Physiology and Pharmacology, 12 (2), 121 - 128
Summer 2008 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Study of the effects of intra-nucleus accumbens shell injections of alcohlic extract of *Crocus sativus* on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference in rats

Narges-al-sadat Mojabi[1], Akram Eidi[1], Mohammad Kamalinejad[2], Faryal Khamseh[3], Ali Khoshbaten[4], Ali Noroozzadeh[5], Farzaneh Zighymat[3], Hedayat Sahraei[6*]

1. Dept. Biology, Research and Development Unit, Azad Islamic University, Tehran, Iran
2. Dept. Pharmacognosy, Shahid Beheshti University (M.C.), Tehran, Iran
3. Nursing College, 4. Dept. Physiology and Biophysics and Chemical Injuries Research Center,
5. Dept Physiology and Biophysics and Behavioral Sciences Research Center,
6 .Dept Physiology and Biophysics and Applied Neurosciences Research Center, Baqiyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 15 Dec 2007 Revised: 28 June 2008 Accepted: 30 June 2008

Abstract

Introduction: Previous studies have shown the effects of water extract of *Crocus sativus* on the euphoric and behavioral properties of morphine in mice. In the present study, the effects of intra-accumbal administration of alcohol extract of *Crocus sativus* stigma on the acquisition and expression of morphine-induced conditioned place preference (CPP) in male Wistar rats (250-300 g) were investigated.

Methods: This study was conducted on 78 male rats that were divided in 13 groups (n = 6 each group). In a pilot study, different doses of morphine (0.5, 1, 2.5, 5, 7.5 and 10 mg/kg) were injected to the animals for evaluation of the drug's ability to induce place preference. In the second phase of the experiments, the extract of the C. *sativus* (1, 5 and 10 µg/rat), was administered into the nucleus accumbens shell during or after induction of morphine CPP. Then, CPP was tested in the animals. One-way Analysis of Variance (ANOVA) was preformed for statistical procedure.

Results: Administration of morphine (0.5, 1, 5, 7.5 and 10 mg/kg), increased the time spent in the compartment paired with morphine (i.e. conditioned place preference-CPP) ($P<0.05$). This increase reached significance at the dose of 10 mg/kg. Injection of the same doses of the extract (1, 5 and 10 µg/rat) 5 min before morphine (10 mg/kg) administration, caused a decrease in the time spent in drug-paired side in doses 5 and 10 µg/rat of the extract ($P < 0.0001$). In addition, injection of the plant extract (1, 5 and 10 µg/rat) in to the shell part of nucleus accumbens in the test day to the animals that received morphine (10 mg/kg) in the conditioning days decreased the expression of morphine CPP in the animals. This effect was statistically significant for doses 5 and 10 µg/rat of the extract ($P < 0.0001$).

Conclusion: It may be concluded that intra-accumbens shell compartment injection of the alcoholic extract of *C sativus* can inhibit the acquisition and expression of morphine-induced CPP and then shift it to the aversive state in rats.

Keywords: Morphine, Conditioned place preference, Rats, Saffron Extract.

* Corresponding author e- mail: h.sahraei@bmsu.ac.ir
Available online @: www.phypha.ir/ppj

فیزیولوژی و فارماکولوژی

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۲ (۲)، ۱۲۱ – ۱۲۸
تابستان ۱۳۸۷

بررسی اثر تجویز داخل هسته آکومبانس عصاره الکلی زعفران (*Crocus sativus*) بر کسب و بیان ترجیح مکان شرطی‌شده ناشی از مورفین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی

نرگس‌السادات مجابی[۱]، اکرم عیدی[۱]، محمد کمالی‌نژاد[۲]، فریال خمسه[۳]، علی خوش‌باطن[۴]، علی نوروززاده[۵]، فرزانه ذیقیمت[۳]، هدایت صحرائی[۶*]

۱. گروه زیست شناسی، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، پونک، تهران
۲. گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران
۳. دانشکده پرستاری، دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله (عج)، تهران
۴. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیائی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله (عج)، تهران
۵. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک و مرکز تحقیقات علوم رفتاری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیۀالله (عج)، تهران
۶. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بقیۀالله (عج)، تهران

دریافت: آذر ۸۶ بازبینی: تیر ۸۷ پذیرش: تیر ۸۷

چکیده

مقدمه: مطالعات قبلی بر تاثیر عصاره آبی زعفران در اثرات سرخوشی‌آور و حرکتی مورفین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی تاکید دارند. در تحقیق حاضر، اثر تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس عصاره الکلی زعفران (*Crocus sativus*) بر کسب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین درموشهای بزرگ آزمایشگاهی نر نـژاد Wistar در محدوده وزنی ۲۵۰–۳۰۰ گرم بررسی شد.

روش‌ها: این تحقیق یک مطالعه تجربی مداخله‌ای است که بر روی ۷۸ سر موش بزرگ آزمایشگاهی نر که بطور مساوی در ۱۳ گروه تقسیم شـدند (۶ سـر در هـر گـروه) انجام شده است. در یک آزمایش ابتدائی، مقادیر متفاوت مورفین (۰/۵ mg/kg، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰) به حیوانات تزریق شد تا مشخص شود که آیا مورفین توانائی القـاء تـرجیح مکان شرطی شده را در این دستگاه دارد. در بخش دوم آزمایش‌ها، حیوانات مقادیر متفاوت (۱ µg/rat، ۵ و ۱۰) عصاره زعفران در خلال یا بعد از القاء شرطی شـدن بـه مـورفین بداخل پوسته هسته آکومبانس تزریق شد و سپس ترجیح مکان شرطی شده مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی آماری از آنالیز– واریانس یک‌طرفه استفاده شد.

یافته‌ها: آزمایشها نشان داد که تجویز مورفین (۰/۵ mg/kg، ۱، ۵، ۷/۵ و ۱۰) باعث افزایش زمان سپری شده در قسمت دریافت مورفین گردید (ترجیح مکان شرطی شده) ($P< ۰/۰۵$). این افزایش در گروه دریافت کننده دوز (۱۰ mg/kg) مورفین کاملاً معنی‌دار بود. تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس عصـاره زعفـران (۱ µg/rat، ۵ و ۱۰) قبـل از تجویز مورفین (۱۰mg/kg) سبب کاهش معنی دار زمان سپری شده در قسمت دریافت دارو در دوزهای ۵ µg/rat و ۱۰ گردید ($P< ۰/۰۰۰۱$). هم چنین تجـویز داخـل پوسـته هسته آکومبانس عصاره به حیواناتیکه در روزهای القاء شرطی شدن، مورفین با دوز (۱۰mg/kg) دریافت کرده بودند سبب کاهش بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مـورفین گردید که این کاهش در دوزهای ۵ µg/rat و ۱۰ عصاره کاملا معنی‌دار بود ($P< ۰/۰۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: از این آزمایش‌ها استنباط می‌شود که تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس عصاره الکلی زعفران سبب مهار کسب و بیان ترجیح مکان شـرطی شـده ناشـی از مورفین در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی گردیده و این اثر را به سمت تنفر مکانی شیفت می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: مورفین، ترجیح مکان شرطی شده، موش بزرگ آزمایشگاهی، عصاره زعفران.

مقدمه

با پیشرفت‌های خوبی کـه در زمینـه وابسـتگی بـه داروهـای اعتیادآور حاصل شده است، امروزه امید به پیدا شدن راه‌هائی برای درمان این معضل بسیار بیشتر از گذشته است. دانسـته‌هـای مـا از مکانیسم‌ها و عوامل اصلی در مغز که با وابستگی داروئی سـروکار دارند، تا حدود زیادی بهبود یافته است. می‌دانـیم کـه دانشـمندان مسیر دوپامینی مزوکورتیکولیمبیک که از ناحیه تگمنتـوم شـکمی

* نویسندۀ مسئول مکاتبات: h.sahraei@bmsu.ac.ir
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

که در واقع نورن‌های دوپامینی A10 محسوب می‌شوند، شروع شده و به هسته آکومبانس، قشر جلوپیشانی و هسته مرکزی آمیگدال ختم می‌شود را به عنوان مهمترین مسیر درگیر در وابستگی به داروهای اعتیادآور می‌شناسند [۶، ۱۰، ۱۲] . با این حال، مسیرهای آناتومیکی دیگر مانند مسیر لوکوس سرولیوس به تگمنتوم شکمی [۷] و نوروترانسمیترهای دیگری مانند گلوتامات، سروتونین و نیتریک اکساید [۲۱] نیز در وابستگی به اوپیوئیدها نقش دارند. داروهای اوپیوئیدی قادر به القاء حافظه بلندمدت نیز می‌باشند و این مسئله یکی از دلایل اصلی وجود خاطره مصرف مواد مخدر در افراد معتاد می‌باشد که برای مدتها بعد از ترک مصرف مواد مخدر نیز برجای می‌ماند [۱۰]. بر اساس این توانائی داروهای اوپیوئیدی روش ترجیح مکان شرطی شده در حیوانات به عنوان یک مدل مطالعه اثرات سرخوشی‌آور داروهای مخدر ابداع و توسعه یافته است [۲۰]. متاسفانه علی‌رقم پیشرفتهای زیاد در زمینه چگونگی اثربخشی داروهای مخدر، هنوز راه‌های درمانی مؤثری برای ترک این داروها ارائه نشده است و راه‌حل‌های مختلف در این زمینه به شکست انجامیده است. یک راه برای ترک داروهای مخدر، استفاده از داروهای گیاهی می‌باشد که به دلیل اثرات جانبی کمتر از چند دهه پیش به عنوان جایگزینی خوب برای داروهای شیمیائی مطرح شده‌اند و مصرف آنها در دنیا رو به افزایش است [۲۲].

زعفران از جمله گیاهانی است که در نقاط مختلف دنیا به عنوان یک گیاه داروئی از قدیم مورد استفاده قرار گرفته است [۲۲]. در منابع ایرانی از این گیاه به عنوان ضد اسپاسم، آرامبخش، کمک کننده هضم غذا، ضد نفخ، معرق، خلط‌آور، محرک میل جنسی و تسکین دهنده درد نام برده شده است [۲۲]. زعفران گیاهی است از تیره زنبق و چند ساله به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و دارای پیازی سخت و مدور و گوشت‌دار و پوشیده از غشاءهای نازک و قهوه‌ای رنگ است. این گیاه در نقاط مختلف دنیا می‌روید. گلهای زعفران بنفش رنگ بوده و دارای خامه بلند و کلاله سه قسمتی به رنگ نارنجی یا قرمز است که همین قسمت به عنوان زعفران ارزش تجاری دارد [۲۲]. زعفران دارای مواد چرب، املاح معدنی و موسیلاژ است. ترکیبات زیر نیز در زعفران یافت می‌شود: اسانس بی‌رنگی مرکب از ترپنها و سینئول که بوی زعفران مربوط به این مواد است. پیکروکروسین که یک هتروزید تلخ است و در آب و الکل به راحتی حل می‌شود. گلوکزیدی به نام پیکروکروستین که از هیدرولیز آن پیکروکروسین و گلوکز به دست می‌آید. کروسین که ماده اصلی رنگی زعفران است که نوعی کاروتنوئید است [۲۲].

در تحقیقات قبلی، در مورد اثر عصاره زعفران در برخی بیماریها در انسان، تحقیقاتی انجام گرفته است. در مورد کاهش افسردگی در انسان، آخوندزاده و همکاران در یک تحقیق اثر عصاره گیاه زعفران را با ایمی پرامین به عنوان یک داروی ضد افسردگی رایج در درمان افسردگیهای خفیف تا متوسط مطالعه کردند [۵]. نتیجه این تحقیق نشان داد که عصاره زعفران همان کارآئی ایمی پرامین را بدون عوارض جانبی آن [۱۳] دارد. همچنین در یک تحقیق دیگر، نوربالا و همکاران [۱۴] اثر عصاره آبی–الکلی زعفران را بر بهبود افسردگی خفیف تا متوسط مطالعه کرده و اثر آن را با فلوکزتین مقایسه کرده‌اند. نتایج این تحقیق نیز بر اثر مثبت زعفران در کاهش علائم افسردگی در مقایسه با فلوکزتین تاکید دارد. از سوی دیگر، تحقیقات قبلی بر توانائی ضددردی و ضد التهابی عصاره زعفران در موشهای کوچک آزمایشگاهی نسبت به داروهای ضد درد و ضد التهاب رایج تاکید دارد [۹]. یک تحقیق نسبتا جدید نیز اشاره دارد که کروسین (آلکالوئید اصلی زعفران) هنگامی که قبل از تجویز سم 6-OHDA به داخل ماده سیاه بصورت یکطرفه،به مدت هفت روز به موشهای بزرگ تجویز شود، از کاهش دوپامین مغز، افزایش عوامل اکسید کننده و تخریب نورنهای دوپامینی جلوگیری کرده و سطح دوپامین را در استریاتوم بالا می‌برد [۱۹]. محققان همچنین بر تاثیر کروسین در بهبود حافظه و القاء پدیده تقویت طولانی مدت (LTP) در موشهای بزرگ آزمایشگاهی نر تاکید دارند [۳-۴] . بهبود حافظه فضائی در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی در اثر مصرف عصاره زعفران در مدل احترازی غیر فعال نیز در تحقیق دیگری مورد تایید قرار گرفته است [۱۷]. با این حال تاکنون تحقیقات کمی در مورد اثرات سرخوشی‌آور (که با القاء حافظه نیز همراه است) زعفران و یا اثر این گیاه بر بروز اثرات سرخوشی‌آور مورفین انجام شده است. در تحقیق قبلی ما، عصاره آبی زعفران اثرات جالبی را هم در القاء ترجیح مکان شرطی شده در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر [۱] و هم در القاء حساسیت رفتاری [۲] در موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده داشت. به همین دلیل در تحقیق حاضر توانائی عصاره الکلی زعفران در هنگام تجویز

بداخل پوسته هسته آکومبانس بر بهبود و یا وخیم شدن اثرات سرخوشی‌آور مورفین در موش بزرگ آزمایشگاهی نر با استفاده از روش ترجیح مکان شرطی شده بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کلاله گیاه زعفران توسط شرکت طلاکاران مزرعه (بیرجند- خراسان جنوبی) در اختیار این گروه قرار گرفت. زعفران به آزمایشگاه دانشکده دارو سازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل گردید و توسط مهندس کمالی نژاد مورد شناسائی قرار گرفت و کد ۴۰۸ به آن داده شد. سپس کلاله پودر شده و در دستگاه تقطیر، عصاره الکلی آن گرفته شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم از پودر کلاله خشک شده در یک مخزن شیشه‌ای ریخته می‌شد و به آن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر الکل متیلیک ۱۰۰٪ اضافه شده و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به آرامی مخلوط شد. سپس محلول از یک صافی عبور داده می‌شد و برای مدت یک هفته در دستگاه بن ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار می‌گرفت تا الکل عصاره نیز به آرامی تبخیر شده و پودر عصاره به جا بماند. از هر ۱۰۰ گرم پودر کلاله به این روش، ۲۵ گرم عصاره بدست می‌آمد [۲۲]. این عصاره در سالین حل شده و بصورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق می‌شد. چون یکی از مهمترین ترکیبات کاروتنوئیدی موجود در عصاره زعفران کروسین می‌باشد [۲۲]، در یک تحقیق ابتدائی غلظت کروسین موجود در عصاره با روش کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا (HPLC)، تعیین و دوزهای مورد استفاده از عصاره در این تحقیق با توجه به میزان کروسین موجود در آن انتخاب گردید.

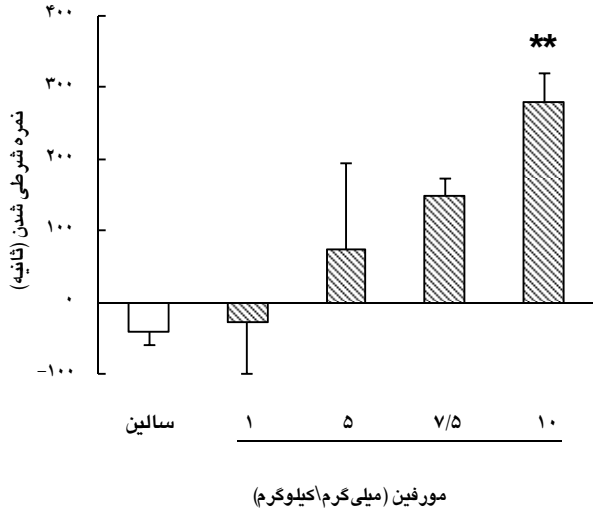
در این تحقیق از موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر نژادWistar با میانگین وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در قفسهای ۴-۵ تایی با دوره شبانه روزی طبیعی ودر دمای ۲۴°C-۲۲، با آب و غذای کافی نگهداری می‌شدند. در هر سری آزمایش ۶ سر حیوان مورد استفاده قرار گرفت.

برای تزریق عصاره الکلی زعفران به داخل ناحیه پوسته هسته آکومبانس، حیوانات ابتدا با تزریق داخل صفاقی مخلوط کتامین (۵۰-۷۵ mg/kg) و دیازپام (۵-۷ mg/kg) بیهوش شده و مورد عمل جراحی قرار گرفتند. در این کار، دو عدد کانول راهنما از جنس استیل از سرسوزن‌های شماره ۲۳ و بطول ۶/۶ میلی‌متر با استفاده از دستگاه استریوتاکسی در داخل ناحیه پوسته هسته آکومبانس آنها بصورت دوطرفه قرار می‌گرفت. این کانولها توسط دو عدد پیچ عینک و با استفاده از آکریل دندانپزشکی در محل خود محکم می‌شدند. مختصات محل کارگزاری کانول‌ها با استفاده از اطلس واتسون و پاکسینو به قرار زیر بود: AP: ۱/۲ از نقطه برگما، L: ۱/۲ از خط مرکزی و V:۶/۶ از سطح جمجمه (اعداد به میلی‌متر هستند) [۱۶] . تزریق بداخل این ناحیه با یک کانول تزریق از جنس استیل به شماره ۳۰ و با طول ۷ میلی‌متر که به یک سرنگ هامیلتون ۵ µl با استفاده از یک کانول پلاستیکی وصل بود در مدت یک دقیقه انجام می‌گرفت سپس یک دقیقه دیگر کانول تزریق در محل باقی می‌ماند تا از بیرون زدن دارو جلوگیری شود (حجم تزریق ۰/۵ میکرولیتر در هر طرف بود).

پس از پایان آزمایش‌ها، به منظور تعیین محل تزریق دارو، تعدادی از حیوانات کشته شده و مغز آنها به همراه جمجمه در داخل محلول فیکساتیو (فرمالین ۱۰٪) قرار می‌گرفت. پس از فیکساسیون، این مغزها برش داده شده و محل تزریق با استفاده از رنگ بلودومتیلن مشخص می‌شد و توسط یک کارشناس خبره مورد تایید قرار می‌گرفت.

برای انجام آزمایش ترجیح مکان شرطی شده از دستگاه چوبی مخصوصی استفاده شد که از دو قسمت مجزا تشکیل شده است [۱۸]. این دو قسمت دارای ابعاد مساوی ۳۰×۳۰×۳۰ سانتی متر (طول و عرض و ارتفاع) می‌باشند که توسط یک دریچه گیوتینی مرکزی می‌توانند با هم در ارتباط باشند. رنگ دیواره‌های هر دو طرف سفید اما دیواره‌های هر قسمت دارای تزئینات متمایز از طرف دیگر بود. کف هر قسمت نیز دارای خراشیدگیهائی بود که از طرف مقابل متمایز بود (جهت خراشیدگیها در یک طرف عمود بر دریچه مرکزی و در طرف دیگر موازی با دریچه مرکزی بود). دوره آزمایش ترجیح مکان شرطی شده پنج روز بود که شامل مراحل زیر است:

در اولین روز هر دوره که روز آشنائی نامیده می‌شود پس از برداشتن دریچه گیوتینی، هر حیوان به مدت ۱۰ دقیقه در داخل دستگاه قرار گرفته تا آزادانه در دستگاه گردش کرده و با محیط آن آشنا شود. زمان سپری شده در هر قسمت دستگاه در این روز ثبت می‌شد. نتایج نشان داد که در این دستگاه حیوانات تمایل



شکل۱- اثر مورفین در القاء ترجیح مکان شرطی شده در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی. تزریق مورفین به حیوانات باعث افزایش معنی‌دار زمان توقف در قسمت دریافت مورفین می‌شود. تجویز سالین در روزهای آموزش اثری را در القاء ترجیح یا تنفر مکانی ندارد. این نتیجه در مورد دوز ۱۰mg/kg مورفین قویتر بود. نتایج به صورت (SEM ± Mean) نمره شرطی شدن در مورد ۶ سر حیوان است. **P<0.01

ذاتی به هیچکدام از دو قسمت نشان نمی‌دهند و بنابراین از روش غیر طرفدار (Un-Biased) برای ادامه کار استفاده شد. در این روش نیمی از حیوانات در هر سری در یک قسمت شرطی شده و نیم دیگر در طرف مقابل (به این ترتیب طراحی بصورت متعادل (Counterbalance) بود).

برای اینکه حیوان را به مکان معینی شرطی کنیم، طی مدت سه روز بطور متناوب به آنها دارو تزریق می‌کردیم. به این ترتیب که در ساعت ۹ صبح روز دوم، پس از توزین حیوانات، مورفین (یا عصاره) را بصورت زیر جلدی (یا داخل صفاقی) به هر حیوان تزریق و پس از بستن دریچه گیوتینی آنها را به مدت ۳۰ دقیقه در یکی از دو قسمت دستگاه قرار می‌دادیم. شش ساعت بعد پس از توزین مجدد به حیوانات سالین تزریق می‌کردیم و آنها را به مدت ۳۰ دقیقه در قسمت مخالف قرار می‌دادیم. در روز سوم زمان تزریق مورفین و سالین بر عکس می‌شد (صبح سالین و عصر مورفین). در روز چهارم زمان تزریقات مانند روز دوم بود.

در روز پنجم آزمایشات (آخرین روز هر دوره آزمایش)، ابتدا دریچه گیوتینی برداشته می‌شد و سپس هر حیوان در داخل دستگاه قرار می‌گرفت و برای مدت ۱۰ دقیقه اجازه حرکت آزادانه در هر دو قسمت دستگاه را داشت. مدت زمان توقف هر حیوان در هر قسمت دستگاه ثبت شده و زمان توقف در قسمت دریافت دارو (Drug-Paired) از زمان توقف حیوان در قسمت دریافت سالین (Saline-Paired) کم شده و به عنوان نمره شرطی شدن (Conditioning Score) به عنوان نمادی از اثر دارو در القاء شرطی شدن در نظر گرفته می‌شد.

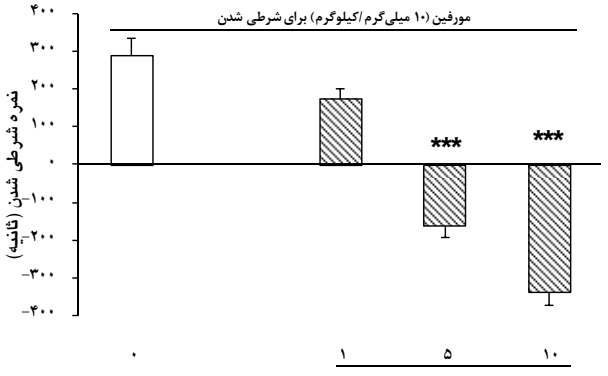
دراین تحقیق، مورفین سولفات (تماد- ایران) مورداستفاده قرار گرفت. مورفین در سالین حل شده و با حجم ۱۰ ml/kg بصورت زیر جلدی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره متانولی کلاله گل زعفران نیز پس از توزین در سالین استریل حل شده و بصورت داخل پوسته هسته آکومبانس مورد استفاده قرار گرفت. گروه‌های کنترل در هر قسمت سالین را بصورت زیر جلدی یا داخل پوسته هسته آکومبانس دریافت کردند. در ابتدا به منظور تعیین دوز موثر مورفین در القاء ترجیح مکان شرطی شده، منحنی دوز- پاسخ مورفین بدست آمد. و در نتیجه دوز موثر دارو شناخته شد. سپس دوزهای مختلف عصاره (µg/rat ۱، ۵ و ۱۰) ۵ دقیقه قبل از تزریق مورفین (۱۰ mg/kg) به حیوانات تزریق شد. در روز تست حیوانات بدون هیچگونه تزریقی مورد آزمایش قرار گرفتند.

در ادامه مطالعه در چهار گروه از حیوانات در روزهای القاء شرطی شدن مورفین (۱۰ mg/kg) تزریق شد. در روز تست ۵ دقیقه قبل از آزمایش به سه گروه از حیوانات عصاره (µg/rat ۱، ۵ و ۱۰) تزریق و حیوانات به مدت ۱۰ دقیقه تست شدند.

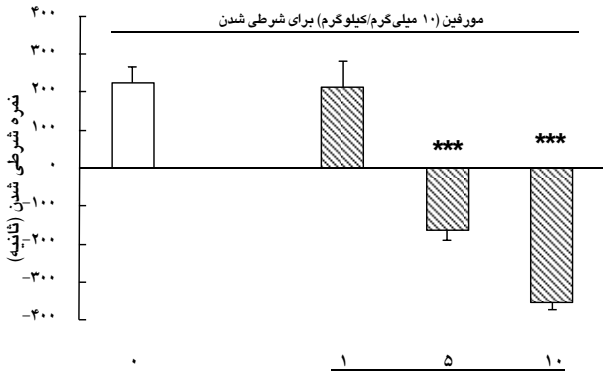
اطلاعات بدست آمده بصورت میانگین ± انحراف معیار استاندارد (SEM ± Mean) نمره شرطی شدن بیان شدند. به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و بدنبال آن تست توکی استفاده شد. P <۰/۰۵ مرز معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

برای بررسی اثر مورفین در القاء ترجیح مکان شرطی شده در موشهای سالم، حیوانات به شش گروه تقسیم شدند. یک گروه سالین (به روش ذکر شده در قسمت روش‌ها) دریافت کرد و پنج گروه دیگر دوزهای مختلف مورفین (۰/۵ mg/kg، ۱، ۵، ۷/۵ و ۱۰) را به منظور القاء ترجیح مکان شرطی شده دریافت کردند. تجویز مورفین سبب افزایش زمان سپری شده در قسمت دریافت



شکل۲- اثر تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس عصاره زعفران بر کسب (ایجاد) ترجیح مکان شرطی شده توسط مورفین در موشهای بزرگ آزمایشگاهی. حیوانات در روزهای آموزش ۵ دقیقه قبل از تجویز مورفین عصاره زعفران (µg/rat ۱، ۵ و یا ۱۰) را دریافت می‌کردند. در روز تست، حیوانات بدون دریافت هیچ داروئی به مدت ۱۰ دقیقه مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج به صورت (SEM ± Mean) نمره شرطی شدن در مورد ۶ سر حیوان است.***P<0.001 و **P<0.01



شکل۳- اثر تجویز عصاره زعفران به داخل پوسته هسته آکومبانس بر بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موشهای بزرگ آزمایشگاهی. حیوانات در روزهای آموزش مورفین (۱۰ mg/kg) را دریافت می‌کردند. در روز تست، ۵ دقیقه قبل از آزمون هر حیوان ابتدا دوزهای مختلف عصاره زعفران (µg/rat ۱، ۵ یا ۱۰) را دریافت می‌کرد و سپس به مدت ۱۰ دقیقه مورد مطالعه قرار می‌گرفت. نتایج به صورت (SEM ± Mean) نمره شرطی شدن در مورد ۶ سر حیوان است. ***P<0.001 و **P<0.01

مورفین نسبت به زمان سپری شده در قسمت دریافت سالین گردید (ترجیح مکان شرطی شده) [F(5,30)=2.18, P<0.05] (شکل ۱). چون دوز ۱۰mg/kg مورفین بهترین جواب را القاء کرد، در قسمت‌های بعدی آزمایش از این دوز استفاده گردید.

در ادامه برای بررسی اثر تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس عصاره زعفران بر کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین، از چهار گروه حیوان استفاده شد. سه گروه از حیوانات در روزهای آموزش ۵ دقیقه قبل از تجویز مورفین (۱۰ mg/kg) و یکی از سه دوز عصاره (µg/rat ۱، ۵ و ۱۰) را دریافت کردند. گروه چهارم قبل از تجویز مورفین، سالین دریافت کردند. نتایج نشان دادند که تجویز عصاره زعفران اثر مورفین را در القاء ترجیح مکان شرطی شده بطور معنی‌داری کاهش می‌دهد [F(3,23)= 66, P<0.0001] (شکل ۲). این اثر در دوزهای µg/rat ۵ و ۱۰ عصاره کاملا باعث القاء پدیده تنفر مکانی گردید.

در نهایت، به منظور بررسی اثر تجویز عصاره زعفران به داخل ناحیه پوسته هسته آکومبانس بر بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین، در این قسمت ابتدا چهار گروه حیوان انتخاب شدند. همه گروه‌ها در روزهای آموزش به روشی که در قسمت قبل ذکر شد مورفین (۱۰ mg/kg) دریافت کردند. در روز تست، ۵ دقیقه قبل از شروع آزمایش به سه گروه از حیوانات سه دوز از عصاره زعفران (µg/rat ۱، ۵ و ۱۰) تزریق شد. گروه چهارم سالین دریافت کردند. نتایج نشان دادند که تجویز عصاره زعفران بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین را نیز بطور معنی‌داری مهار کرده و حتی باعث بروز تنفر مکانی می‌گردد[F(3,22)= 48, P<0.0001] (شکل ۳). آنالیز بعدی اطلاعات نشان داد که اثر دوزهای µg/rat ۵ و ۱۰عصاره زعفران بر بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین کاملا معنی‌دار است.

بحث

یافتن مکان (های) اصلی تاثیر عصاره زعفران در مغز مهمترین هدف مطالعه حاضر بود. تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس عصاره الکلی زعفران توانست هم کسب و هم بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین را مهار نماید. این اثر وابسته به دوز بود اما در مورد کسب و بیان نتایج مشابه (هر دو کاهش) بدست آمد. این امر می تواند بیان کننده فعال شدن مکانیسم های غیرمشابه در عملکرد عصاره زعفران باشد. از سوی دیگر، در حالیکه عصاره آبی زعفران توانائی مهار کسب و تقویت بیان ترجیح مکان شرطی شده را در موش‌های کوچک آزمایشگاهی داشت، در مطالعه حاضر دوزهای بالای عصاره

الکلی زعفران باعث مهار کامل کسب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در حیوانات شدند. این مسئله نشان دهنده وجود اختلافات در ترکیب عصاره‌های آبی و الکلی زعفران و نیز احتمالا اختلاف گونه‌ای در پاسخ به عصاره زعفران می‌باشد. این امر می‌تواند ضمن اینکه افق جدیدی از عملکرد زعفران را بنمایاند، در عین حال تفکر ما را در مورد عملکرد زعفران تغییر دهد.

این مطالعه نشان داد که حیواناتی که سابقه دریافت مورفین نداشته‌اند، ترجیح کاملا واضحی برای مکان دریافت مورفین نسبت به مکان دریافت سالین از خود نشان می‌دهند. مورفین به عنوان یک داروی شناخته شده قادر به القاء ترجیح مکان شرطی شده در موش‌های کوچک [۱] و بزرگ آزمایشگاهی [۱۸] بوده و بر اساس یافته‌های مختلف، این کار را با تحریک غیر مستقیم نورن‌های دوپامینی موجود در ناحیه تگمنتوم شکمی و القاء رها شدن دوپامین در قسمت پوسته هسته آکومبانس، آمیگدال و هیپوکمپ و همچنین قشر جلوپیشانی انجام می‌دهد [۱۱]. امروزه مشخص شده که مسیرهای گلوتاماترژیک برگشتی از آمیگدال و قشر جلو پیشانی نقش مهمی را در تحریک رها شدن مجدد دوپامین از تگمنتوم شکمی بازی می‌کنند [۱۵]. این مسیرها با اثر بر گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی موجود در ناحیه تگمنتوم شکمی، باعث افزایش ورود یون کلسیم به داخل سلول‌های دوپامینی این ناحیه شده و تحریک‌پذیری آنها را بالا می‌برند. این افزایش تحریک‌پذیری نقشی (ولو متوسط) را در فعالیت نورونهای دوپامینی بازی می‌کنند [۱۵]. در هر حال، نوروترانسمیترهای دیگری مانند گابا [۱۱] و پپتیدهای اوپیوئیدی درونزاد [۱۲] نیز در این زمینه نقش حساسی را دارند. در تحقیق حاضر نیز این احتمال که مورفین اثرات خود را با فعال سازی مکانیسم‌های گفته شده انجام داده باشد، بسیار است.

در بخش دوم تحقیق حاضر، اثر تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس عصاره الکلی زعفران بر کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موشهای بزرگ آزمایشگاهی بررسی شد. این نتایج نشان داد که تجویز عصاره زعفران قبل از تجویز مورفین در روزهای شرطی شدن، نه تنها باعث کاهش کسب ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در این حیوانات می‌شود بلکه این اثرات را بسمت القاء تنفر مکانی نیز منحرف می‌کند. به عبارت دیگر عصاره الکلی زعفران خواص پاداشی مورفین را بطور کامل مهار کرده و باعث تغییر کامل پاسخ حیوانات شده است. این یافته در مورد دوزهای ۵μg/rat و ۱۰ عصاره کاملا از نظر آماری معنی‌دار بود. در مقایسه با نتایج تحقیقات قبلی این گروه در مورد عصاره آبی زعفران و در موشهای کوچک آزمایشگاهی اثرات دیده شده در این تحقیق بسیار قویتر بود. این امر را بایستی به تفاوت گونه‌ای در دو آزمایش و یا تفاوت ترکیبات موجود در عصاره‌های ابی و الکلی زعفران و یا به نحوه تزریق (محیطی و مرکزی) عصاره نسبت داد. در مورد اینکه چه مکانیسم (یا مکانیسم هائی) در این امر دخالت دارند، نظر قطعی نمی‌توان داد. در هر حال، عصاره الکلی زعفران دارای کاروتنوئیدهای فراوانی است که هرکدام از آنها ممکن است در این امر مؤثر باشند. یکی از مهمترین این کاروتنوئیدها، سافرانال است که قبلا اثر آن بر مهار اثرات صرع‌زای پنتیلن تترازول با واسطه‌گری گیرنده‌های گابا-آ مشخص شده است [۸]. در تحقیقات قبلی مشخص شده است که تحریک گیرنده‌های گابا-آ موجب مهار ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موشهای بزرگ آزمایشگاهی می‌شود [۱۸]. در این آزمایشها نیز احتمال بروز چنین مکانیسمی دور از ذهن نیست. امکان تداخل سایر کاروتنوئیدهای موجود در عصاره زعفران مانند کروسین پیکروکروستین و پیکروکروسین نیز در کار مورفین دور از ذهن نیست. هرچند بیشتر این کاروتنوئیدها در عصاره آبی زعفران غلظت بالاتری دارند ولی نمی‌توان عملکرد آنها را نادیده گرفت. برای تعیین نقش دقیق این ترکیبات در کار مورفین، پیشنهاد می‌شود که در کارهای بعدی نقش هرکدام از این ترکیبات بطور جداگانه بر کار مورفین مورد بررسی قرار گیرد.

در بخش پایانی، تجویز داخل پوسته هسته آکومبانس عصاره زعفران در روز تست و قبل از شروع آزمایش‌ها سبب کاهش بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین گردید. این کاهش در دوزهای ۵μg/rat و ۱۰ عصاره زعفران کاملا معنی‌دار بود. نتیجه بدست آمده در این قسمت با نتایج قبلی در موشهای کوچک آزمایشگاهی نر و عصاره آبی زعفران متفاوت بود [۱] . این امر بیانگر تفاوت گونه‌ای و یا تفاوت ترکیبات عصاره‌های ابی و الکلی زعفران در پاسخ‌های بدست آمده است. بنابراین، یک یافته مهم محسوب می‌شود. بایستی اشاره شود که مکانیسم‌های پاداشی و حافظه در نقاطی مثل هسته آکومبانس و هیپوکمپ در بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین

نقش دارند [۶، ۱۲، ۲۰] . این مکانیسم‌ها در هنگام تزریق مورفین در مغز القاء شده و هنگامی که حیوان در محیطی قرار می‌گیرد که قبلا مورفین دریافت کرده بود، قرار می‌گیرد، فعال شده و حیوان به رفتاری روی می‌آورد که رفتار جستجوی دارو نامیده می‌شود [۲۰]. نتایج حاضر بیانگر آن است که تجویز داخل هسته آکومبانس عصاره زعفران توانائی تضعیف مکانیسم‌های پاداشی و یا حافظه‌ای فعال شده در اثر تزریقات قبلی مورفین را دارد. اینکه کدامیک از کاروتنوئیدهای موجود در عصاره زعفران این کار را انجام داده‌اند و یا سهم هر کدام از این ترکیبات در تقویت بیان ترجیح مکان شرطی شده چقدر است، بایستی در آینده مورد بررسی قرار گیرد. همانطور که در بخش قبلی ذکر شد حسین‌زاده و صادق‌نیا (۲۰۰۶) در تحقیقی نشان دادند که تجویز سافرانال با مکانیسم‌های وابسته به گیرنده‌های گابا-آ توانسته است که مانع القاء صرع توسط پنتیلن تترازول در موشهای بزرگ آزمایشگاهی نر شود [۸]. با توجه به اینکه مکانیسم‌های وابسته به گیرنده‌های گابا-آ در مهار خواص پاداشی مورفین نقش مهمی را ایفا می‌کنند، بنابراین دور از ذهن نیست اگر در نظر بگیریم که عصاره الکلی زعفران با توجه به مقادیر زیاد سافرانال می‌تواند باعث مهار بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین شود. همچنین با توجه به اینکه عصاره الکلی زعفران دارای کاروتنوئیدهای مختلفی است که می‌توانند با اثر بر گیرنده‌های گلوتاماتی اثر خود را القاء کنند [۳ و ۴] ممکن است که عصاره الکلی زعفران از طریق تحریک این گیرنده‌ها اثر خود را القاء کرده باشد. از سوی دیگر همچنانکه در بالا اشاره شد پیکروکروسین که از کاروتنوئیدهای موجود در عصاره الکلی زعفران است قادر به القاء فعالیت در نورونهای دوپامینی می‌باشد. چون فعالیت نورنهای دوپامینی باعث مهار بیان خواص پاداشی مورفین می‌شود [۱۹] ممکن است که این امر هم در مهار بیان ترجیح مکان شرطی ناشی از مورفین در تحقیق حاضر نقشی داشته باشد. در هر حال با توجه به اثر بسیار قوی عصاره زعفران در مهار هم کسب و هم بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین از یک سو و مکانیسم‌های متفاوت عصبی-نوروترانسمیتری که در این دو پدیده دخالت دارند —از سوی دیگر- بایستی یک نقش قوی نوروترانسمیتری یا یک نقش تعدیلی برای عصاره الکلی زعفران در این تحقیق در نظر گرفت.

باید در نظر داشت که تضعیف بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین توسط عصاره زعفران ممکن است توسط مکانیسمای غیر مستقیمی باشد که هنوز شناخته نشده‌اند. و در نهایت، یک برهم‌کنش فارماکوکینتیک ممکن است که بین اثرات القاء شده توسط مورفین و عصاره زعفران رخ داده باشد که به تضعیف بیان ترجیح مکان شرطی شده منجر شده است.

در یک نتیجه‌گیری کلی باید عنوان کرد که نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز داخل هسته آکومبانس عصاره الکلی زعفران توانست کسب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین را مهار کند اما، مکانیسم دقیق این عملکرد بایستی در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی پژوهشکده طب رزمی، دانشگاه علوم‌پزشکی بقیه‌الله (عج) است. نویسندگان از مرکز مذکور به دلیل تقبل هزینه اجرای این طرح سپاسگزارند. همچنین، نویسندگان از جناب آقای مهندس جعفری، مدیر عامل محترم شرکت طلاکاران مزرعه (تربت حیدریه) بخاطر در اختیار قرار دادن زعفران کمال تشکر را دارند.

منابع

[۱] مبشر مینا، صحرائی هدایت، صادقی‌راد بهنام، کمالی‌نژاد محمد، شمس جمال، بررسی اثر عصاره زعفران بر کسب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. **مجله دانشگاه علوم‌پزشکی رفسنجان** ۳ (۱۳۸۵)۱۴۳-۱۵۰.

[۲] صحرائی هدایت، شمس جمال، مرجانی صدیقه، مولوی صفیه، کمالی نژاد محمد، بررسی اثر عصاره آبی کلاله گل زعفران (Crocus sativus) بر کسب و بیان حساسیت حرکتی ناشی از مورفین در موشهای سوری ماده. **فصلنامه گیاهان داروئی** ۲۱ (۱۳۸۶) ۲۶ تا ۳۵.

[3] Abe K, Saito H, Effects of saffron extract and its costituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. ***Phytother Res*** 14 (2000) 149-152.

[4] Abe K, Sugiura M, Yamaguchi S, Shoyama Y, Saito H, Saffron extract prevents acetaldehyde-induced inhibition

[5] Akhondzadeh Sh, Fallah-Pour H, Afkham Kh, Jamshidi AH, Khalighi-Cigaroudi F, Comparison of Crocus sativus L and imiperamine in the treatment of mild to moderate depression: a pilot double-blind randomized trial. ***BMC Complement Altern Med*** 4 (2004) 12-16.

[6] Cami J, Farre M, Drug addiction. ***N Engl J Med*** 349 (2003) 975-86.

[7] De Vries TJ, Shippenberg TS, Neural systems underlying opiate addiction. ***J Neurosci*** 22 (2002) 3321-25.

[8] Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Protective effect of safranal on pentylentetrazol-induced seizures in the rat: Involvement of GABAergic and opioids system. ***Phytomedicine*** 14 (2007) 256-62.

[9] Hosseinzadeh H, Younesi HM, Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice. ***BMC Pharmacol*** 15 (2002) 2-7.

[10] Hyman SE, Malenka RC, Addiction and the brain: the neurobiology of compulsion ans its persistence. ***Nat Rev Neurosci*** 2 (2001) 695-703.

[11] Johnson SW, North RA, Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local internurons. ***J Neurosci*** 12 (1992) 483-488.

[12] Koob GF, Drug of Abuse: anatomy, pharmacology, and function of reward pathways. ***Trends Pharmacol Sci*** 13 (1992) 177-184.

[13] MacDonald TM, Treatment of depression: prescription for success? ***Primary Care Psychiatry*** 3 (1997) 7-10.

[14] Noorbala AA, Akhondzadeh Sh, Tahmacebi-Pour N, Jamshidi AH, Hydro-alcoholic extract of Crocus sativus L versus fluxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. ***J Ethnopharmacol*** 97 (2005) 281-284.

[15] Nugent FS, Penick EC, Kauer JA, Opioids block long-term potentiation of inhibitory synapses. ***Nature*** 446 (2007) 1086-90.

[16] Paxinos G, Watson D, editors. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1987.

[17] Pitsikas N, Sakellaridis N, Crocus sativus L extracts antagonize memory impairments in different behavioral tasks in the rat. ***Behav Brain Res*** 173 (2006) 112-115.

[18] Sahraei H, Amiri YA, Haeri-Rohani A, Sepehri H, Salimi SH, Pourmotabbed A, Ghoshooni H, Zahirodin A, Zardooz H, Different effects of GABAergic receptors located in the ventral tegmental area on the expression of morphine-induced conditioned place preference in rat. ***Eur J Pharmacol*** 524 (2005) 95-101.

[19] Shafique Ahmad A, Ahmad Ansari M, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Nasrul Hoda M, Islam F, Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonism rat model. ***Pharmacol Biochem Be*** 81 (2005) 805 – 13.

[20] Stolerman I, Drugs of abuse: behavioral principles, methods and terms. ***Trends Pharmacol Sci*** 13 (1992) 170-176.

[21] Robinson TE, Berridge KC, Addiction. ***Annu Rev Psychol*** 54 (2003) 25-53.

[22] Zargari A, editor. ***Medical Plants.*** Tehran: Tehran University Press, 1991, p. 574-581.

of long-term potentiation in the rat dentate gyrus in vivo. ***Brain Res*** 851 (1999) 287-9.