌های مختلف آزمایشی اندازه‌گیری شد [۱۶].

به این منظور تمامی نمونه‌ها بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده کیت ZellBio مورد ارزیابی قرار گرفت. پروتکل روش سنجش به صورت زیر بود: ابتدا معرف‌ها، نمونه‌ها و استانداردها طبق دستورالعمل آماده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد و نمونه به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه اضافه شده و به مدت دو ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند و مایع داخل هر چاهک تخلیه شد. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر از Biotin-antibody (×1) به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس چاهک‌ها خالی شده و ۳ بار با استفاده از محلول PBS(Phosphate Buffered Saline) شستشو داده شدند. در ادامه ۱۰۰ میکرولیتر HRP-avidin (×1) به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه

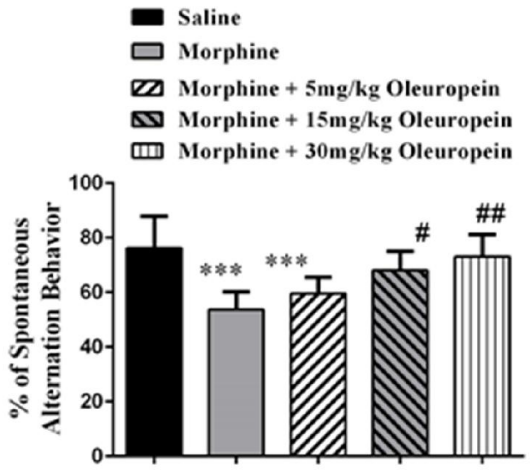
[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

شدند. مجددا چاهک‌ها خالی شده و ۵ بار با استفاده از محلول PBS شستشو داده شدند. پس از آن ۹۰ میکرولیتر از سوبسترا TMB (Tetramethylbenzidine) به هر چاهک اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (در تاریکی) انکوبه شدند. در پایان ۵۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه شد و جذب نور (OD) نمونه‌ها در مدت ۵ دقیقه با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Hyperion، MPR4++، آمریکا) و در طول موج ۴۵۰nm مورد ارزیابی قرار گرفت [۶].

برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد. از آزمون Shapiro – wilk برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. داده‌ها به صورت "انحراف معیار ± میانگین" گزارش شد. تساوی واریانس‌ها با استفاده از آزمون Levene's ارزیابی شد. با توجه به طبیعی بودن داده‌ها (P-value بیش‌تر از "۰/۰۵")، برای مقایسه تأثیر غلظت‌های مختلف اولئوروپیین بر داده‌های رفتاری و مولکولی در گروه-های مختلف آزمایشی از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبیTukey استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

داده‌های این مطالعه نشان داد که تیمار مزمن حیوانات با مورفین باعث کاهش درصد تناوب نسبت به گروه سالین می‌شود (P<۰/۰۰۱). علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز همزمان اولئوروپیین (۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به حیوانات تیمار شده با مورفین باعث بهبود رفتار تناوبی در این گروه‌های آزمایشی می‌شود (به ترتیب P<۰/۰۵ و P<۰/۰۱)، به طوری که تفاوت معنی‌داری میان این گروه‌ها با گروه سالین مشاهده شد. لازم به ذکر است که تجویز اولئوروپیین با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم تأثیری در رفتار تناوب حیوانات وابسته به مورفین نداشت (P>۰/۰۵).

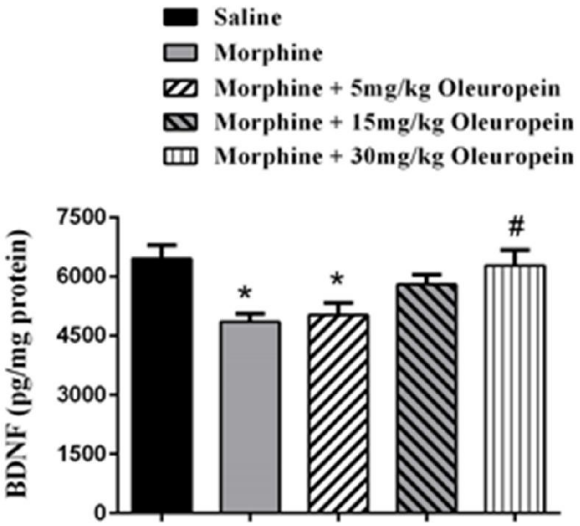


نمودار ۱- تأثیر مورفین و اولئوروپیین بر میزان درصد رفتار تناوبی در ماز Y شکل. داده‌ها به‌صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر بود. از تست ANOVA یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey برای مقایسه مقادیر به‌دست آمده از گروه‌های مختلف آزمایشی استفاده شد. ***P<۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه سالین. #P<۰/۰۵۰ و ##P<۰/۰۱۰ اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه مورفین.

بیان پروتئین BDNF هیپوکمپ به روش تشخیص الایزا انجام شد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، تیمار مزمن حیوانات با مورفین باعث کاهش بیان پروتئین BDNF بافت هیپوکمپ حیوانات در گروه دریافت کننده مورفین در مقایسه با گروه سالین شد (p=۰/۰۳۲). هم‌چنین تجویز همزمان اولئوروپیین (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به حیوانات تیمار شده با مورفین باعث افزایش بیان پروتئین BDNF بافت هیپوکمپ حیوانات تیمار با مورفین که همزمان

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

اولئوروپیین را دریافت کردند، در مقایسه با گروه سالین شد (P<۰/۰۵۰).



شکل ۲- تأثیر مورفین و اولئوروپیین بر میزان بیان پروتئین BDNF بافت هیپوکمپ مغز. داده‌ها به‌صورت انحراف معیار ± میانگین نشان داده شده اند. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر بود. از تست ANOVA یک‌طرفه و تست تعقیبی Tukey برای مقایسه مقادیر به‌دست آمده از گروه‌های مختلف آزمایشی استفاده شد. تعداد حیوانات در هر گروه ۸ سر بود. *P<۰/۰۵۰ اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه سالین. #P<۰/۰۵۰اختلاف معنی‌داری در مقایسه با گروه مورفین.

بحث

مطالعه حاضر با هدف تعیین اثر اولئوروپیین بر تغییر سطح بیان پروتئین BDNF بافت هیپوکمپ و نقص حافظه کاری القاء شده با مورفین در موش‌های صحرایی نر انجام شد. یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با مورفین منجر به ایجاد اختلال در حافظه کاری در حیوانات تحت تیمار با آن می‌شود. در راستای مطالعه حاضر، مطالعات قبلی نشان داده‌اند که حیوانات تحت درمان با مورفین دارای اختلال حافظه هستند. اگرچه مکانیسم‌هایی که اثرات مخرب مورفین بر حافظه را تحت تأثیر قرار می‌دهد هنوز کاملاً شناخته نشده‌اند، اما پیشنهاد شده است که تجویز مورفین از طریق نقص در عملکرد هیپوکمپ و سایر نواحی مغز که مرتبط با عملکرد حافظه می‌باشند تاثیر مخرب خود را اعمال می‌کند [۶]. علاوه بر این، Farahmandfar و همکاران نشان دادند که تیمار موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با مورفین به صورت حاد، حافظه و یادگیری فضایی مربوط به هیپوکمپ را می‌تواند به طور چشم‌گیری دچار اختلال کند [۱۷]. هم‌چنین Motaghinejad و همکاران نشان دادند که تیمار موش‌های صحرایی نر به مدت ۴ هفته با دوز ۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم مورفین باعث می‌شود که میزان استرس اکسیداتیو در بافت هیپوکمپ افزایش یابد و اختلال حافظه به وجود آید [۱۸].

علاوه بر این، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار با مورفین منجر به کاهش بیان پروتئین BDNF در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی می‌شود. BDNF در فرآیند شکل پذیری سیناپسی و هم‌چنین یادگیری و حافظه بسیار مهم می‌باشد. در راستای مطالعه ما، Heldt و همکاران نشان

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

دادند که نقص در تولید BDNF در هیپوکپ موش‌های آزمایشگاهی باعث می‌شود تا فرآیند حافظه این حیوانات در تست‌های رفتاری به شدت کاهش یابد [۱۹]. از طرف دیگر، Heldt و همکاران نشان دادند که تیمار مزمن موش‌های صحرایی نر با مورفین با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث کاهش حافظه فضایی نسبت به موش‌های کنترل می‌شود. آنان هم‌چنین نشان دادند که این کاهش حافظه همراه با کاهش سطح پروتئین BDNF در حیوانات تیمار شده با مورفین می‌باشد. آنان این گونه نتیجه گرفتند که تیمار مزمن مورفین احتمالاً با کاهش سطح پروتئین BDNF بافت هیپوکمپ مغز که جزء ضروری برای یادگیری و حافظه ضروری در سیستم عصبی مرکزی است، گردیده است [۱۹].

در مطالعه حاضر در بررسی حافظه کاری با استفاده از آزمون ماز Y-شکل مشخص شد که تعداد کل ورودی‌ها و درصد رفتار تناوبی در گروه‌های تحت درمان با اولئوروپیین (۱۵ و ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیش‌تر از گروه‌های دریافت کننده مورفین بود، به طوری که اولئوروپیین باعث بهبود حافظه کاری در این حیوانات شده است. موافق با مطالعه حاضر، Alirezaei و همکاران نشان دادند که پیش درمان موش‌های صحرایی با دوز ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم پلی‌فنل اولئوروپیین باعث کاهش استرس اکسیداتیو و هم‌چنین افزایش تقویت حافظه و یادگیری در موش‌های تیمار شده با داروهای بی‌هوشی می شود [۲۰]. علاوه بر این، Pantano و همکاران گزارش کردند که موش‌هایی که با دوز ۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم اولئوروپیین (به مدت ۸ هفته) تیمار شده بودند، پلاک‌های آمیلوئید بتا کم‌تری در بافت پره فورنتال و هم‌چنین بافت هیپوکمپ در موش‌های صحرایی مدل آلزایمر بودند. هم‌چنین حیوانات گروه تیمار شده با اولئوروپیین نسبت به گروه‌های تیمار نشده، توانایی شناختی بالاتری در تست‌های رفتاری بررسی حافظه‌ای داشتند [۲۱]. هم‌چنین نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که تجویز همزمان اولئوروپیین (۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به حیوانات تیمار شده با مورفین باعث افزایش بیان پروتئین BDNF بافت هیپوکمپ حیوانات تیمار با مورفین که همزمان اولئوروپیین را دریافت کردند، می‌شود که این نتایج نشان دهنده اثرات محافظت کننده سیستم عصبی این ماده می‌باشد. در راستای مطالعه ما، Carito و همکاران نشان دادند که تیمار موش‌های آزمایشگاهی نر با ترکیبی از پلی‌فنل‌های موجود در برگ زیتون که حاوی مقدار زیادی پلی‌فنول اولئوروپیین است، باعث افزایش سطح BDNF در سرم و بافت هیپوکمپ این حیوانات شد [۲۲]. مطالعه حاضر هر چند توانست تاحدودی تأثیر مثبت ماده اولئوروپیین را در موش‌های صحرایی تیمار شده با مورفین نشان دهد. با این حال با توجه به نتایج به دست آمده در این زمینه، نیاز به تحقیقات بیش‌تر احساس می‌شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، سایر مسیرهای سیگنالیگ نشان دهنده اثرات این ماده در موش‌های صحرایی تیمار شده با مورفین نیز بررسی گردد.

نتیجه‌گیری

داده‌های به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که تجویز اولئوروپیین به موش‌های تیمار شده با مورفین باعث بهبود نقص حافظه در آن‌ها می‌شود. هم‌چنین این داده‌ها نشان دادند که این تأثیر تا حدودی مربوط به افزایش میزان بیان پروتئین

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

BDNF در بافت هیپوکمپ موش‌های صحرایی تیمار شده با مورفین بوده است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان و از محل طرح شماره ۹۶۱۰۰ انجام شده است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه اعلام می‌نمایند.

References

[1] ZhangY, Loh HH, Law PY. Effect of opioid on adult hippocampal neurogenesis. *Sci World J* 2016 Jan 1; 2016.

[2] Rezayof A, Zatali H, Haeri-Rohani A, Zarrindast MR. Dorsal hippocampal muscarinic and nicotinic receptors are involved in mediating morphine reward. *Behav Brain Res* 2006; 166(2): 281-90.

[3] Eisch AJ, Harburg GC. Opiates, psychostimulants, and adult hippocampal neurogenesis: Insights for addiction and stem cell biology. *Hippocampus* 2006; 16(3): 271-86.

[4] Atici S, Cinel L, Cinel I, Doruk N, Aktekin M, Akca, et al. Opioid neurotoxicity: comparison of morphine and tramadol in an experimental rat model. *International J Neurosci* 2004; 114(8): 1001-11.

[5] Nestler EJ, Lüscher C. The molecular basis of drug addiction: linking epigenetic to synaptic and circuit mechanisms. *Neuron* 2019; 102(1): 48-59.

[6] Shibani F, Sahamsizadeh A, Fatemi I, Allahtavakoli M, Hasanshahi J, Rahmani, et al. Effect of oleuropein on morphine-induced hippocampus neurotoxicity and memory impairments in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacol* 2019; 392(11): 1383-91.

[7] Warner K, Neff WE, Eller FJ. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with γ-tocopherol. *J Agricultural Food Chem* 2003; 51(3): 623-7.

[8] Kaeidi A, Rahmani M, Hassanshahi J. The Protective Effect of Carvacrol and Thymol as Main Polyphenolic Compounds of Thyme on Some Biologic Systems in Disease Condition: A Narrative Review. *J Rafsanjan Unive Med Sci* 2020; 19(1): 81-96.

[9] Soler-Rivas C, Espín JC, Wichers HJ. Oleuropein and related compounds. *J Sci Food Agriculture* 2000; 80(7): 1013-23.

[10] Omar SH. Oleuropein in olive and its pharmacological effects. *Scientia Pharmaceutica* 2010; 78(2): 133.

[11] Kremastinos DT. Olive and oleuropein. *Hellenic J Cardiol* 2008; 49(4): 295-96.

[12] Jemai H, El Feki A, Sayadi S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agricultural Food Chem* 2009; 57 (19): 8798-804.

[13] Kaeidi A, Sahamsizadeh A, Allahtavakoli M, Fatemi I, Rahmani M, Hakimizadeh E, et al. The effect of oleuropein on unilateral ureteral obstruction induced-kidney injury in rats: the role of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Molecular Biol Reports* 2020; 47(2): 1371-9.

[14] Al-Azzawie HF, Alhamdani M.SS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci* 2006; 78(12): 1371-7.

[15] Elfving B, Plougmann PH, Wegener G, Detection of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rat blood and brain preparations using ELISA: pitfalls and solutions. *J Neurosci Methods* 2010. 187(1): p. 73-7.

[16] Hughes RN. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. *Neurosci Biobehav Rev* 2004. 28(5): p. 497-505.

[17] Farahmandfar M, Kadivar M, Naghdi N. Possible interaction of hippocampal nitric oxide and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II on reversal of spatial memory impairment induced by morphine. *European Journal of Pharmacology* 2015. 751: p. 99-111.

[18] Motaghinejad M, Karimian M, Motaghinejad O, Shabab B, Yazdani I, Fatima S. Protective effects of various dosage of Curcumin against morphine induced apoptosis and oxidative stress in rat isolated hippocampus. *Pharmacological Reports* 2015; 67(2): p. 230-5.

[19] Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ. Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Molecular Psychiatry* 2007; 12(7): p. 656.

[20] Alirezaei M, Rezaei M, Hajighahramani S, Sookhtehzari A, Kiani K. Oleuropein attenuates cognitive dysfunction and oxidative stress induced by some anesthetic drugs in the hippocampal area of rats. *The Journal of Physiological Sciences* 2017. 67(1): p. 131-139.

[21] Pantano D, Luccarini I, Nardiello P, Servili M, Stefani M, Casamenti F. Oleuropein aglycone and polyphenols from olive mill waste water ameliorate cognitive deficits and neuropathology. *British Journal of Clinical Pharmacology* 2017; 83(1): p. 54-62.

[22] Carito, Valentina, Alessandro Venditti, Armandodoriano Bianco, Mauro Ceccanti, Anna Maria Serrilli, et al. Effects of olive leaf polyphenols on male mouse brain NGF, BDNF and their receptors TrkA, TrkB and p75. *Natural Product Research* 2014; 28(22): p: 1970-84.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]

The Oleuropein Effect on Neurotrophic Factor Expression Level in Hippocampal Tissue and Memory Defect Induced by Morphine in Male Rats: An Experimental Study

J. Hassanshahi[1], M. R. Rahmani[2], F. Shibani[3], A. Kaeidi[4]

Received: 28/04/2020 Sent for Revision: 09/05/2020 Received Revised Manuscript: 16/11/2020 Accepted: 17/11/2020

Background and Objectives: Taking morphine can cause damage to the hippocampus. Oleuropein has a protective effect on brain neurons. The aim of this study was to determine the effect of oleuropein on brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein expression level in hippocampal tissue and memory defect induced by morphine in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 40 male Wistar rats were used. The animals were divided into five groups (n=8) including control/saline group (receiving saline intraperitoneally for four weeks), morphine group (receiving 40 mg/kg morphine daily subcutaneously for four weeks) and morphine + Oleuropein groups (receiving doses of 5, 15, and 30 mg/kg oleuropein + morphine by intraperitoneal injection for 4 weeks). At the end, the animals' working memory was evaluated using the Y-maze behavior measurement test. The hippocampal BDNF protein expression level was measured using the ELISA method. One-way ANOVA test with Tukey's post-test was used to analyze the data.

Results: Intraperitoneal injection of oleuropein at a dose of 30 mg/kg in the rats receiving morphine significantly improved the memory function ($p<0.01$) and increased the BDNF protein expression level ($p<0.05$) compared to the morphine treated groups.

Conclusion: Oleuropein may increase the BDNF protein expression level in the hippocampal tissue and improves the memory defect induced by morphine in rats.

Key words: Morphine, Oleuropein, Working memory, Y-maze test, BDNF protein

Funding: This research was funded by Rafsanjan University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Rafsanjan University of Medical Sciences approved the study (IR.RUMS.REC.1395.103).

How to cite this article: Hassanshahi J, Rahmani M R, Shibani F, Kaeidi A. The Oleuropein Effect on Neurotrophic Factor Expression Level in Hippocampal Tissue and Memory Defect Induced by Morphine in Male Rats: An Experimental Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2020; 19 (9): 969-78. [Farsi]

1- Assistant Prof., Dept. of Physiology and Pharmacology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
Assistant Prof., Physiology-Pharmacology Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, ORCID: 0000-0003-3754-8152.
2- MSc in Physiology, Dept. of Physiology and Pharmacology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran ORCID: 0000-0001-7395-5770
3- Assistant Prof., Physiology-Pharmacology Research Center, Research Institute of Basic Medical Sciences, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran, ORCID: 0000-0002-2602-8058
4- Assistant Prof., Dept. of Physiology and Pharmacology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran ORCID: 0000-0002-3292-2603
(Corresponding Author) Tel: (034) 31315074, Fax: (034) 31315003, E-mail: a.kayedi@gmail.com

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-29]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1399.19.9.3.2]
[DOI: 10.29252/jrums.19.9.969]