



The aqueous extract of *Crocus sativus stigma* reduces morphine tolerance

Jamal Shams¹, Safieh Molavi², Sedigheh Marjani², Mohammad Kamalinejad³,
Homeira Zardoost², Hedayat Sahraei^{4*}, Ali Noroozadeh⁵

1. Dept. Psychiatry, Medical Faculty and Neuroscience Research Center,
Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2. Dept. Physiology, Medical Faculty, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Dept. Pharmacognosy, School of Pharmacy, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences,
Tehran, Iran

4. Dept. Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, and Applied Neuroscience Research Center,
Baghyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, P.O. Box: 19395-6558, Tehran, Iran

5. Dept. Physiology and Biophysics, Faculty of Medicine, and Behavioral Sciences Research Center,
Baghyatallah (a.s.) University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 22 Dec 2008

Revised: 15 April 2009

Accepted: 29 April 2009

Abstract

Introduction: Previous studies in male and female mice have shown that administration of saffron extract could induce reward and reduce morphine reward as investigated by place preference and behavioral sensitization. In the present study, the effects of water extract of *Crocus sativus* on the acquisition and expression of tolerance to morphine-induced hyperalgesia in female N-MRI mice (20-25 g) were investigated.

Methods: Tail Flick technique was used in the present study. Morphine tolerance was achieved by morphine injections 50 mg/kg, twice daily for 3 consecutive days. On the 4th day of the experiments, morphine tolerance was assessed in animals by injection of effective dose of morphine (10 mg/kg). The extract of the *C. sativus* was administered during or after the induction of morphine tolerance, to assess its effect on the development and expression of tolerance, respectively.

Results: Results showed that administration of morphine (1, 5, 10 and 20 mg/kg), induced significant analgesia in mice. Administration of the plant extract (1, 2.5, 5, 10, 50 and 100 mg/kg) also produced analgesia, which was statistically significant with the 10 mg/kg dose. Injection of saffron extract (1, 2.5 and 5 mg/kg) on the test day, 30 min before morphine administration (10 mg/kg) reduced the expression of morphine tolerance. However, administration of the extract (1, 2.5 and 5 mg/kg) during the induction of morphine tolerance, did not have any effect on the development of morphine tolerance.

Conclusion: It could be concluded that injection of the extract of *C. sativus* can inhibit the expression but can not alter the acquisition of morphine tolerance. In addition, administration of the extract alone could also induce analgesia.

Keywords: Morphine; *Crocus sativus*; Analgesia; Tolerance.

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

کاهش بیان تحمل به مورفین توسط عصاره آبی کلالة زعفران (*Crocus sativus*)

جمال شمس^۱، صفیه مولوی^۲، صدیقه مرجانی^۲، محمد کمالی نژاد^۳، حمیراء زردور^۲، هدایت صحرایی^{۴*}، علی نوروززاده^۵
 ۱. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه روانپزشکی و مرکز پژوهش علوم اعصاب
 ۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی
 ۳. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی
 ۴. دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله (عج)، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی
 ۵. دانشگاه علوم پزشکی بقیةالله (عج)، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات علوم رفتاری
 دریافت: ۱ دی ۱۳۸۷ بازبینی: ۲۶ فروردین ۱۳۸۸ پذیرش: ۹ اردیبهشت ۱۳۸۸

چکیده

مقدمه: تحقیقات قبلی نشان داده است که تجویز عصاره زعفران باعث بروز سرخوشی و نیز کاهش اثرات سرخوشی آور مورفین به روش ترجیح مکان شرطی شده و نیز حساسیت حرکتی در موش کوچک آزمایشگاهی نر و ماده می شود. در این تحقیق اثر عصاره آبی کلالة گل زعفران *Crocus sativus* بر کسب و بیان تحمل به اثرات بی درد مورفین در موش های کوچک آزمایشگاهی ماده نژاد N-MRI در محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم بررسی شد.

روش ها: این پژوهش با استفاده از روش پس کشیدن دم انجام شد. برای القاء تحمل، موش ها ابتدا دوزهای بالای مورفین (۵۰ mg/kg) را بصورت دوبار در روز و به مدت سه روز پیپای دریافت کردند. در روز چهارم، موش ها تحمل یافته با دوز مؤثر مورفین (۱۰ mg/kg) آزمایش می شدند. عصاره گل زعفران در حین القاء تحمل به مورفین (کسب) و یا در روز تست تحمل به مورفین (بیان) به حیوانات تزریق می شد.

یافته ها: نتایج نشان دادند که تجویز مورفین (۱ mg/kg، ۵، ۱۰ و ۲۰) سبب افزایش زمان حرکت دم در حیوانات (بی درد) گردید. تجویز عصاره گل زعفران (۱ mg/kg، ۱/۵، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰) نیز سبب بروز بی درد در حیوانات گردید که این امر در دوز ۱۰ میلی گرم عصاره از نظر آماری معنی دار بود. تجویز مورفین (۵۰ mg/kg) دوبار در روز در سه روز پیپای سبب بروز تحمل به مورفین در موش ها شد به نحوی که تجویز دوز مؤثر مورفین (۱۰ mg/kg) در این حیوانات بی درد القاء نکرد. تجویز عصاره (۱ mg/kg، ۱/۵ و ۵) ۳۰ دقیقه قبل از تجویز مورفین (۱۰ mg/kg) در روز تست تحمل، سبب مهار بیان تحمل به مورفین شد. تجویز عصاره در دوزهای فوق ۳۰ دقیقه قبل از تجویز مورفین (۵۰ mg/kg) در روزهای القاء تحمل، اثری را بر کسب تحمل به مورفین نداشت.

نتیجه گیری: از این آزمایش ها نتیجه می گیریم که تجویز عصاره زعفران می تواند بیان تحمل به اثرات بی درد مورفین را مهار کرده اما اثری بر کسب تحمل به مورفین ندارد. در ضمن، عصاره زعفران قادر به القا بی درد در حیوانات است.

واژه های کلیدی: مورفین، زعفران، بی درد، تحمل.

مقدمه

این داروها می باشد که مکانیسم های درگیر در آن بخوبی شناخته نشده اند [۴، ۹، ۱۴، ۱۹]. با این حال، آزمایش ها نشان داده اند که تغییرات وسیع سلولی و مولکولی در نواحی مختلف دستگاه عصبی در هنگام بروز تحمل به وقوع می پیوندد. برخی از این تغییرات عبارتند از غیر حساس شدن و یا تنظیم کاهشی تعداد گیرنده های اویپوئیدی در مناطق مختلف مانند نخاع،

تحمل به اثرات ضد درد اویپوئیدها، یکی از عواقب مصرف

h.sahraei@bmsu.ac.ir

* نویسنده مسئول مکاتبات:

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

تاثیر آن را بر کاهش افسردگی خفیف تا متوسط مورد تاکید قرار دادند [۱۵].

از سوی دیگر، پژوهش‌های قبلی بر توانایی ضددردی و ضدالتهابی عصاره زعفران در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نسبت به داروهای ضد درد و ضدالتهاب رایج تاکید دارد [۷]. محققان همچنین بر تاثیر کروسین در بهبود حافظه و القاء پدیده تقویت طولانی مدت (LTP) در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر تاکید دارند [۱]. با این حال تاکنون تحقیقی در مورد اثر عصاره زعفران بر القاء و بیان تحمل به اثرات ضددردی مورفین انجام نشده است. به همین دلیل در تحقیق حاضر توانایی عصاره آبی زعفران در القاء بی‌دردی و نیز بهبود و یا وخیم شدن تحمل به مورفین در موش کوچک آزمایشگاهی ماده بررسی شده است. لازم به توضیح است که موش‌های ماده پاسخدهی بهتری را به مورفین نسبت به موش‌های نر از خود نشان می‌دهند [۵].

مواد و روش‌ها

کلاله گیاه زعفران تهیه شده در سال ۱۳۸۴ شمسی توسط شرکت طلاکاران مزرعه (ترتیب حیدریه-خراسان رضوی) در اختیار این گروه قرار گرفت. زعفران به آزمایشگاه دانشکده دارو سازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل گردید و مورد شناسایی قرار گرفت و کد ۴۰۸ به آن داده شد. سپس از پودر این کلاله به روش جوشاندن (Decoction)، عصاره آبی آن گرفته شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم از پودر کلاله خشک شده در یک بالن شیشه‌ای به حجم ۲ لیتر ریخته می‌شد و به آن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده می‌شد. سپس محلول روئی از یک صافی کاغذی متغیر با قطر منفذ بین ۲۰-۳۰ میکرومتر عبور داده می‌شد. این محلول برای مدت یک روز در دستگاه بن ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و یک هفته در انکوباتور استریل با دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت تا آب عصاره نیز به آرامی تبخیر شده و پودر عصاره به جا بماند. این عصاره در سالیان حل شده و بصورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق می‌شد.

در این تحقیق از موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده نژاد

بصل‌النخاع و مغز میانی [۹]، افزایش بیوسنتز اوبیوئیدهای درونزاد مانند پرو-داینورفین و اندورفین و پرو-انکفالین [۴]، غیرحساس شدن گیرنده‌های گلوتاماتی ایونوتروپیک (NMDA و AMPA/Kinase) [۱۱، ۱۸]، افزایش کارائی گیرنده‌های متابوتروپیک گلوتاماتی و غیر حساس شدن گیرنده‌های دوپامینی [۳، ۱۶، ۲۲]، کاهش بیوسنتز دوپامین و گلوتامات [۴]، افزایش فعالیت آنزیم آدنیلات سیکلاز و در نتیجه افزایش مقدار آدنوزین منو فسفات حلقوی [۱۲] و افزایش نفوذ پذیری غشاء به یون سدیم [۱۳].

چون القاء تحمل در افراد مصرف کننده داروهای اوبیوئیدی یکی از مهمترین معضلات در بین معتادان است، یافتن راه‌هایی که بتواند عوارض تحمل به داروهای اوبیوئیدی را کاهش دهد، یقیناً در افزایش افراد مایل به ترک مواد مخدر موثر خواهد بود.

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 [۲۱]. زعفران دارای مواد چرب، املاح معدنی و موسیلاژ است. ترکیبات زیر نیز در زعفران یافت می‌شود: اسانس بی‌رنگی مرکب از ترپنها و سینثول 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 پیکروکروسستین که از هیدرولیز آن پیکروکروسین و گلوکز به دست می‌آید. کروسین که ماده اصلی رنگی زعفران است که نوعی کاروتنوئید است [۲۱].

در تحقیقات قبلی، آخوندزاده و همکاران اثر عصاره آبی-الکلی گیاه زعفران را با ایمی پرامین به عنوان یک داروی ضدافسردگی رایج در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط مطالعه کردند [۲]. نتیجه این پژوهش نشان داد که عصاره زعفران همان کارائی ایمی پرامین را بدون عوارض جانبی آن دارد. همچنین در یک پژوهش دیگر، نوربالا و همکاران [۱۵] اثر عصاره آبی-الکلی زعفران را بر بهبود افسردگی خفیف تا متوسط مطالعه کرده و اثر آن را با فلوکزتین مورد بررسی قرار داده و

سپس به حیوان ۱۰ دقیقه استراحت داده می‌شد و برای بارهای دوم و سوم همین کار تکرار می‌شد [۳].
در این تحقیق، مورفین سولفات (تماد- ایران) مورد استفاده قرار گرفت. مورفین در سالیین حل شده و با حجم ۱۰ ml/kg بصورت زیر جلدی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره زعفران نیز پس از توزین در سالیین (۱۰ ml) حل شده و بصورت داخل صفاقی مورد استفاده قرار گرفت. گروه‌های کنترل در هر قسمت سالیین (۱۰ ml/kg) را بصورت زیر جلدی یا داخل صفاقی دریافت کردند.

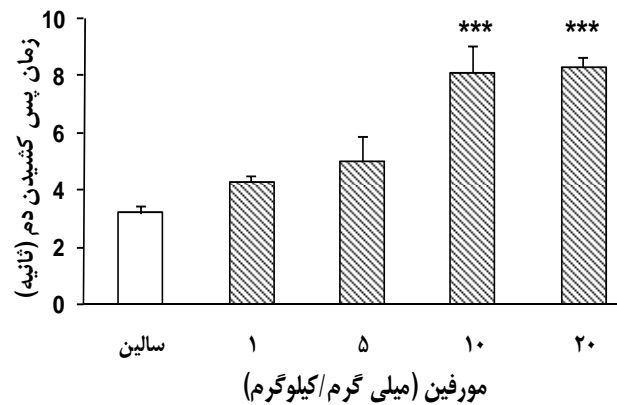
در ابتدا به منظور تعیین دوز موثر مورفین در القاء بی‌دردی، منحنی دوز- پاسخ مورفین بدست آمد. همین کار برای عصاره نیز انجام شد و در نتیجه دوزهای موثر مورفین و عصاره شناخته شدند. گروه‌های کنترل در این مرحله سالیین دریافت می‌کردند (۸ سر در هر سری).

به منظور القاء تحمل به مورفین، در سه روز متوالی و در هر روز دو نوبت به حیوانات (۸ سر در هر سری) دوز (۵۰ mg/kg) مورفین تزریق شد (۹ صبح و ۱۶ عصر). در روز چهارم وجود تحمل با تزریق دوز مؤثر مورفین (۱۰ mg/kg) بررسی شد [۱۷].

در این مرحله از آزمایش‌ها، دوزهای مختلف عصاره زعفران (۱ mg/kg، ۲/۵ و ۵) ۳۰ دقیقه قبل از تزریق مورفین (۵۰ mg/kg) در روزهای القاء تحمل به حیوانات (۸ سر در هر سری) تزریق شد. در روز تست (روز چهارم)، حیوانات تنها مورفین (۱۰ mg/kg) را دریافت و سپس مورد آزمایش قرار گرفتند.

در این مرحله از آزمایش‌ها، در روزهای القاء تحمل، مورفین (۵۰ mg/kg) به حیوانات (۸ سر در هر سری) تزریق شد. در روز تست (روز چهارم)، ابتدا دوزهای مختلف عصاره زعفران (۱ mg/kg، ۲/۵ و ۵) ۳۰ دقیقه قبل از تزریق مورفین (۱۰ mg/kg) به حیوانات تزریق و پس از ۱۵ دقیقه این حیوانات مورد آزمایش قرار گرفتند.

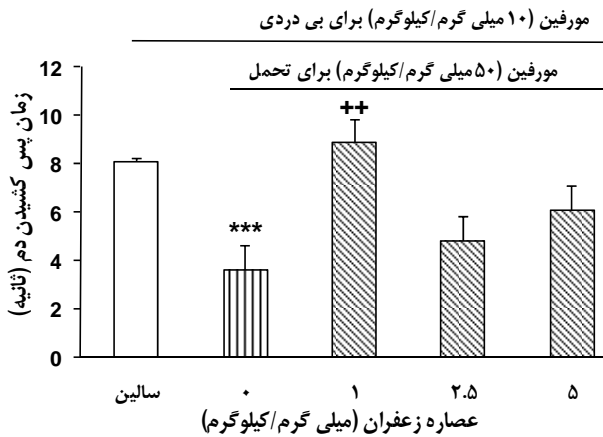
اطلاعات بدست آمده بصورت میانگین \pm انحراف معیار استاندارد (SEM \pm Mean) زمان پس کشیدن دم بیان شدند. به منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون تست T غیرمزدوج و یا آنالیز واریانس یک طرفه و بدنبال آن تست توکی استفاده شد. $P < 0/05$ مرز معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.



شکل ۱- اثر مورفین در القاء بی‌دردی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. تزریق مورفین به حیوانات باعث افزایش معنی‌دار زمان پس کشیدن دم از زیر اشعه نورانی می‌شود. تجویز سالیین اثری را در القاء بی‌دردی ندارد. این نتیجه در مورد دوز mg/kg ۱۰ و ۲۰ مورفین قویتر بود. نتایج به صورت (SEM \pm Mean) زمان پس کشیدن دم در مورد ۸ سر حیوان است. $P < 0.001$ *** تفاوت از گروه کنترل است.

N-MRI با میانگین وزنی ۲۵-۲۰ گرم (۸ سر در هر آزمایش) استفاده شد. حیوانات در قفس‌های ۱۰ تایی با دوره شبانه روزی طبیعی و در دمای ۲۳-۲۲°C، با آب و غذای کافی نگهداری می‌شدند. در هر سری آزمایش ۸ سر حیوان مورد استفاده قرار گرفت. سیکل استروس موش‌ها با روش تشخیص اسمیر واژنی تعیین و روز شروع آزمایش برای موش‌ها از نظر سیکل جنسی یکسان انتخاب شد.

برای بررسی درد در حیوانات از روش پس کشیدن دم (Tailflick) استفاده شد. در این روش از دستگاهی استفاده می‌شود که قادر است نور را با شدت انتخابی به نقطه خاصی از دم (۲ سانتی‌متر بالاتر از نوک دم) حیوان بتاباند (دستگاه HSE Model 230 ساخت Hugo Sachs Elektronik - آلمان). در این روش ابتدا نور با شدت‌های مختلف به دم حیوانات تابانده می‌شود تا شدتی از نور که سبب می‌شود تا حیوان دم خود را پس از ۲-۳ ثانیه از مسیر تابش نور کنار بکشد بدست آید. این شدت به عنوان شدت حداکثر شناخته می‌شود. در این شدت زمان ۱۰ ثانیه به عنوان زمانی که بیش از آن مجاز به تاباندن نور به دم حیوانات نبودیم (Cut-off time) در نظر گرفته شد. هر حیوان در یک دوره ۶۰ دقیقه‌ای برای سه بار تست شده و میانگین این سه بار به عنوان پاسخ حیوان در نظر گرفته می‌شد. برای این منظور ابتدا حیوان در داخل محفظه مخصوصی قرار گرفته و پس از گذشت ۱۰ دقیقه (برای کاهش اضطراب)، نور به ناحیه مورد نظر در دم حیوان تابانده می‌شد.

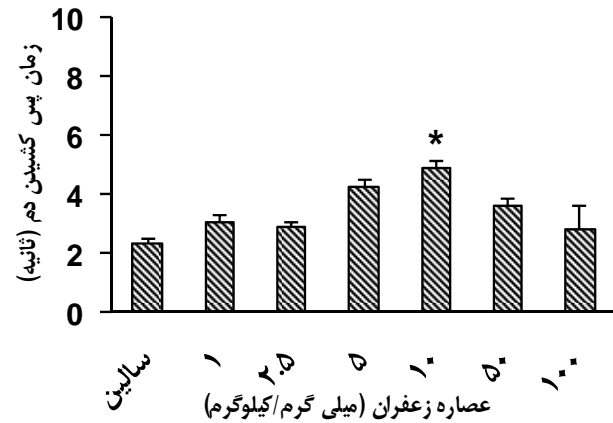


شکل ۴- اثر تجویز عصاره کللاه گل زعفران بر بیان تحمل به اثرات بی‌دردی مورفین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. نتایج به صورت $(SEM \pm Mean)$ زمان پس کشیدن دم در ۸ سر حیوان است. $P < 0.001$ *** تفاوت از گروه شاهد (سالیین) و $P < 0.01$ ++ تفاوت از گروه تحمل یافته است.

$F(4,32)=12.54, P < 0.0001$ (شکل ۱). چون دوز 10 mg/kg مورفین بهترین جواب را القاء کرد، در قسمت‌های بعدی آزمایش از این دوز به عنوان دوز مؤثر مورفین استفاده گردید.

در دور دوم آزمایش‌ها اثر عصاره زعفران در القاء بی‌دردی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که تجویز دوزهای مختلف عصاره زعفران ($1, 5, 10, 20, 50$ و 100 mg/kg) به همان روشی که برای مورفین ذکر شد، باعث القاء بی‌دردی در حیوانات می‌گردد [آنالیز-واریانس یک طرفه، $F(6,40)=4.3, P < 0.05$ (شکل ۲)]. این بی‌دردی در دوز 10 mg/kg عصاره از نظر آماری کاملاً معنی‌دار بود. از نتایج این آزمایش دوزهای $1, 20/5$ و 5 به عنوان دوزهای بی‌اثر شناخته شدند و در دنباله کار از این دوزها استفاده شد.

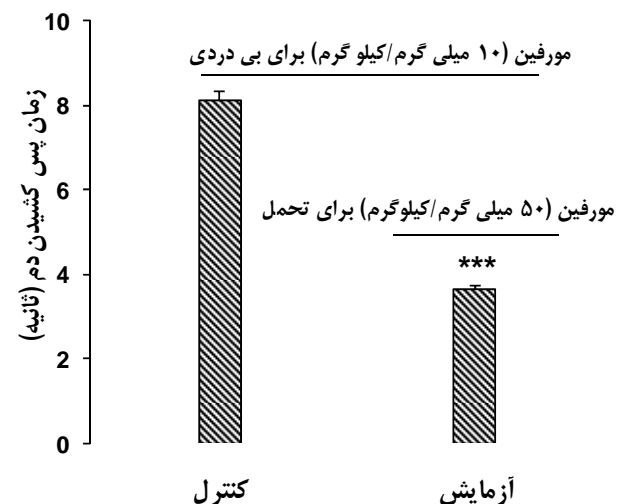
به این منظور، دو گروه از حیوانات انتخاب شدند. گروه اول به عنوان گروه آزمایشی در سه روز متوالی و هر روز دو نوبت (۹ صبح و ۱۶ عصر) مورفین (50 mg/kg) دریافت کردند. در روز چهارم، این حیوانات ابتدا دوز مؤثر مورفین (10 mg/kg) را دریافت کرده و سپس میزان بی‌دردی در آنها تست شد. گروه دوم به عنوان گروه شاهد در روزهای اول تا سوم هر روز دو نوبت سالیین (10 ml/kg) دریافت کردند و در روز چهارم دوز مؤثر مورفین (10 mg/kg) را دریافت کرده و سپس تست شدند. نتایج نشان داد که تجویز مکرر دوز زیاد مورفین سبب بروز تحمل در حیوانات شده است به نحوی که دوز مؤثر مورفین که



شکل ۲- اثر عصاره آبی کللاه گل زعفران در القاء بی‌دردی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. همچنانکه در شکل پیداست، تزریق دوزهای مختلف عصاره به حیوانات باعث تغییر معنی‌دار در زمان پس کشیدن دم شد که این اثر در دوز 10 mg/kg عصاره کاملاً معنی‌دار بود. نتایج به صورت $(SEM \pm Mean)$ زمان پس کشیدن دم در مورد ۸ سر حیوان است. $P < 0.05$ * تفاوت از گروه کنترل است.

یافته‌ها

در قسمت اول این آزمایش، موش‌ها به پنج گروه تقسیم شدند. یک گروه سالیین (به روش ذکر شده در قسمت روش‌ها) دریافت کرد و چهار گروه دیگر دوزهای مختلف مورفین ($1, 5, 10$ و 20 mg/kg) را به منظور القاء بی‌دردی دریافت کردند. نتایج نشان داد که تجویز مورفین سبب القاء بی‌دردی در دوزهای 10 و 20 mg/kg شد [آنالیز-واریانس یک طرفه،



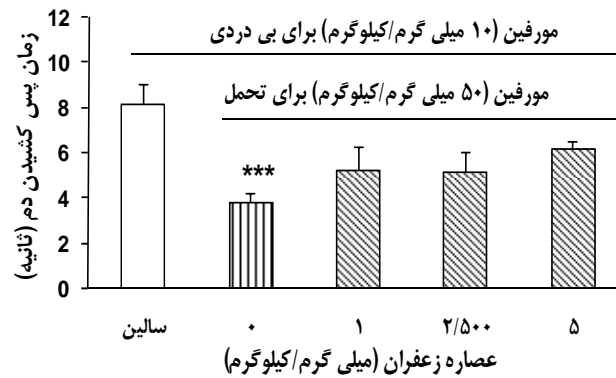
شکل ۳- اثر تجویز مزمن مورفین بر القاء بی‌دردی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. نتایج به صورت $(SEM \pm Mean)$ زمان پس کشیدن دم در مورد ۸ سر حیوان است. $P < 0.001$ *** تفاوت از گروه سالیین است.

(۱۰ ml/kg) را دریافت کردند. نتایج نشان دادند که تجویز عصاره زعفران اثری بر کسب تحمل به مورفین ندارد هر چند کاهش اندک اما از نظر آماری غیرمعنی داری در تحمل به مورفین دیده می‌شود [آنالیز-واریانس یک طرفه، $F(4,32)=1.25, P>0.05$ (شکل ۵)].

بحث

دو نتیجه از این پژوهش بدست آمد. نخست آنکه تجویز عصاره زعفران می‌تواند به القاء بی‌دردی در حیوانات منجر شود و این اثر در دوز ۱۰ mg/kg دارو بدست آمد. دوم اینکه بیان تحمل به مورفین تحت‌تاثیر عصاره زعفران از بین می‌رود. پژوهش‌های زیادی در مورد تحمل به مورفین و نیز سیستم‌های درگیر در آن انجام شده است. اما پژوهش حاضر به تداخل یکی از کم‌ضررترین داروها در این ارتباط (عصاره زعفران) پرداخته است.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تجویز حاد مورفین به حیوانات سبب القاء بی‌دردی در آنها شد. این نتیجه با نتایج قبلی همخوانی داشته و نشان می‌دهد که تجویز مورفین بصورت حاد سبب افزایش بی‌دردی در حیوانات می‌شود [۳، ۱۶، ۲۲]. اینک اثر بخشی مورفین در القاء بی‌دردی مربوط به کدام دسته از گیرنده‌های اوپیوئیدی موجود در دستگاه عصبی است نیز موضوع پژوهش‌های زیادی بوده است (برای مثال به ۱۹ رجوع شود). در این پژوهش‌ها مشخص شده است که هر سه دسته اصلی گیرنده‌های اوپیوئیدی یعنی گیرنده‌های مو- μ ، کاپا- κ ، و دلتا- δ موجود در نواحی نخاعی و فوق نخاعی دستگاه عصبی در این امر دخالت مستقیم دارند [۱۹]. به همین دلیل آنتاگونیست عمومی این گیرنده‌ها یعنی نالوکسان قادر به مهار بی‌دردی ناشی از مورفین بوده و خود نیز حساسیت به درد را در حیوانات القاء می‌کند [۱۹]. از سوی دیگر، تجویز مداوم مورفین در آزمایش حاضر توانست به القاء تحمل به این دارو منجر شود به نحوی که در حیوانات تحمل یافته به مورفین، تجویز دوز مؤثر این دارو نتوانست بی‌دردی را در حیوانات القاء کند. هرچند این تحمل قابل پیش‌بینی بود اما در روش بکار رفته، حیوانات ماده بهتر جواب دادند. این امر در مقایسه با یافته‌های قبلی [۵] قابل ارزیابی است و شاید نشان‌دهنده عملکرد قوی‌تر مورفین در این



شکل ۵- اثر تجویز عصاره کلاله گل زعفران بر کسب تحمل به اثرات بی‌دردی مورفین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. نتایج به صورت $(SEM \pm Mean)$ زمان پس‌کشیدن دم در مورد ۸ سر حیوان است. $P<0.001$ *** تفاوت از گروه شاهد (سالیین) است.

در حیوانات عادی باعث بروز بی‌دردی قوی می‌شد، در این حیوانات بی‌دردی را القاء نمی‌کند [تست T غیر مزدوج، $t_{14}=7.35, P<0.0001$ (شکل ۳)].

به منظور بررسی اثر عصاره زعفران بر بیان تحمل ناشی از مورفین، از پنج گروه حیوان استفاده شد. چهار گروه از حیوانات در روزهای القاء تحمل مورفین (۵۰ mg/kg) دریافت کردند. گروه پنجم در روزهای القاء تحمل سالیین (۱۰ ml/kg) دریافت کردند. در روز تست (روز چهارم)، سه گروه از حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از دریافت مورفین (۱۰ mg/kg) یکی از سه دوز عصاره (۱، ۲/۵ و ۵) را دریافت کردند. گروه چهارم و پنجم سالیین (۱۰ mg/kg) دریافت کرده و ۱۰ دقیقه بعد تست شدند. نتایج نشان دادند که تجویز عصاره زعفران باعث مهار اثر مورفین در بیان تحمل در حیوانات می‌گردد. این اثر در دوز ۱ mg/kg عصاره کاملاً معنی‌دار است [آنالیز-واریانس یک طرفه، $F(4,32)=1.99, P<0.05$ (شکل ۴)].

به منظور بررسی اثر عصاره زعفران بر کسب تحمل ناشی از مورفین، از پنج گروه حیوان استفاده شد. سه گروه از حیوانات در روزهای القاء تحمل، قبل از دریافت مورفین (۵۰ mg/kg) یکی از سه دوز عصاره (۱، ۲/۵ و ۵) را دریافت کردند. گروه چهارم در روزهای القاء تحمل قبل از مورفین (۵۰ mg/kg) سالیین (۱۰ ml/kg) دریافت کردند. گروه پنجم در روزهای القاء تحمل بجای مورفین (۵۰ mg/kg) سالیین (۱۰ ml/kg) دریافت کردند. در روز تست (روز چهارم)، حیوانات تنها دوز مؤثر مورفین

حیوانات در مقایسه با جنس نر باشد. در همین جا می‌توان پیشنهاد بررسی بیشتری را در مقایسه بین دو جنس ارائه داد. تجویز عصاره زعفران به موش‌های ماده باعث القاء بی‌دردی در این حیوانات شد. این اثر قبلا در موش‌های نر گزارش شده بود [۷] و نشان می‌دهد که عصاره گیاه زعفران قادر به القاء بی‌دردی در حیوانات است. با توجه به اینکه روش بکار رفته در این تحقیق درد نخاعی را مورد بررسی قرار می‌دهد، به نظر می‌رسد که اثر عصاره زعفران بیشتر با تحریک مکانیسم‌های نخاعی باشد. در مورد اینکه مکانیسم اثر عصاره زعفران از چه طریقی است نیز باید گفت که عصاره زعفران دارای اثرات گابائژیک و اوپیوئیدی است [۶]. همچنین، این عصاره دارای خواص آگونیستی گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی است [۱۰]. شاید به همین دلیل باشد که عصاره زعفران اثر تحریک رها شدن نیتریک اکساید را هم دارد [۲۰، ۲۳]. از سوی دیگر، نقش تمامی این سیستمها در بی‌دردی نخاعی اثبات شده است [۴]. بنابراین، عصاره زعفران می‌تواند با تحریک هر کدام از این سیستمها (یا همه آنها) اثر خود را القاء کرده باشد. در هر حال، سهم هر سیستم در این زمینه بایستی در پژوهش‌های دیگری مشخص شود. از سوی دیگر، عصاره زعفران با سیستم دوپامینی مغز نیز تداخل دارد و نقش این سیستم در بی‌دردی به اثبات رسیده است [۲۲]. ممکن است عصاره زعفران از این طریق اثر خود را اعمال کرده باشد. با این ترتیب، به نظر می‌رسد که اثر عصاره زعفران در القاء بی‌دردی چندان دور از ذهن نباشد. بخصوص که قبلا نیز این اثر در موش‌های نر و در روش تست فرمالین دیده شده بود [۷]. نکته مهم در یافته‌های اخیر آن است که دوز مؤثر عصاره بسیار کمتر از دوز مورد استفاده در تحقیق قبلی بوده [۷] و در ضمن، اثر عصاره کاملا وابسته به دوز است. این امر شاید به دلیل تفاوت جنسی باشد که خود نیاز به تحقیق بیشتری را طلب می‌کند. دلیل دیگر شاید تفاوت تست فرمالین با روش پس کشیدن دم از نظر مسیرهای فعال شده توسط دو روش باشد. از سوی دیگر، در پژوهش ما دوز بالاتر عصاره از خود اثری را نشان نمی‌دهد. که این امر شاید به دلیل شرایط افزایش دوز مصرفی (Over dose) عصاره باشد. به هر حال، دلایل عدم اثربخشی دوز بالای عصاره در مهار درد در پژوهش‌های بعدی بایستی مورد نظر قرار گیرد. در ادامه آزمایش‌ها، اثر تجویز عصاره زعفران بر القاء و بیان

تحمل به مورفین مورد بررسی قرار گرفت. پژوهش ما نشان داد که تجویز عصاره زعفران بصورت مزمن و در روزهای القاء تحمل اثری را بر کسب تحمل ناشی از مورفین از خود نشان نداد. هرچند در این مرحله کاهش اندکی در تحمل به مورفین دیده شد اما این تغییر از نظر آماری معنی‌دار نبود. شاید تجویز دوزهای بالاتر از عصاره زعفران بتواند اثربخش باشد که این موضوع می‌تواند در پژوهش‌های آتی بررسی شود. در حالیکه تجویز عصاره زعفران در روز تست، باعث مهار بیان تحمل به مورفین گردید. این یافته بدین معناست که در قسمت بیان مکانیسم (یا مکانیسم‌هایی) که توسط عصاره زعفران فعال می‌شوند، توانائی مهار اثرات ایجاد شده توسط مورفین را (حداقل در یک دوز) دارند و بنابراین، کارائی ویژه‌ای در مهار آن از خود نشان می‌دهند. باید دانست که عصاره زعفران دارای خواص آگونیستی گیرنده‌های گلوتاماتی است [۱۰]. در پژوهش‌های قبلی دیده شده است که آنتاگونیست‌های این گیرنده‌ها توانائی مهار تحمل به مورفین را دارند [۴، ۱۹]. اینکه آیا عصاره زعفران خواص آنتاگونیستی گیرنده‌های گلوتاماتی را دارد یا خیر هنوز روشن نیست. از سوی دیگر، محققان نشان داده‌اند که عصاره زعفران توانائی مهار بیماری افسردگی در انسان را دارد [۲، ۱۵]. با توجه به اینکه در این بیماری غلظت نوروترانسمیترهائی مانند دوپامین و نوراپینفرین در مغز کاهش می‌یابد، می‌توان حدس زد که عصاره زعفران باعث افزایش غلظت این نوروترانسمیترها در مغز می‌گردد. با توجه به تداخل سیستم دوپامینی با مورفین در القاء بی‌دردی و تحمل [۳، ۱۶، ۲۲]، به نظر می‌رسد که این مکانیسم تا حدودی راهگشای جواب بدست آمده باشد. از طرف دیگر، خواص گابائژیک و اوپیوئیدی هم از عصاره زعفران دیده شده است [۶]، به این ترتیب بایستی تداخل وسیعی از نوروترانسمیترهای مختلف را در کار عصاره بررسی کرد. شاید یک ناظر بگوید که بهتر است اجزاء عصاره جدا شده و تاثیر هر بخش در این امر جداگانه مورد بررسی قرار گیرد. این پیشنهاد البته جالب است اما یک نکته مهم در کار تحمل به مورفین خودنمائی می‌کند و آن اینکه تحمل به مورفین یک پدیده پیچیده از نظر محتوا می‌باشد که سیستم‌های نوروترانسمیتری بسیاری در آن دخالت دارند [برای مرور رجوع شود به: ۴ و ۱۹]. به همین دلیل هرگاه فقط یک سیستم نوروترانسمیتری در این امر مورد مطالعه قرار گیرد، تنها به یک جنبه کار پرداخته شده

است و سایر جنبه‌ها حذف شده است. به این ترتیب، گاهی بهتر است تحمل با دارویی که سیستم‌های نوروترانسمیتری زیادی را درگیر می‌کند تست شود که در این صورت کارائی سیستم بصورت کلی مدنظر قرار می‌گیرد.

در نهایت، این نتایج نشان می‌دهد که عصاره آبی زعفران بر تحمل به اثرات ضددردی مورفین اثر دارد و این اثر بصورت کاهش عملکرد مورفین در بیان و نه کسب تحمل می‌باشد. بنابراین شاید مصرف زعفران در زمانیکه فرد نسبت به مورفین تحمل پیدا کرده است مفید باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از جناب آقای مهندس جعفری، مدیر عامل محترم شرکت کشاورزی طلاکاران مزرعه خراسان (تربت حیدریه-خراسان رضوی) بخاطر اهدای زعفران کمال تشکر را دارند. این مقاله قسمتی از طرح تحقیقاتی مصوب مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی و مرکز تحقیقات علوم رفتاری دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) می‌باشد. محققان بدین وسیله از حمایت مالی مراکز مذکور کمال تشکر را دارند.

References

- [1] Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. *Phytother Res* 14 (2002) 149-152.
- [2] Akhondzadeh Sh, Fallah-Pour H, Afkham Kh, Jamshidi A.H., 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.
- [3] Cook CD, Barrett AC, Syvanthong C, Picker MJ. The dopamine D3/2 agonist 7-OH-DPAT attenuates the development of morphine tolerance but not physical dependence in rats. *Psychopharmacology* 152 (2000) 93-104.
- [4] Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates. *Peptides* 19 (1998) 1603-30.
- [5] Holtman JR Jr, Salon JS, Wala EP. Morphine tolerance in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 77 (2004) 517-23.
- [6] Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Protective effect of safranal on pentylentetrazol-induced seizures in the rat: involvement of GABAergic and opioids systems. *Phytomedicine* 14 (2007) 256-62.
- [7] Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. *BMC Pharmacol* 2 (2002) 7-15.
- [8] Huang KCH. *The Pharmacology of Chinese Herb*. 2th ed. CRC Press. USA. 1999. pp: 172, 474-475.
- [9] Law PY, Loh HH, Wei LN. Insights into the receptor transcription and signaling: implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology* 47 (2004) 300-311.
- [10] Lechtenberg M, Schepmann D, Niehues M, Hellenbrab N, Wunsch B, Hensel A. Quality and functionality of saffron: quality control, species assortment and affinity of extract and isolated saffron compounds to NMDA and δ_1 (Sigma-1) receptors. *Planta Medica* 74 (2008) 762-272.
- [11] McLemore GL, Kest B, Inturrisi CE. The effects of LY293558, an AMPA receptor antagonist, on acute and chronic morphine dependence. *Brain Res* 778 (1997) 120-126.
- [12] Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 287 (1997) 58-63.
- [13] Nestler EJ. Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol* 7 (1997) 713-719.
- [14] O'Brien CP. Drug addiction and drug abuse. In: Hardman JG, Limbird LE and Goodman Gilman A. *Goodman and Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill. New York. 2001, pp: 621-42.
- [15] Noorbala AA, Akhondzadeh Sh, Tahmacebi-Pour N, Jamshidi A.H. 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) 281-4.
- [16] Schmidt BL, Tambeli CH, Barletta J, Luo L, Green P, Levine JD, Gear RW. Altered nucleus accumbens circuitry mediates pain-induced antinociception in morphine-tolerant rats. *J Neurosci* 22 (2002) 6773-6780.
- [17] Shams J, Sahraei H, Faghih-Monzavi Z, Salimi SH, Fatemi SM, Pourmatabbed A, Ghoshooni H, Kamalinejad M. Effects of *Papaver Rhoeas* extract on the tolerance to analgesic effects of morphine in mice. *IJPR* 7 (2008) 141-147.
- [18] Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK801. *Science* 251 (1991) 85-87.
- [19] Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 953-990.
- [20] Yang R, Tan X, Thomas AM, Shen J, Qureshi N, Morrison DC, Van Way CW 3rd. Crocetin inhibits mRNA expression for tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic shock. *J Parenter Enteral Nutr* 30 (2006) 297-301.
- [21] Zargari A. Medicinal Plants. 6th ed. Tehran University Press. IR IRAN. 1996, pp: 574 - 578.
- [22] Zarrindast MR, Dinkoub Z, Homayoun H, Bakhtiarian A, Khavandgar S. Dopamine receptor mechanism(s) and morphine tolerance in mice. *J Psychopharmacol* 16 (2002) 261-266.
- [23] Zheng YQ, Liu JX, Wang JN, Xu L. Effects of crocin on reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to cerebral microvessels after global cerebral ischemia. *Brain Res* 1138 (2007) 86-94.