بررسی اثرات فراکسیون‌های اندام‌های هوایی گیاه رزماری طبی (*Rosmarinus officinalis* L.) بر سندرم محرومیت ناشی از مرفین در موش سوری

حسین حسین‌زاده[1*]، محمد رمضانی[2]، شبنم شاهسوند[3]

۱- استاد، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکدهٔ بوعلی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی علوم دارویی و دانشکده داروسازی مشهد

۳- داروساز

*آدرس مکاتبه: مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق‌پستی: ۹۱۷۷۵ - ۱۳٦۵

تلفن: ۸۸۲۳۲۵۲ (۰۵۱۱)، نمابر: ۸۸۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)

پست الکترونیک: hosseinzadehh@mums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۳/٤/۸ **تاریخ تصویب:** ۸٤/۷/۲٤

چکیده

مقدمه: تحقیقات قبلی ما نشان داد که سندروم محرومیت به مورفین توسط عصاره‌های تام آبی و الکلی رزماری مهار می‌شود.

هدف: با توجه به تداخل عصارهٔ تام گیاه رزماری طبی با سیستم اپیوییدی اثرات فراکسیون‌های عصارهٔ این گیاه بر روی علایم سندرم محرومیت به مورفین بررسی شد.

روش بررسی: برای ایجاد اعتیاد در موش‌ها، حیوانات تحت سه بار تزریق زیرجلدی مرفین در روز (۵۰ mg/kg، ۵۰ mg/kg و ۷۵ mg/kg) به مدت سه روز قرار گرفتند و آخرین تزریق مرفین در روز چهارم دو ساعت قبل از تزریق نالوکسان صورت گرفت. تعداد پرش‌ها در مدت ۳۰ دقیقه به عنوان شدت سندرم محرومیت در نظر گرفته شد.

نتایج: تزریق عصارهٔ تام آبی، فراکسیون آبی – متانولی و کلروفرمی با دوز ۱/٦۸ و ۰/۹٦ گرم بر کیلوگرم و کنترل‌های مثبت کلونیدین (۰/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و دیازپام (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به صورت داخل صفاقی یک ساعت قبل از آخرین دوز مرفین باعث کاهش تعداد پرش‌ها نسبت به گروه کنترل منفی گردید. دو فراکسیون قابل ارزیابی ناشی از دستگاه MPLC با دوز ۰/۹٦ گرم بر کیلوگرم باعث کاهش تعداد پرش در مقایسه با گروه کنترل شدند. همچنین به منظور تکمیل آزمایش‌ها، آزمون حرکت جهت هر دو فراکسیون بر روی موش‌ها انجام شد. بر این اساس مشخص گردید که فراکسیون شماره ۱ و کلونیدین در مقایسه با گروه کنترل باعث کاهش فعالیت حرکتی شد اما اثر فراکسیون شماره ۲ تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل نشان نداد.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان می‌دهد که احتمالاً فراکسیون شماره ۱ عصارهٔ گیاه رزماری طبی به علت کاهش در میزان حرکت باعث کاهش علایم سندرم محرومیت گردیده، اما اثر فراکسیون شماره ۲ بر کاهش تعداد پرش احتمالاً مربوط به تداخل با سیستم اپیوئیدی است.

گل‌واژگان: رزماری طبی، فراکسیون، سندرم محرومیت، مرفین، سیستم اپیوییدی

مقدمه

رزماری طبی[1] گیاهی است از خانواده نعناع[2] که به صورت درختچه‌های کوچک با دوام و دارای برگ‌های معطر و گل‌های کوچک آبی رنگ است. در ابتدای بهار و انتهای زمستان شکوفه می‌دهد. ارتفاع آن ۵۰ سانتی‌متر الی ۱ متر است. ساقه‌های آن چوبی بوده، برگ‌های این گیاه سبز دایمی، متقابل، با کناره‌های برگشته باریک و دراز، نوک تیز و نسبتاً خشن هستند [۱].

این گیاه حاوی اسانس، اولئورزین و تانن است. اسانس رزماری شامل ۱ و ۸ سینئول، پینن، کامفر، بورنیل استات، کامفن، لینالول، D – لیمونن، بورنئول، میرسن، ترپینئول، کاریوفیلن و رزمارن است. دیگر مواد موجود در این گیاه اسید کارنوزیک، کارنوزول، کریپتوتانشینون[3] اپی – α آمیرین، اپی رزمانول، ایزورزمانول، نپی ترین[4]، رمادیال[5] و اسید رزمارینیک هستند. به طوری که برگ‌ها حاوی ۲/۵ – ۰/۵ درصد روغن فرار هستند. ماده اصلی روغن شامل هیدروکربن‌های مونوترپنه (α و β) پینن، کامفن، لیمونن، کامفر (۲۰ – ۱۰ درصد)، بونئول، سینول، لینالول و وربونیل است. رزماری در واقع شامل مقادیر متغیری از مواد آروماتیک و فرار است. فلاونوییدها شامل دیوسمتین[6]، دیوسمین[7]، ژنکوآنین[8]، لوتئولین[9]، هیسپیدولین[10] و آپی‌ژنین[11] هستند. سایر ترپنوییدهای یافته شده در رزماری شامل تری‌ترپنوییدهای اولئانولیک اسیدها[12] و اورسولیک اسیدها[13] و دی‌ترپن کارنوزول است. فنل‌ها در رزماری شامل کافئیک، کلروژنیک، لابیاتیک، نئوکلروژنیک و رزمارینیک اسید هستند. رزماری حاوی مقادیر زیادی از سالیسیلات‌ها است [۱،۲،۳،٤].

در طب سنتی از این گیاه جهت اثرات ضد آسم، هضم‌کننده غذا، آرام‌بخش، برطرف کننده سردرد [۵]، اختلالات گردش خون، افزایش قدرت بینایی، ضد رماتیسم [٦] و محرک حافظه [۷] استفاده می‌شود.

اثرات فارماکولوژیکی متعددی از جمله اثر آنتی‌اکسیدانتی [۸] تحریک فاکتور رشد عصبی [۹]، فعالیت ضدمیکروبی و ضد ویروسی [۲] و مهار سمیت کبدی [۱۰] برای این گیاه گزارش شده است.

با توجه به مهار سندروم محرومیت به مورفین توسط عصاره‌های تام آبی و الکلی رزماری [۱۱]، در این تحقیق اثرات فراکسیون‌های این گیاه بر روی سندروم محرومیت بررسی شد.

مواد و روش‌ها

حیوان:

موش سفید نر با وزن ۲/۵ ± ۲۵ گرم از آزمایشگاه فارماکولوژی دانشکده داروسازی مشهد (اتاق حیوانات) تهیه شد. حیوانات در شرایط ۱۲/۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی در دمای ۲ ± ۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتاق حیوانات دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد نگهداری شدند. در تمام آزمایش‌ها، اصول اخلاقی رفتار با حیوانات رعایت گردید.

گیاه:

گیاه رزماری طبی در مرداد ماه ۱۳۸۱ توسط آقای مهندس آهی از باغچه گیاهان دارویی دانشکده داروسازی مشهد (با شماره هرباریومی گیاه رزماری طبی [٠٦ – ۱۸۱۵ – ۱۵۳]) جمع‌آوری شد. گیاه مزبور در سایه خشک و برای برقراری تهویه مناسب حدوداً یک هفته زیر و رو گردید. سپس برگ‌ها و سرشاخه‌های گیاه از سایر قسمت‌های گیاه جدا شد و به وسیله دستگاه خرد کن در آزمایشگاه مفردات پزشکی دانشکده داروسازی تا حد ذرات ریز پودر گردید.

تهیه عصاره آبی

در ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم پودر توزین شده را درون یک بشر ۲۰۰۰ سی‌سی ریخته و سپس آب مقطر جوش به میزان کافی و به طوری که وقتی به آرامی روی پودر بریزیم حدود ۲ سانتی‌متر بالای سطح پودر باشد، اضافه گردید؛ و به مدت ۱۵ دقیقه

---

[1] *Rosmarinus officinalis* L.
[2] Lamiaceae
[3] Cryptotanshinone
[4] Nepitrin
[5] Romadial
[6] Diosmetin
[7] Diosmin
[8] Genkwanin
[9] Luteolin
[10] Hispidulin
[11] Apigenin
[12] Oleanolic acids
[13] Ursolic acids

جوشانیده شد، سپس در چهار مرحله ابتدا با پارچه بعد با پنبه سپس با کاغذ صافی ساده و در آخر دو مرحله با کاغذ صافی واتمن صاف شد. عصاره آبی حاصله در دستگاه تبخیر حلال کاهش حجم یافت و بعد به پلیت منتقل شده و روی بن ماری خشک گردید. سپس غلظت‌های مورد نظر به وسیله نرمال سالین ساخته شد.

تهیه فراکسیون آبی - متانولی (۱:۳) و کلروفرمی:

پس از تهیه جوشانده آبی و حذف حلال این عصاره خشک شده در مخلوط آب و متانول با نسبت ۲ به ۳ سوسپانسیون شد. مخلوط حاصله ناهمگن بوده و حالت امولسیونی داشت. سپس در طی ۳ مرحله استخراج با کلروفرم از این مخلوط صورت گرفت و فراکسیون‌های آبی – متانولی و کلروفرمی جداگانه حذف حلال شده و غلظت‌های مورد نظر به وسیله نرمال سالین توئین‌دار (۳ قطره توئین ۸۰ در ۱۰ سی‌سی نرمال سالین) ساخته شد.

تهیه فراکسیون از عصاره کلروفرمی:

فراکسیون کلروفرمی که از روش قبل حاصل شد، پس از آزمایش و انتخاب شدن به عنوان عصاره موثرتر جدا شد. به این شکل که ابتدا مقدار کمی از هر دو فراکسیون آب – متانولی و کلروفرمی در متانول حل شد و روی پلیت کروماتوگرافی نمونه‌گذاری شد و در تانک کروماتوگرافی حاوی کلروفرم خالص که محیط تانک را به مدت ۱۵ دقیقه اشباع کرده بود قرار گرفت. از آنجا که پیشروی فراکسیون کلروفرمی نامناسب بود، یعنی مقداری از آن در نقطه شروع ماند، از حامل کلروفرم به علاوه ۵ درصد متانول استفاده شد. این بار فراکسیون کلروفرمی به خوبی جدا شده و در نقطه شروع باقی نماند در نتیجه این سیستم حلال جهت جداسازی و تهیه فراکسیون از فراکسیون کلروفرمی به روش MPLC مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی به روش کروماتوگرافی با فشار متوسط[1]

ابتدا ستون پرشده توسط سیلیکاژل (μm ۴۰ – ۱۵) به مدت یک ساعت و با ۳۰۰ سی‌سی متانول ۹۹/۹ درصد و بعد نیم ساعت با کلروفرم به میزان ۱۵۰ سی‌سی شستشو شد. سپس ۱/۵ گرم فراکسیون کلروفرمی در ۳ سی‌سی کلروفرم حل شد و بر روی ستون ریخته شد. مقداری از عصاره که حل نشده بود در ۲ سی‌سی متانول حل شده و بروی ستون ریخته شد، سپس کلروفرم با سرعت ۵ سی‌سی در دقیقه وارد ستون شد. در لوله‌های آزمایش فراکسیون‌هایی با حجم ۲۰ سی‌سی جمع‌آوری گردید. جمع‌آوری حجم‌ها از دو لوله قبل از خروج اولین حامل رنگی (در مقایسه با شاهد کلروفرم) و با توجه به پیش روی تغییر رنگ در ستون انجام شد. پس از آنکه دیگر حامل رنگی خارج نشد (۲ لوله بعد) از حلال کلروفرم حاوی ۵ درصد متانول به عنوان سیستم حلال استفاده گردید و پس از مصرف ۲۴۰ سی‌سی حلال، سیستم حلال‌های کلروفرم حاوی ۱۰ درصد متانول و کلروفرم حاوی ۱۵ درصد متانول به ترتیب با حجم‌های ۱۴۰ سی‌سی و ۱۶۰ سی‌سی وارد ستون شدند. محتویات لوله‌ها در دمای ۳۰ درجه روی بن ماری به مدت ۱ روز تبخیر حلال شد. سپس از نمونه‌ها که ۳۳ عدد بودند روی پلیت کروماتوگرافی نمونه‌گذاری شد و در تانک حاوی کلروفرم به علاوه ۵ درصد متانول قرار داده شد. با توجه به R_f فراکسیون‌ها، فراکسیون‌های مشابه مخلوط شده و ۷ فراکسیون حاصل شد. سپس فراکسیون ۱ تا ۳ در روی پلیت نمونه‌گذاری شد و فراکسیون ٤ تا ۷ هم روی پلیت دیگری نمونه‌گذاری شد، پلیت اول در تانک حاوی کلروفرم به علاوه متانول به میزان ۲ درصد و پلیت دوم در تانک حاوی کلروفرم به علاوه متانول به میزان ۵ درصد قرار گرفت. محل نمونه‌گذاری و پیش روی حامل در دو پلیت به طور یکسان انتخاب شد تا در عین متفاوت بودن حامل‌ها، نتیجه پیش روی لکه‌ها در روی دو پلیت حتی‌الامکان قابل مقایسه باشد پس از مشاهده لکه‌ها با توجه به آنکه هر ۷ فراکسیون با هم متفاوت بودند به جز فراکسیون ٦ و ۵ که تقریباً مشابه هستند فراکسیون‌ها به طور جداگانه تبخیر حلال شده و توزین گردیدند. با توجه به وزن فراکسیون‌ها، فراکسیون ۱ و ۲ جهت ایجاد غلظت مورد نظر جهت آزمون سندرم محرومیت مناسب در نظر گرفته شد و آزمایش روی آنها انجام گرفت. جهت تهیه غلظت‌ها از نرمال‌سالین توئین‌دار استفاده شد.

[1] Medium Pressure Liquid Chromatography

استفاده از معرف لیبرمن بوشارد[1] جهت تعیین وجود یا عدم وجود ترپنویید در فراکسیون‌ها [۱۲]

طرز ساخت معرف لیبرمن بوشارد: ۲ گرم ید به کمک ۲ گرم یدروپتاسیم در آب مقطر حل گردید و تا حجم ۱۰۰ سی‌سی رقیق شد.

از هر ۷ فراکسیون به دست آمده بر روی یک پلیت نمونه‌گذاری شد، سپس در تانک حاوی کلروفرم به علاوه متانول به میزان ۵ درصد قرار داده شد و پس از پیشروی نمونه به وسیله اسپری حاوی معرف لیبرمن بوشارد رنگ‌آمیزی گردید. ظهور رنگ بنفش به عنوان عامل معرف وجود ترپنویید در نظر گرفته شد.

ایجاد وابستگی در موش‌های سوری [۱۳]

برای ایجاد وابستگی گروه‌هایی شامل ٦ حیوان درنظر گرفته شد، موش‌ها روزانه و به مدت سه روز ۳ دوز مرفین ۵۰، ۵۰ و ۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت تزریقات زیرجلدی در ساعت ۸ صبح، ۱۱ صبح و ۳ بعدازظهر دریافت داشتند و دوز آخر مرفین، ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را روز چهارم دریافت کردند.

بررسی اثر عصاره‌ها و فراکسیون‌ها بر سندرم محرومیت ناشی از مرفین در موش‌های سوری

به موش‌های وابسته شده در روز چهارم یک ساعت قبل از تجویز آخرین دوز مرفین عصاره یا فراکسیون تزریق گردید.

پس از دو ساعت از آخرین دوز مرفین، نالوکسان با غلظت ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت زیرجلدی تزریق شد و موش‌ها تک‌تک به زیر بشر ۲۰۰۰ منتقل شده و پس از یک دقیقه، شمارش پرش‌ها به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت.

به عنوان شاهد منفی برای گروه‌های عصاره آبی از نرمال سالین با دوز cc/kg ۱۰ و برای شاهد مثبت از دیازپام با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم یا کلونیدین با دوز ۰/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم [١٤] استفاده گردید.

به عنوان شاهد منفی برای گروه‌های فراکسیون آبی – متانولی و کلروفرمی از نرمال سالین توئین‌دار با دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (نرمال سالین با افزایش ۳ قطره توئین در ۱۰ سی‌سی) و به عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

تعیین فعالیت حرکتی [۱۵]

آزمون جعبه باز

پس از تزریق ماده مورد بررسی این آزمون در اتاقی که شرایط اتاق نگهداری حیوانات را داشت در محفظه‌ای چوبی به طولهای ۱۰۰ × ۱۰۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر که با رنگ سفید پوشیده شده بود انجام شد. داخل محفظه چوبی با خط‌های قرمز رنگ به ۲۵ خانه تقسیم شده بود که هر خانه ۲۰ × ۲۰ سانتی‌متری بود. حیوانات در زمان مقرر در خانه مرکزی قرار داده می‌شدند و اعمال آنها به مدت ۱۰ دقیقه پس از ۱ ساعت از تزریق مواد بررسی شد.

اعمال مورد بررسی شامل موارد زیر بود:

تعداد ایستادن حیوان با تکیه به دیوار، ایستادن روی دوپا، لیسیدن دست و پا، فضله و تعداد دفعاتی که حیوان در ۹ خانه مرکزی و ١٦ خانه محیطی قرار می‌گرفت. تعداد دفعاتی نیز که حیوان در کل خانه‌های جدول قرار می‌گرفت، شمارش می‌شد.

متغییرهای مورد بررسی:

Locomotion: که به سه قسمت مرکزی[1]، محیطی[2]، کلی[3] تقسیم شد. که مجموعه حرکت در قسمت مرکزی (خانه‌های دور خانه مرکز) و مجموعه حرکت در قسمت محیطی(خانه‌های پایه دیواره جعبه) شمارش شد.

Grooming: حیوان خود را می‌لیسد و تمیز می‌کند؛

Rearing: حیوان بر روی دو پای خود می‌ایستد؛

Leaning: حیوان خود را به دیواره متصل می‌کند؛

Defecation: تعداد فضله‌های حیوان.

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌ها به صورت میانگین ± خطای معیار گزارش شده است. پس از انجام ANOVA، و در صورت معنی‌دار بودن آن

[1] Liberman-Buchard

[1] Central [2] Peripheral
[3] Total

از آزمون Tukey – Kramer استفاده شد. نتایج با $p< ۰/۰۵$ به عنوان معنی‌دار درنظر گرفته شد.

نتایج

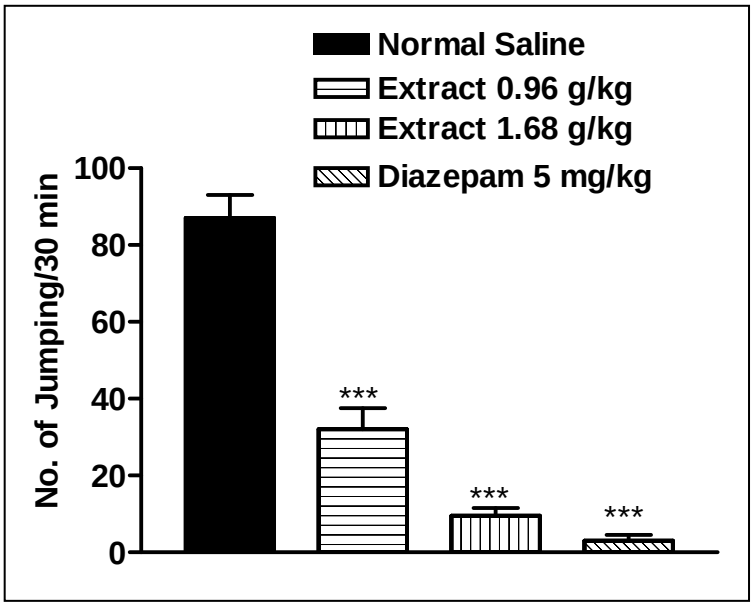
از هر ۱۰۰ گرم پودر آسیاب شده خشک گیاه رزماری طبی ۱۲ گرم عصاره تام آبی حاصل از جوشاندن، ۱۰/۵ گرم فراکسیون آب – متانولی (۳:۲) و ۰/۹۲ گرم فراکسیون کلروفرمی حاصل گردید.

عصاره آبی حاصل از جوشاندن گیاه رزماری طبی در دو دوز ۱/٦۸ گرم بر کیلوگرم و ۰/۹٦ گرم بر کیلوگرم باعث کاهش تعداد پرش‌ها نسبت به گروه کنترل گردید. دوز ۱/٦۸ گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل مثبت، دیازپام، نداشت (شکل شماره ۱). فراکسیون‌های آبی – متانولی (۳:۲) و کلروفرمی هر دو به صورت وابسته به دوز در دو غلظت مذکور باعث کاهش تعداد پرش‌ها نسبت به گروه کنترل منفی شدند. فراکسیون کلروفرمی با دوز ۱/٦۸ گرم بر کیلوگرم از بقیه موثرتر بود (شکل شماره ۲).

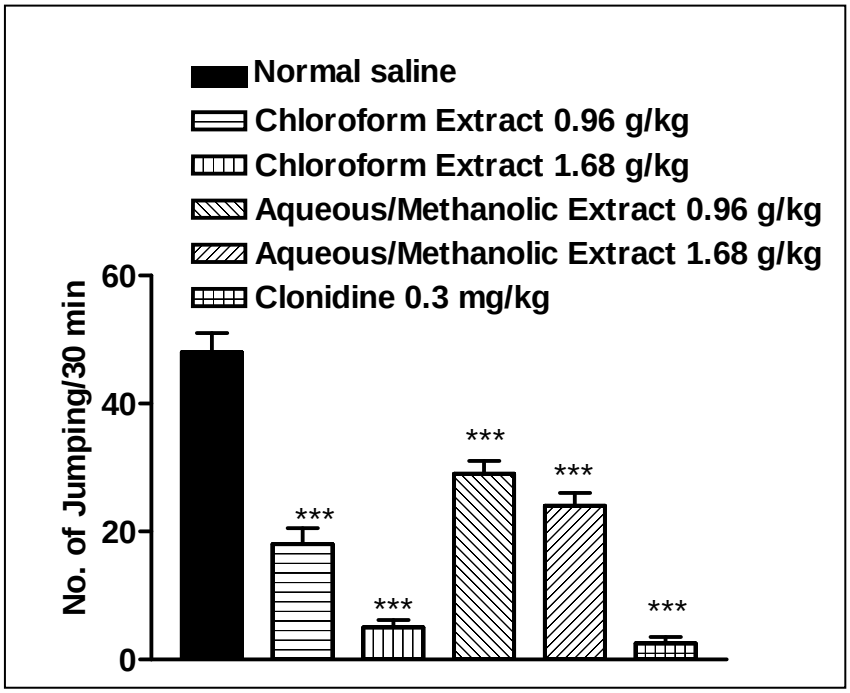
سپس به وسیله دستگاه MPLC جداسازی بیشتر فراکسیون کلروفرمی صورت گرفت که از میان فراکسیون‌های حاصله بر روی دو فراکسیون آزمایش انجام شد که هر دو با دوز ۰/۹٦ گرم بر کیلوگرم باعث کاهش تعداد پرش‌ها شدند البته فراکسیون شماره ۱ موثرتر بود (شکل شماره ۳).

جهت هر دو فراکسیون آزمون حرکت انجام شد که مشخص گردید فراکسیون شماره ۱ و کنترل مثبت کلونیدین باعث کاهش فاکتورهای حرکتی شد اما فراکسیون شماره ۲ بر این فاکتورها موثر نبود (شکل شماره ٤). هر دو فراکسیون و کلونیدین فاکتورها استرئوتایپی را کاهش دادند (شکل شماره ۵).

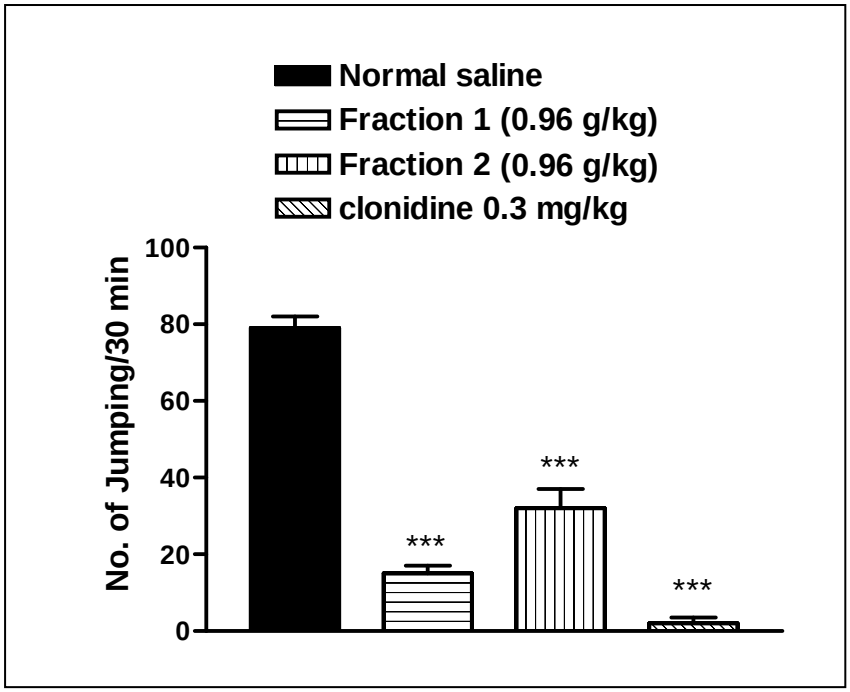
رنگ بنفش در لکه‌های مربوط به فراکسیون ۲ (با Rf=0.84) موید وجود ترپنویید در این فراکسیون بود.



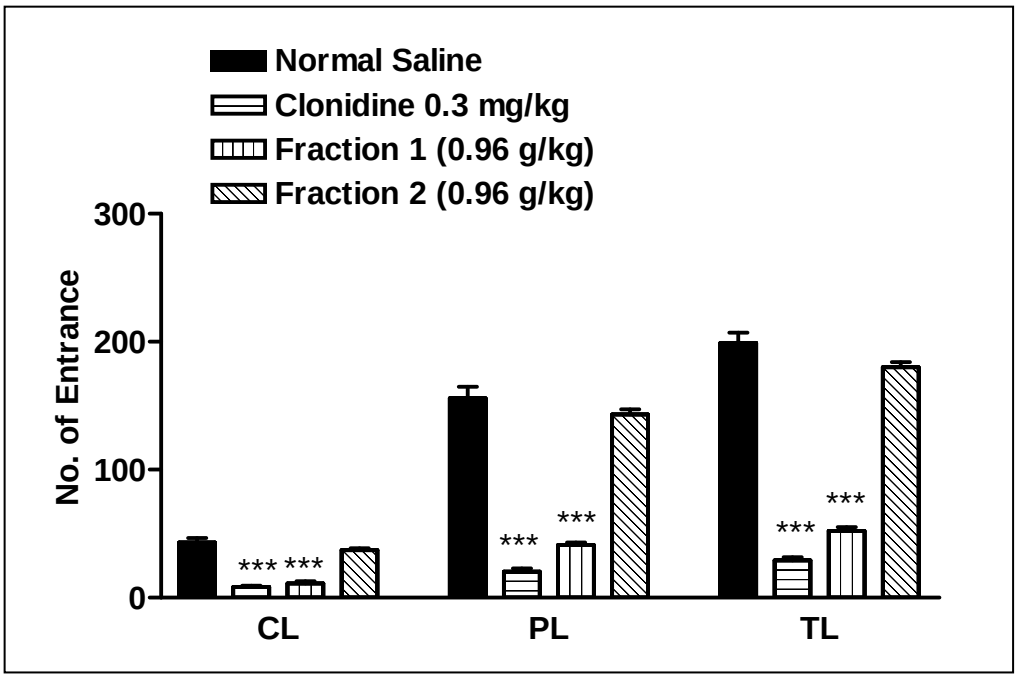
شکل شماره ۱– اثر عصاره آبی تام گیاه رزماری بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ٦ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: $p<$ ۰/۰۰۱ *.**



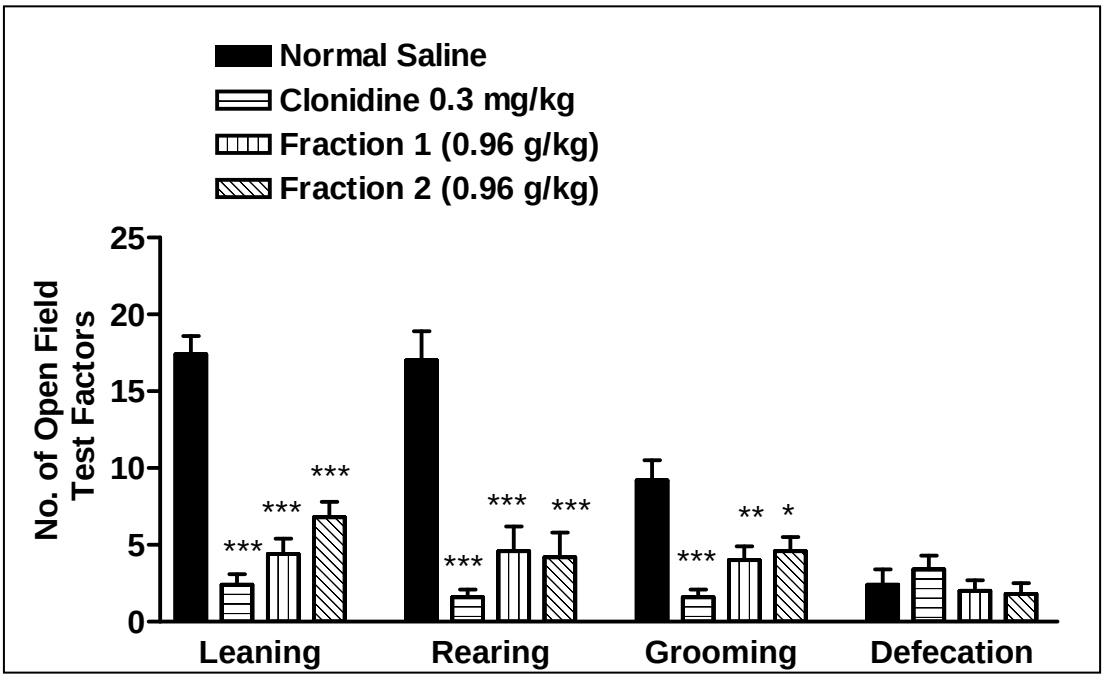
شکل شماره ۲- اثر عصاره کلروفرمی و آبی - متانولی رزماری بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ٦ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: ۰/۰۰۱ >p***.



شکل شماره ۳- اثر دو فراکسیون کلروفرمی گیاه رزماری به روش **MPLC** بر تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش. نتایج به صورت میانگین تعداد پرش‌ها + خطای معیار ٦ موش بیان شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: ۰/۰۰۱ >p***.



شکل شماره ٤- بررسی اثر دو فراکسیون کلروفرمی گیاه رزماری به روش MPLC بر فعالیت حرکتی رت در آزمون جعبه باز (Open-field test).
داده‌ها به صورت میانگین ورود به خانه‌های جعبه باز + خطای استاندارد ۵ موش نمایش داده شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: ۰/۰۰۱ >p*.**



شکل شماره ۵- بررسی اثر دو فراکسیون کلروفرمی گیاه رزماری به روش MPLC بر فاکتورهای استرئوتایپی موش در آزمون جعبه باز (Open-field test). داده‌ها به صورت میانگین فاکتورهای آزمون جعبه باز + خطای استاندارد ۵ موش نمایش داده شده است. مقایسه با کنترل. آزمون توکی: ۰/۰۰۱ >p*، ۰/۰۱ >p**، ۰/۰۵ >p*.**

بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصارهٔ تام آبی، فراکسیون آبی–متانولی، کلروفرمی دو فراکسیون ناشی از دستگاه MPLC به صورت داخل صفاقی یک ساعت قبل از آخرین دوز مرفین باعث کاهش شدت سندروم محرومیت می‌شوند.

نتایج نشان می‌دهد که عصارهٔ تام به صورت وابسته به دوز باعث کاهش تعداد پرش‌ها گردیده و در دوز ۱/٦۸ گرم بر کیلوگرم اثری در حد شاهد مثبت دیازپام از خود فعالیت نشان می‌دهد. در مقایسه اثرات فراکسیون‌های آبی - متانولی (۳:۲) و کلروفرمی این نتیجه حاصل شد که فراکسیون کلروفرمی در دوز ۱/٦۸ اثری نزدیک به کلونیدین شاهد مثبت نشان داد.

فراکسیون کلروفرمی نسبت به فراکسیون آبی -متانولی در کاهش تعداد پرش مؤثرتر و اثرات هر دو فراکسیون وابسته به دوز بود. در عین حال فراکسیون آبی –متانولی حتی در دوز پایین‌تر (۰/۹٦ گرم بر کیلوگرم) اثری در حدود ٤٤ درصد داشت. از این مقایسه می‌توان این‌گونه برداشت نمود که احتمالاً جزء یا اجزای موثر در کاهش تعداد پرش‌ها در فاز غیرقطبی بیش از فاز با قطبیت بیشتر وارد شده‌اند و ماهیت نسبتاً غیرقطبی دارند.

با توجه به استفاده از معرف لیبرمن بوشارد[1] در تعیین وجود یا عدم وجود ترپنویید این نتیجه حاصل شد که در فراکسیون شماره ۲ ترپنویید موجود است. این نتایج این فرضیه را ایجاد کرد که شاید بتوان اثر فراکسیون شماره ۲ را ناشی از یک ترپنویید دانست و ما را بر آن داشت که بر این اساس نگاهی به تحقیقات گذشته بر روی ترپنوییدهای موجود در گیاه رزماری طبی و ارتباط آنها با مکانیسم‌های دخیل در ایجاد سندرم محرومیت داشته باشیم. بر طبق این گزارش‌ها دو تری ترپنویید اولئانولیک اسید[2] و اورسولیک اسید[3] موجود در گیاه رزماری طبی که ساختاری آمفی فیلیک دارند می‌توانند باعث مهار انتخابی و قوی پروتئین کیناز A وابسته به cAMP شوند [۱٦]. در سندرم محرومیت غلظت cAMP افزایش یافته و به دنبال آن فعالیت پروتئین کیناز A وابسته به cAMP نیز افزایش می‌یابد [۱۷]. در نتیجه، شاید این ترپنوییدها با مهار انتخابی و قوی این آنزیم بتوانند در تعدیل سندرم محرومیت موثر باشند. از طرفی فلاونوییدی موجود در گیاه رزماری به نام لوتئولین[4] [۱۸] دارای اثرات ضد دردی و ضد التهابی حتی قویتر از استامینوفن و ایندومتاسین است و همان‌طور که می‌دانیم درد مفاصل و عضلات از نشانه‌های سندرم محرومیت است. بدین طریق شاید این فلاونویید هم بتواند در تخفیف سندرم محرومیت موثر باشد.

اما در مورد اثر فراکسیون شماره ۱ می‌توان گفت، از آنجا که این فراکسیون باعث کاهش حرکت و شلی عضلات نیز شده است شاید اثر این فراکسیون را بر کاهش تعداد پرش‌ها بتوان به این طریق توجیه نمود.

اما از طرفی می‌توان چنین نیز فرض کرد که ماده‌ای که باعث کاهش تعداد پرش‌ها شده است ماده‌ای غیر از مواد ذکر شده بوده و در هر دو فراکسیون هم موجوداست ولی در فراکسیون شماره ۱ ماده دیگری وجود دارد که باعث کاهش در حرکت و شلی عضلانی گردیده و بر این اساس اثر هم افزایی دو ماده باعث شده فراکسیون شماره ۱ بیشتر از فراکسیون شماره ۲ بر کاهش تعداد پرش موثر واقع شود ولی آنچه مشخص است آن است که ماده موثر در گیاه رزماری طبی بر کاهش تعداد پرش‌های ناشی از سندرم محرومیت در موش ماهیتی نسبتاً غیرقطبی دارد.

کاهش نورون‌های گابائرژیک عمل leaning را کاهش می‌دهند. سیستم گابائرژیک همچنین بر grooming موثر می‌باشد. grooming با انتقال دوپامینرژیک القا می‌شود. هم‌چنین درمان با انکفالین‌ها باعث کاهش حرکت و کاهش grooming می‌شود [۱۹]. تعداد خانه‌های طی شده و rearing در یک محیط غیرمعمول به عنوان اندازه‌ای از دو عمل به ترتیب فعالیت حرکتی و رفتار جستجوگرانه است [۲۰]. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، رزماری باعث کاهش فعالیت‌های حرکتی شده و نیز grooming و فضله را که عوامل هیجانی هستند کاهش داده و در نتیجه باعث کاهش هیجان و حالت اضطرابی شده است، همچنین Leaning را کاهش داده که احتمالاً با سیستم گابائرژیک در ارتباط است، زیرا کاهش گیرنده‌های گابا باعث کاهش عمل Leaning می‌شود.

[1] Lieberman Buchard
[2] Oleanolic acid
[3] Ursolic acid
[4] Luteolin

منابع

1. Zargari A. Medicinal Plants. Tehran, Tehran University Press. Vol4. 1990, pp: 71-76.

2. Simon JE, Chadwick AS, Craker LE. Herbs: An Indexed Bibliography of 1971-1980, The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone. Archon Books, Hampden, CT. 1984.

3. Krapp K, Long JL. Gale Encyclopedia of Alternative Medicine. London. Farmington Hills, Gale group. Vol 3. 2001, pp: 1510 - 1512.

4. Der Marderosian A. The Review of Natural Products. 1st ed. Missouri, Facts and Comparisons. 2001, pp: 512-513

5. De Feo V, Senatore F. Medicinal plants and phytotherapy in the Amalfitan coast, Salerno province, Campania, Southern Italy. *J. Ethnopharmacol.* 1993; 39: 39-51.

6. Martinez-Lirola MJ, Gonzalez-Tejero MR, Molero-Mesa J. Ethanobotanical resources in the province of Almeria, Spain: Campos De Nijar. *Econ. Bot.* 1996; 50: 40-56.

7. Chandler F. Memory stimulat: Herbal medicine. *Can. Pharm. J.* 1995; 28: 40-53.

8. Ozcan M. Antioxidant activities of rosemary, sage, and sumac extracts and their combinations on stability of natural peanut oil. *J. Med Food*. 2003; 6: 267-70.

9. Kosaka K, Yokoi T. Carnosic acid, a component of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), promotes synthesis of nerve growth factor in T98G human glioblastoma cells. *Biol. Pharm. Bull*. 2003; 26: 1620 - 2.

10. Sotelo-Felix JI, Martinez-Fong D, Muriel P, Santillan RL, Castillo D, Yahuaca P. Evaluation of the effectiveness of *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae) in the alleviation of carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity in the rat. *J. Ethnopharmacol*. 2002; 81: 145-54.

11. Hosseinzadeh H, Nourbakhsh M. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. aerial parts extract on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother Res*. 2003; 17: 938-941.

12. Trease GE, Evans WC. Pharmacognosy. Bailliere Tindall Press, London. 1983, pp: 309-706

13. Rezayat M, Azizi N, Zarrindast MR. On the mechanism (s) cholecystokinin of (CCK): receptor stimulation attenuates morphine dependence in mice. *J. Pharmacol. Toxicol*. 1997; 81: 124-129.

14. Ocana M, Barrios M, Baeyens YM. Cromakalim differentially enhances antinociception induced by agonists of alfa (2) adernoceptors, gamma-aminobutric (B), Mu and kappa opioid receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 1996; 276: 1136-1142.

15. Pardon MC, Perez-Diaz F, Joubert C, Cohen-Salmon C. Age-dependent effects of a chronic ultramild stress procedure on open-field behaviour in B6D2F1 female mice. *Physiol. Behav*. 2000; 70: 7-13.

16. Wang BH, Polya GM. Selective inhibition of cyclic AMP-dependent protein kinase A by amphiphilic triterpenoids and related compounds. *Phytochemistry* 1996; 1: 41-55.

17. Ohsawa M, Kamei J. Modification of the expression of naloxone-precipitated withdrawal signs in morphine-dependent mice by diabetes: possible involvement of protein Kinase C. Jpn. *J. Pharmacol*. 1999; 79: 303-311.

18. Block LC, Santos AP, de-Souza MM. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa. J. Ethnopharmacol*. 1998; 61: 85-89.

19. Hosaja MJ, Venault P, Tobin C, Joubert C, Delocour J, Chapouthier G. Involvment of adrenal medulla grafts in the open-field behavior. *Behav. Brain. Res*. 2001; 121: 29-37.

20. Semenova TP, Anoshikina IA, Khomut BM, Kolaeva SG, Seasonal peculiarities of behavior of ground squirrel citellus and ulatus in holeboard and open field tests. *Behav. Proces*. 2001; 56: 195-200.