



## Protective effect of Saffron extract on morphine-induced inhibition of spatial learning and memory in rat

Haydeh Haghhighizad<sup>1\*</sup>, Ali Pourmotabbed<sup>1</sup>, Hedayat Sahraei<sup>2</sup>, Mohammad Rasoul Ghadami<sup>1</sup>,  
Sara Ghadami<sup>1</sup>, Mohammad Kamalinejad<sup>3</sup>

1. Dept. Physiology, School of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

2. Dept. Physiology and biophysics, School of Medicine, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3. Dept. Pharmacogenosy, School of Medicine, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 17 Apr 2007

Revised: 21 Sep 2007

Accepted: 14 Dec 2007

### Abstract

**Introduction:** It has been reported that acute administration of morphine impairs learning and memory processes in rats. Furthermore, recent studies showed that Saffron extract improved ethanol-induced impairments of learning behaviors in mice, and also prevented ethanol-induced inhibition of hippocampal long-term potentiation. It can be postulated that there are some common mechanisms responsible for the morphine and ethanol-induced impairments of spatial learning and memory. Therefore in the present study we investigated the effects of Saffron extract on morphine-induced learning and memory impairments in rat using Morris water maze (MWM).

**Methods:** In the current study, male rats received Saffron extract (10, 30 or 50 mg/kg, i.p.) 30 minutes before injection of morphine (10 mg/kg, i.p.) or saline for 5 consecutive days. Animals of two control groups received only morphine or saline. Spatial learning and memory parameters in the same days in the (MWM) were tested and subjected to the ANOVA and followed by Tukey's test for multiple comparisons.

**Results:** The data indicated that administration of morphine impaired formation of spatial learning and memory processes. Application of Saffron extract can improve adverse effects induced by morphine in a dose-dependent manner.

**Conclusion:** It could be concluded that the extract of Saffron can inhibit morphine-induced impairments on spatial learning and memory in rats.

**Keywords:** morphine, Saffron extract, spatial learning and memory, Morris water maze.

\* Corresponding author e- mail: h\_haghhighizad@yahoo.com  
Available online @: www.phypha.ir/ppj

## اثر حفاظتی عصاره آبی زعفران بر مهار یادگیری و حافظه فضایی ایجاد شده توسط مورفین در موش صحرایی

هایده حقیقی زاد<sup>۱\*</sup>، علی پورمتعبد<sup>۱</sup>، هدایت صحرایی<sup>۲</sup>، محمد رسول قدمی<sup>۱</sup>، سارا قدمی<sup>۱</sup>، محمد کمالی نژاد<sup>۳</sup>

۱. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه

۲. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات علوم رفتاری، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران

۳. گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران

دریافت: ۲۹ فروردین ۸۶ بازبینی: ۳۱ شهریور ۸۶ پذیرش: ۲۴ آذر ۸۶

### چکیده

**مقدمه:** قبلا گزارش شده بود که تجویز حاد مورفین یادگیری و حافظه فضایی را در موش‌های صحرایی تخریب می‌کند. از طرف دیگر نشان داده شده است که تجویز عصاره زعفران سبب بهبود اثرات تخریبی ناشی از اتانول بر فرآیندهای مذکور در موش کوچک آزمایشگاهی می‌شود. همچنین مطالعات دیگر بیانگر آن است که عصاره زعفران اثرات مهاری ناشی از اتانول بر تقویت طولانی مدت در برش‌های زنده هیپوکمپ موش‌های صحرایی نر را سرکوب می‌کند. احتمال دارد مکانیسم‌های مسئول تخریب یادگیری و حافظه فضایی ناشی از اتانول و مورفین دارای مشابهت‌هایی باشند. لذا در مطالعه حاضر اثر عصاره زعفران بر تخریب فرآیندهای یادگیری و حافظه فضایی ناشی از مورفین بررسی شد.

**روش‌ها:** در این مطالعه موش‌های صحرایی نر بمدت ۵ روز متوالی تحت تجویز عصاره زعفران (۱۰ mg/kg, i.p. یا ۳۰ یا ۵۰) سی دقیقه قبل از تجویز مورفین (۱۰ mg/kg, i.p.) یا سالین قرار گرفتند. حیوانات گروه کنترل فقط مورفین یا سالین دریافت نمودند. شاخصه‌های یادگیری و حافظه فضایی همزمان در روزهای فوق‌الذکر در ماز آبی مورفین بررسی شد. تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصله به روش ANOVA انجام شد.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد تجویز مورفین یادگیری و حافظه فضایی را تخریب می‌کند که با تجویز عصاره زعفران به صورت وابسته به دوز بهبود می‌یابد.

**نتیجه‌گیری:** تجویز عصاره زعفران می‌تواند اثرات مهاری مورفین در روند یادگیری و حافظه فضایی موش صحرایی را بهبود بخشد.

**واژه‌های کلیدی:** مورفین، عصاره زعفران، یادگیری و حافظه فضایی، ماز آبی مورفین

### مقدمه

وابسته به زمان تجویز، دوز تجویز دارو و مدل بررسی حافظه در حیوانات می‌باشد [۳۶]. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که تجویز مورفین موجب تخریب یادگیری احترازی فعال می‌شود و این اثر وابسته به دوز مورفین است [۱۲]. نتایج برخی از مطالعات نشان می‌دهد که تجویز مورفین به موش‌های صحرایی باعث ایجاد نقص یادگیری در ماز آبی مورفین می‌شود [۲۶، ۲۵]. از طرفی در مطالعه‌ای دیده شده که مورفین به خاطر آوری حافظه را در روش احترازی غیر فعال تسهیل می‌کند و این اثرات بطور

مورفین یکی از اصلی‌ترین ترکیبات تریاک است که بمیزان ۳٪ تا ۲۳٪ در آن یافت می‌شود [۴]. بعضی مطالعات نشان داده‌اند که مورفین می‌تواند اثرات متفاوتی در فرآیند یادگیری و حافظه داشته باشد، به طوری که اثرات مورفین بر این فرآیندها

h\_haghighizad@yahoo.com

\* نویسنده مسئول مکاتبات:

www.phypha.ir/ppj

وبگاه مجله:

کامل بوسیله نالوکسان آنتاگونیزه می‌شود [۳۴].

زعفران (*Crocus Sativus L.*) گیاهی است چند ساله از تیره زنبق به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی متر و دارای پیازی سخت و مدور و گوشت دار و پوشیده از غشاءهای نازک و قهوه‌ای رنگ است. 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. زعفران دارای مواد چرب، املاح معدنی و موسیلاژ است، همچنین حاوی اسانس بی‌رنگی مرکب از ترپین‌ها و سینئول است که بوی زعفران مربوط به آن می‌باشد. زعفران همچنین دارای ترکیبی به نام پیکروکروسین است که یک هتروزیئید تلخ است و در آب و الکل به راحتی حل می‌شود. از ترکیبات دیگر زعفران می‌توان به پیکروکروستین اشاره کرد که از تجزیه آن اسید فرمیک و یک فتالین بدست می‌آید. زعفران همچنین دارای کروسین می‌باشد که ماده رنگی زعفران را تشکیل می‌دهد و از هیدرولیز آن گلوکز و کروسین بدست می‌آید. زعفران بعلاوه داشتن اسانس، اثر محرک بر سلسله اعصاب دارد و از نظر درمانی دارای اثر مسکن بر اعصاب سطحی بدن است [۳]. این گیاه بعنوان یک داروی محلی جهت اهداف گوناگونی چون برانگیختن میل جنسی، ضد اسپاسم، خلط آور، در درمان بیماری‌های تنفسی، گوارشی، کبدی و طحال، بیماری‌های مفصلی و بعنوان تسهیل کننده زایمان در طب سنتی کاربرد داشته است [۱]. مطالعات فارماکولوژیک جدید نشان داده است که عصاره زعفران دارای خواص ضد سرطان [۸]، پائین آورنده چربی خون [۲۱] و ضد تشنج [۱۷]، ضد درد و ضد التهاب [۱۸] بوده و بعنوان گیرنده رادیکال‌های آزاد نیز عمل می‌کند [۱۴]. شواهد پیشنهاد می‌کند که استرس‌های سلولی القاء شده بوسیله رادیکال‌های آزاد مسئول انواع بیماری‌های اعصاب مرکزی مانند آلزایمر و پارکینسون و حالات پاتولوژیکی نظیر ischemia و excitotoxicity هستند. بیماری‌های نورودژنراتیو سیستم اعصاب مرکزی اغلب همراه با آسیب به حافظه و سایر اعمال شناختی است، این آسیب احتمالاً بدلیل مرگ انتخابی نورون‌ها در قشر مغز و هیپوکمپ و نواحی از مغز که مرتبط با یادگیری و حافظه هستند، می‌باشد [۹]. در رابطه با اثرات درمانی زعفران در برخی بیماری‌ها نظیر آلزایمر [۳۱]، پارکینسون [۱۱] و افسردگی [۲۹] در انسان مطالعاتی انجام گرفته است. بعنوان مثال در مورد کاهش افسردگی در انسان نشان داده شده است که

عصاره گیاه زعفران کارایی معادل ایمی پرامین [۱۳] و فلوکستین [۲۹] دارد. در مدل‌های حیوانی نیز صحرایی و همکاران نشان دادند که عصاره کلاله گل زعفران سبب تضعیف کسب و تقویت بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موش سوری می‌گردد [۶]. برخی مطالعات نشان داده‌اند که عصاره این گیاه فعالیت‌های یادگیری و حافظه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بعنوان مثال در مطالعه‌ای نشان داده شده است که عصاره زعفران نقصان عملکرد القاء شده توسط اسکاپولامین را در آزمون رفتار یادگیری احترازی مهار می‌کند [۳۲]. همچنین Abe و همکاران نیز نشان دادند کروسین به عنوان ماده اصلی فعال موجود در عصاره زعفران، مسئول مهار اثر تخریبی اتانول بر حافظه است، آن‌ها نشان دادند که این عصاره مانع مهار ناشی از اتانول بر القاء تقویت طولانی مدت در ناحیه CA1 هیپوکامپ در موش صحرایی می‌شود [۱۰].

از مجموع تحقیقات فوق چنین بر می‌آید که مورفین می‌تواند اثرات تخریبی بر فرآیندهای یادگیری و حافظه فضائی داشته باشد و با توجه به اثرات فراوان عصاره زعفران بخصوص بر سیستم اعصاب مرکزی و برخی فرآیندهای یادگیری و حافظه، در تحقیق حاضر بر آن شدیم که اثرات عصاره این گیاه را بر تخریب فرآیندهای یادگیری و حافظه فضائی ناشی از تجویز حاد مورفین در موش صحرایی نر و با استفاده از ماز آبی موریس بررسی کنیم.

## مواد و روش‌ها

زعفران توسط شرکت طلاکاران مزرعه (تربت حیدریه- خراسان رضوی) تهیه شده و به آزمایشگاه دانشکده دارو سازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل گردیده و مورد شناسائی قرار گرفت و با کد ۴۰۸ ثبت گردید. سپس پودر کلاله زعفران تهیه و در دستگاه تقطیر، عصاره آبی آن گرفته شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم از پودر کلاله خشک شده در یک مخزن شیشه‌ای 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 عبور داده می‌شد و برای مدت یک هفته در دستگاه بن ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار می‌گرفت تا آب عصاره نیز به آرامی تبخیر

شده و پودر عصاره به جا بماند. با این روش از هر ۱۰۰ گرم پودر کلاله، ۲۵ گرم عصاره بدست می‌آید. در آزمایشات ما این عصاره در سالیان حل شده و بصورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق می‌شد.

در این آزمایش تعداد ۵۴ سر موش صحرایی نر نژاد N-MRI در محدوده وزنی ۲۵۰-۳۵۰ گرم در شروع آزمایش، مورد بررسی قرار گرفتند. حیوانات به تعداد ۲-۳ سر در هر قفس قرار گرفته و در معرض سیکل نور- تاریکی ۱۲ ساعته و درجه حرارت کنترل شده محیط نگهداری می‌شدند. آزمایشات در مرحله نوری دوره ۲۴ ساعته انجام می‌شد و حیوانات به غیر از زمان آزمایش دسترسی کافی به آب و غذا داشتند.

سپس حیوانات به گروه‌های زیر تقسیم شده و در هر گروه ۶-۷ سر موش مورد آزمایش قرار گرفت. A- گروه سالیان- سالیان، B- گروه‌های زعفران-سالیان شامل زیرگروه‌های: الف - زعفران ۱۰- سالیان ب - زعفران ۳۰-سالیان ج - زعفران ۵۰- سالیان، C- گروه سالیان- مورفین، D - گروه‌های زعفران- مورفین شامل زیر گروه‌های: الف - زعفران ۱۰-مورفین ب - زعفران ۳۰-مورفین ج - زعفران ۵۰-مورفین. حیوانات در کلیه گروه‌ها به مدت ده روز در ماز آبی مورفین تحت آزمایش قرار گرفتند، که در پنج روز اول handling انجام می‌شد. حیوانات گروه A از روز ششم تا دهم ساعت ۸:۳۰ و ۹ صبح دو بار تحت تجویز نرمال سالیان قرار گرفتند. حیوانات گروه B در روزهای فوق الذکر ساعت ۸:۳۰ صبح عصاره آبی کلاله زعفران با دوز ۱۰ یا ۳۰ یا ۵۰ mg/kg و ۳۰ دقیقه بعد نرمال سالیان دریافت نمودند. حیوانات گروه C در روزهای مذکور و با توالی مطروحه در گروه‌های A و B ابتدا نرمال سالیان و سپس مورفین سولفات ۱۰ mg/kg دریافت نمودند. در حیوانات گروه D در روزهای مذکور ابتدا عصاره آبی کلاله زعفران با دوز ۱۰ یا ۳۰ و یا ۵۰ mg/kg و سپس مورفین سولفات ۱۰ mg/kg تجویز شد. لازم به ذکر است که در کلیه گروه‌های مورد مطالعه حجم تزریق نهائی در هر بار تزریق ۱ ml/kg بود و تزریقات بصورت داخل صفاقی انجام شد.

حیوانات انجام شده و از روز ششم تا دهم شامل دو مرحله آزمایشات اصلی انجام شد. بدین ترتیب که مرحله آموزش حیوانات از روز ششم تا نهم به منظور بررسی شاخصه‌های یادگیری فضائی انجام شد و در روز آخر مرحله probe trial بمنظور مطالعه شاخصه‌های حافظه فضائی انجام گردید. در این تحقیق از شاخصه فاصله شنا در طی روزهای آموزش جهت بررسی روند یادگیری فضائی استفاده شد. چنانچه حیوانات یک گروه موفق می‌شدند در روزهای پایانی آموزش نسبت به روز اول با طی فاصله کمتر سکوی پنهان در آب را پیدا نمایند روند یادگیری در آن‌ها مثبت ارزیابی می‌شد. جهت بررسی میزان تثبیت حافظه، از شاخصه در صد مسافت طی شده در ربع دایره هدف در مرحله probe trial استفاده شد. استفاده از شاخصه‌های فوق الذکر در ماز آبی مورفین بعنوان پارامترهای ارزیابی یادگیری و حافظه فضائی قبلا گزارش شده بود [۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲]. لازم به ذکر است که سرعت شنای حیوانات نیز به عنوان شاخصه‌ای از توانائی حرکتی حیوانات مورد ارزیابی قرار گرفت.

تفاوت در میانگین فاصله شنا و سرعت شنای حیوان در روزهای آموزش و مسافت طی شده توسط حیوان در ربع دایره هدف در مرحله probe trial، توسط کامپیوتر ثبت شده و با روش‌های آماری t-test و آنالیز واریانس مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین از آنالیز Post hoc از نوع تست Tukey جهت تعیین سطح تفاوت معنی دار بین گروه‌ها استفاده شد. در کلیه آزمایشات حداقل سطح تفاوت معنی دار که از لحاظ آماری قابل قبول باشد  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

نتایج نشان داد که حیوانات گروه سالیان- سالیان موفق به یادگیری شدند [ $F_{(3,18)}=8.67, P < 0.001$ ]. بطوریکه بین میانگین مسافت شنا در روز اول با روزهای سوم ( $P < 0.01$ ) و چهارم آموزش ( $P < 0.001$ ) تفاوت معنی دار وجود دارد.

اما بررسی آماری نشان داده است که حیوانات گروه زعفران ۱۰-سالیان در طی روزهای آموزش یادگیری نداشتند [ $F_{(3,15)}=1.79, P < 0.019$ ].

از طرفی نتایج آماری گروه زعفران ۳۰-سالیان نشان داد که

حیوانات کلیه گروه‌ها به مدت ده روز جهت بررسی روند یادگیری و حافظه فضائی در ماز آبی مورفین به روشی که قبلا گزارش شده [۲] مورد مطالعه قرار گرفتند. به طور خلاصه در این روش به مدت ۵ روز handling و آماده سازی

داده است که حیوانات گروه زعفران ۵۰- سالین نیز موفق به یادگیری شدند [ $F_{(3,18)}=37.04, P<0.00001$ ]. بطوری که مسافت شنا در روز اول نسبت به روز دوم ( $P<0.01$ )، روز سوم و چهارم ( $P<0.001$ ) تفاوت معنی داری دارد.

در ادامه بررسی آماری مسافت شنا در طی روزهای آموزش بین چهار گروه آزمایش مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد بطور کلی بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت وجود ندارد [ $F_{(3,22)}=1.25, P=0.31$ ] (شکل A-۱).

همچنین آزمون آماری نشان داد که بین میانگین سرعت شنای حیوانات در گروه‌های فوق الذکر اختلاف معنی دار وجود ندارد [ $F_{(3,12)}=2.87, P=0.08$ ] (شکل A-۲).

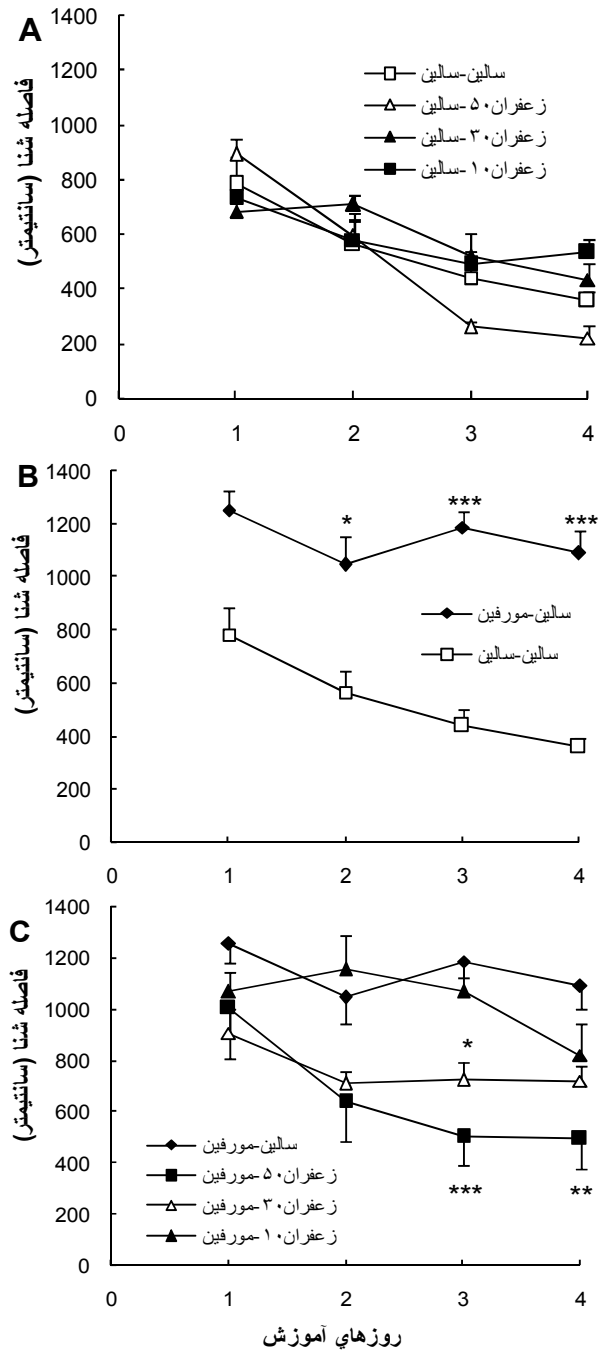
در خصوص شاخصه درصد مسافت طی شده در ربع دایره هدف در مرحله probe trial، نتایج نشان می‌دهد که در این شاخصه نیز تفاوت معنی داری بین گروه‌های مورد مطالعه وجود ندارد [ $F_{(3,22)}=0.91, P=0.45$ ] (شکل A-۳).

اما در رابطه با مقایسه عملکرد گروه‌های سالین-سالین و سالین-مورفین، همانگونه که قبلا نیز بیان شد حیوانات گروه سالین-سالین در طی روزهای آموزش موفق به یادگیری شدند، در صورتیکه حیوانات گروه سالین-مورفین هیچگونه یادگیری در طی روزهای آموزش نداشتند [ $F_{(3,18)}=1.33, P=0.29$ ]. همچنین تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بین گروه سالین-سالین و سالین-مورفین اختلاف آماری وجود دارد. این اختلاف در روز دوم ( $P<0.05$ ) و در روزهای سوم و چهارم ( $P<0.001$ ) معنی دار است (شکل B-۱).

در رابطه با سرعت شنا نیز بررسی‌های آماری نشان داد که میانگین سرعت شنا در گروه سالین-مورفین کمتر از سالین-سالین می‌باشد ( $P<0.001$ ) (شکل B-۲).

اما بررسی نتایج نشان داد که میانگین شاخصه مسافت طی شده در ربع دایره هدف در مرحله probe trial در گروه سالین-مورفین به میزان معنی‌داری ( $P<0.001$ ) کمتر از گروه سالین-سالین است (شکل B-۳).

از طرف دیگر در خصوص مقایسه عملکرد حیوانات گروه‌های سالین-سالین-مورفین و زعفران-مورفین، همانطور که قبلا اشاره شد حیوانات گروه سالین-مورفین در طی روزهای آموزش یادگیری نداشتند. از طرفی نتایج گروه زعفران ۱۰-مورفین نشان داد که این حیوانات در طی روزهای آموزش موفق به یادگیری



**شکل ۱- مقایسه میانگین فاصله شنا در طی روزهای آموزش، بین گروه‌های سالین-سالین با گروه‌های زعفران-سالین (A)، بین گروه‌های سالین-سالین و سالین-مورفین (B) و بین گروه سالین-مورفین و گروه‌های زعفران-مورفین (C) (n=۶-۷)، \* $P<0.05$ ، \*\* $P<0.01$  و \*\*\* $P<0.001$  نسبت به گروه سالین-سالین در شکل B و نسبت به گروه سالین-مورفین در شکل C**

حیوانات این گروه در طی روزهای آموزش یادگیری داشته‌اند [ $F_{(3,15)}=11.70, P<0.001$ ]. بطوریکه میانگین مسافت شنا در روز اول با روزهای سوم ( $P<0.05$ ) و چهارم ( $P<0.01$ ) اختلاف معنی دار دارد. همچنین نتایج نشان

سوم و چهارم معنی دار ( $P < 0.05$ ) است.

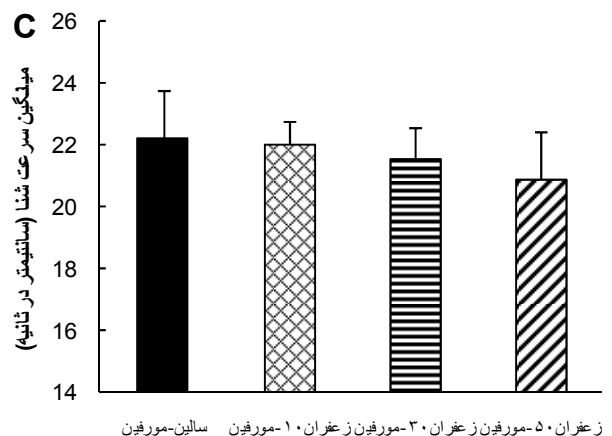
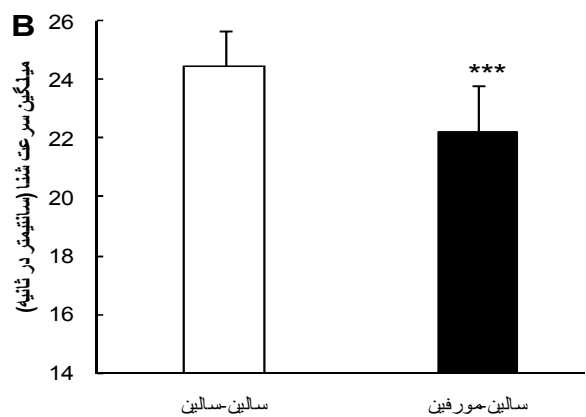
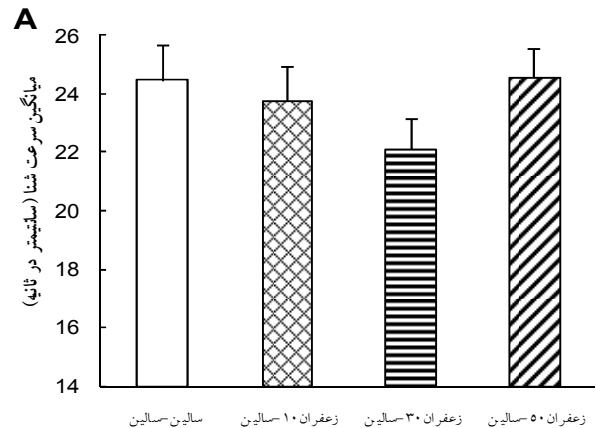
بررسی آماری همچنین نشان داد که بین گروه‌های آزمایش [F(3,24)=7.40,  $P < 0.01$ ] و بین روزهای آموزش [F(3,72)=8.27,  $P < 0.0001$ ] و بر همکنش گروه‌ها و روزهای آموزش [F(9,72)=2.13,  $P < 0.05$ ] اختلاف معنی دار وجود دارد. این تفاوت بین گروه‌های زعفران ۱۰-مورفین و زعفران ۵۰-مورفین در روز دوم آموزش ( $P < 0.05$ ) معنی دار است. همچنین این اختلاف در روز سوم آموزش بین گروه‌های سالیین-مورفین با زعفران ۳۰-مورفین ( $P < 0.05$ ) و بین گروه‌های سالیین-مورفین و زعفران ۵۰-مورفین ( $P < 0.001$ ) معنی دار است. از طرف دیگر بین گروه زعفران ۱۰-مورفین و زعفران ۵۰-مورفین در همین روز ( $P < 0.01$ ) اختلاف معنی دار وجود دارد. در روز چهارم آموزش هم بین گروه سالیین-مورفین و زعفران ۵۰-مورفین ( $P < 0.01$ ) اختلاف وجود دارد (شکل C-۱).

در رابطه با سرعت شنای حیوانات بررسی آماری نشان داد که بین گروه سالیین-مورفین و گروه‌های زعفران-مورفین اختلاف معنی داری وجود ندارد [F(3,12)=6.23,  $P = 0.24$ ] (شکل C-۲).

همچنین بررسی آماری نشان داد که بطور کلی در شاخصه مسافت طی شده در ربع دایره هدف در مرحله probe trial: بین گروه‌های مورد مطالعه تفاوت وجود دارد [F(3,24)=6.23,  $P < 0.01$ ]. نتایج آزمون‌های آماری نشان داد که این تفاوت بین گروه سالیین-مورفین و گروه زعفران ۳۰-مورفین ( $P < 0.05$ ) و زعفران ۵۰-مورفین ( $P < 0.01$ ) معنی دار است (شکل C-۳).

## بحث

نتایج این تحقیق نشان داد که تجویز مورفین باعث تخریب روند یادگیری و حافظه فضائی در مقایسه با گروه سالیین-سالیین می‌شود. از طرف دیگر تجویز عصاره زعفران به تنهایی تأثیر معنی‌داری بر فرآیندهای مذکور ندارد. همچنین تجویز زعفران تخریب یادگیری و حافظه ناشی از مورفین را بصورت وابسته به دوز بهبود بخشیده بود. در رابطه با سرعت شنا نیز می‌توان گفت که زعفران به تنهایی تأثیری بر این فرآیند نداشت، ولی تجویز مورفین باعث کاهش آن شد که این کاهش توسط عصاره

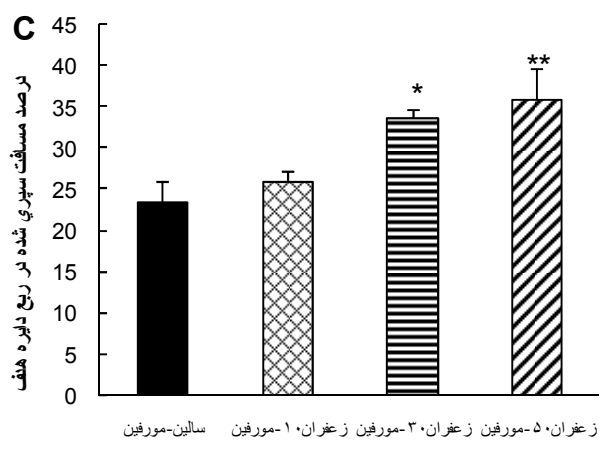
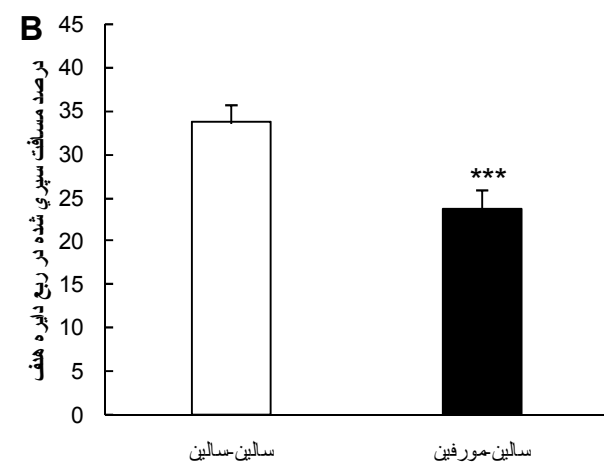
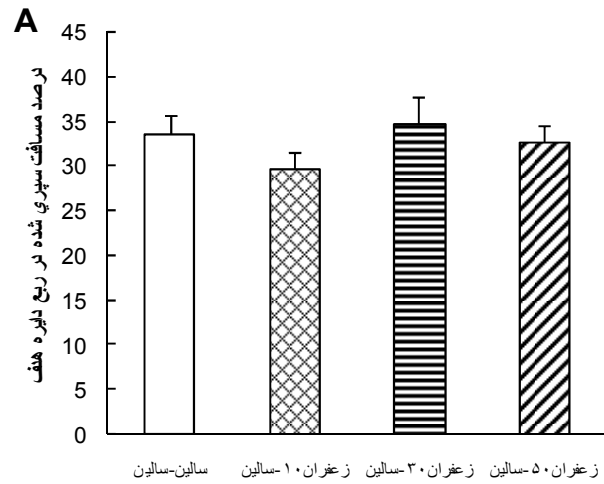


شکل ۲- مقایسه میانگین سرعت شنای حیوانات در طی روزهای آموزش بین گروه‌های مورد مطالعه ( $n=6-7$ ),  $***P < 0.001$

شدند [F(3,18)=4.40,  $P < 0.05$ ]. بطوریکه تفاوت بین روز دوم و چهارم آموزش ( $P < 0.05$ ) معنی دار است. نتایج گروه زعفران ۳۰-مورفین هم نشان داد که حیوانات این گروه نیز در طی روزهای آموزش موفق به یادگیری شدند [F(3,18)=8.30,  $P < 0.01$ ]. بطوریکه تفاوت بین روز اول با روزهای دوم و سوم و چهارم معنی دار ( $P < 0.01$ ) است. همچنین حیوانات گروه زعفران ۵۰-مورفین نیز در طی روزهای آموزش یادگیری داشتند [F(3,18)=4.19,  $P < 0.05$ ]. این تفاوت بین روز اول با روزهای

[۲]. همچنین در تحقیق حاضر مشخص شد که تجویز مورفین با پروتکل حاضرمانع ایجاد یادگیری فضائی می‌شود. در مرحله probe trial نیز حیوانات گروه سالیین-سالیین کارائی کمتری را نسبت به گروه سالیین-سالیین نشان دادند، این یافته نیز در تایید نتایج مطالعات محققین دیگر می‌باشد، زیرا قبلا هم گزارش شده که تجویز مورفین موجب ایجاد نقص در یادگیری فضائی در مدل ماز آبی مورفین می‌شود [۳۳]. همچنین گزارش شده که تجویز آنتاگونیست اپیوئیدها، موجب بهبود فراگیری موش‌های ماده در ماز آبی مورفین می‌شود [۲۰]. مطالعات دیگری هم نشان داده‌اند که دریافت حاد اپیوئیدها یادگیری و حافظه را تخریب می‌کند [۱۹]. شاید بتوان تداخل عمل مورفین با سیستم کولینرژیک و تبعات ناشی از آن را در ایجاد پاسخ حاصله موثر دانست، زیرا گزارش شده تجویز حاد و یا تجویز مزمن مورفین با دوزهای افزایش یابنده از طریق مهار سیستم کولینرژیک در هیپوکمپ، می‌تواند باعث سرکوب روند تثبیت حافظه فضائی شود. فیبرهای کولینرژیک مذکور دارای اثر محرکی بر فیبرهای گلوتاماترژیک است و تحریک این مسیر در ناحیه CA1 هیپوکمپ سبب تحریک گیرنده‌های NMDA در این ناحیه می‌شود. از طرف دیگر تحریک مسیرهای اپیوئیدرژیک بوسیله مهار پیش سیناپسی می‌تواند باعث سرکوب رهاش استیل کولین، و در نتیجه مهار روند تثبیت حافظه شوند [۲۴]. همچنین گزارش شده که فعال شدن گیرنده‌های گلوتاماتی از جمله گیرنده‌های NMDA در روند یادگیری و حافظه فضائی نقش دارند [۲۸].

Morris و همکاران گزارش نمودند که تجویز آنتاگونیست‌های گیرنده‌های NMDA به داخل بطن‌های جانبی باعث مهار روند یادگیری و حافظه فضائی در مدل ماز آبی مورفین در موش‌های صحرائی می‌شود [۲۸]. محققین دیگر نشان داده‌اند که تزریق آنتاگونیست NMDA بویژه AP5 در نواحی مختلف مغز مانند آمیگدال و هیپوکمپ سبب تخریب یادگیری می‌شود [۱۶]. در مورد وساطت عمل گیرنده‌های NMDA در مسیرهای اپیوئیدرژیک در نواحی مختلف مغز مخصوصا هیپوکمپ نیز گزارشاتی ارائه شده است. بعنوان مثال نشان داده شده است که دینورفین می‌تواند مستقیما کانال گیرنده NMDA را در موش‌های صحرائی بلوک کند و پیشنهاد شده که این ماده مدت زمان باز ماندن کانال NMDA را بدون تغییر در کندانسانس آن کاهش می‌دهد [۲۳]. از مجموع



شکل ۳- مقایسه در صد مسافت طی شده در ربع دایره هدف در مرحله probe trial در گروه‌های مورد مطالعه (n=۶-۷)، \*P<0.05 و \*\*P<0.01 و \*\*\*P<0.001 نسبت به گروه سالیین-سالیین در شکل B و نسبت به گروه سالیین-مورفین در شکل C

زعفران قابل بازگشت نبود.

قسمتی از نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده وقوع یادگیری در حیوانات گروه سالیین-سالیین بود که موافق تجربیات قبلی است

سرکوب کند و کروسین بعنوان ماده موثره موجود در عصاره زعفران می‌تواند، اثر مهارى اتانول بر جریانات غشائی که از طریق گیرنده‌های NMDA اعمال می‌شود را، سرکوب نماید [۱۰]. از طرفی همچنانکه قبلا نیز اشاره شد مورفین نیز می‌تواند با سرکوب مسیره‌های کولینرژیک و ممانعت از تحریک گیرنده‌های NMDA در ناحیه CA1 هیپوکمپ مانع از تثبیت حافظه شود، لذا شاید عصاره زعفران با تداخل در عملکرد مورفین در این سطح موثر باشد. استفاده از داروهای آتاگونست گیرنده‌های NMDA در حضور عصاره زعفران می‌تواند به روشن شدن این بحث کمک کند. احتمال دیگر اینکه ممکن است این دو ماده (زعفران و مورفین) با مکانیسم‌های کاملا جداگانه‌ای کار خود را انجام دهند ولی در کار یکدیگر تداخل عمل ارگانیک داشته باشند. از طرف دیگر شاید بتوان نقش وساطت عمل سیستم‌های نوروترانسمیتری دیگری را در ایجاد پاسخ حاصله موثر دانست زیرا محققین دیگری نشان داده اند 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 می‌شد، از کاهش دوپامین مغز، افزایش عوامل اکسید کننده و تخریب نورن‌های دوپامینی جلوگیری کرده و سطح دوپامین را در استریاتوم بالا می‌برد [۱۱]. تحقیقات نشان داده است که گیرنده‌های دوپامینی نقش مهمی در فرآیندهای یادگیری دارند [۳۰]. پلاستیسیته هیپوکمپی بشکل LTP و LTD لازمه ایجاد حافظه فضائی و اکتساب اطلاعات جدید می‌باشد و دوپامین قویترین داوطلب برای وساطت اکتساب جدید و پلاستیسیته سیناپسی در ناحیه CA1 هیپوکمپ است [۲۲]. مرکز اصلی دوپامینرژیک مغز ناحیه تگمنتوم شکمی Ventral Tegmental Area (VTA) می‌باشد [۷] و تصور می‌شود که این ناحیه با هیپوکمپ تشکیل چرخه‌ای را می‌دهند که ورود اطلاعات را به حافظه طولانی مدت کنترل می‌کند. تحریکات جدید باعث آتش شدن سلول‌های ناحیه VTA که به هیپوکمپ می‌روند شده که با واسطه گیرنده‌های D1/D5 در سلول‌های پیرامیدی هیپوکمپ تظاهر می‌کند و فعالیت این گیرنده‌ها از طریق پایین آوردن آستانه القا LTP و یا LTD در انواعی از یادگیری که با پلاستیسیته سیناپسی مرتبط هستند، بر این فرآیندها موثرند

مطالعات فوق چنین بر می‌آید که مورفین شاید مستقیما از طریق تاثیر بر گیرنده‌های NMDA و یا غیر مستقیم از طریق تداخل با عملکرد سیستم کولینرژیک بتواند سبب تخریب فرآیندهای یادگیری و حافظه شود.

قسمت دیگری از نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصاره زعفران در دوزهای مختلف به تنهایی تاثیر معنی‌داری بر فرآیند یادگیری و حافظه فضائی ندارد، این یافته با تحقیقات قبلی مطابقت دارد، چنانچه Zhang و همکاران نیز نشان دادند که تجویز عصاره الکلی زعفران بصورت خوراکی تاثیری بر رفتارهای یادگیری احترازی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی ندارد [۳۷]. و سرانجام قسمت اصلی نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که عصاره زعفران قبل از تجویز روزانه مورفین، می‌تواند مانع از ایجاد نقص یادگیری فضائی ناشی از تجویز مورفین شود، بطوریکه مسافت شنا در طی روزهای آموزش در گروه‌های زعفران-مورفین نسبت به گروه سالین-مورفین کاهش یافته است، این تفاوت بطور معنی‌داری در دوزهای ۳۰ و ۵۰ میلی گرم زعفران مشاهده می‌شود. از طرف دیگر در مرحله probe trial درصد مسافت سپری شده در ربع دایره هدف در گروه‌های دریافت کننده زعفران، خصوصا در دوزهای ۳۰ و ۵۰ میلی گرم بیشتر از گروه سالین-مورفین است. لازم به ذکر است که ظاهرا این اثرات بصورت رقابتی ایجاد می‌شود، زیرا با افزایش دوز عصاره زعفران، اثر آن در سرکوب اثرات مورفین افزایش می‌یابد.

در توجیه تداخل عمل زعفران می‌توان به تحقیقی اشاره نمود که در آن نشان داده شده، تجویز زعفران بصورت حاد و در روز آزمایش و یا بصورت مزمن و در روزهای القا حساسیت، باعث کاهش بیان و کسب حساسیت حرکتی ناشی از مورفین شده، این یافته بدین معناست که شاید مکانیسم یا مکانیسم‌هایی که توسط زعفران فعال می‌شوند، توانائی مهار اثرات ایجاد شده توسط مورفین را دارند، شاید هم این دو (مورفین و زعفران) دارای تشابه مکانیسمی خاصی باشند، برای مثال دارای جایگاه‌های عمل مشترکی باشند [۵]. در همین رابطه Abe و همکاران نشان دادند بعنوان یک مکانیسم احتمالی اثرات اتانول بر تخریب حافظه، این ماده می‌تواند تحریک سیناپسی که بوسیله گیرنده‌های NMDA وساطت می‌شود را مهار و در نتیجه القا LTP هیپوکمپی را



## منابع

- [۱] امامی احمد، جوادی بهجت، جستارهایی پیرامون زعفران در امهات کتب طب اسلامی، *سومین همایش ملی زعفران ایران*، ۱۳۸۳، صفحات ۲۰۰ تا ۲۱۱.
- [۲] پورمتعبد علی، طهماسیان مسعود، شاهی مریم، کرمی دارابنخانی حسین، فتح الهی یعقوب، اثر وابستگی به مورفین بر یادگیری و حافظه صحرایی. *فیزیولوژی و فارماکولوژی* ۹ (۱۳۸۴) ۱۲۷ تا ۱۳۸.
- [۳] زرگری علی، *گیاهان دارویی* چاپ ششم، انتشارات دانشگاه تهران، جلد چهارم، ۱۳۷۵، صفحات ۵۷۴ تا ۵۷۸.
- [۴] صحرایی هدایت، زمانی علی ملا، قشونی حسن، امامی خوانساری نسرين السادات، *اثرات روانی و جسمی مواد اعتیاد آور*، چاپ اول، انتشارات رسانه تخصصی، ۱۳۸۴، صفحه ۴۲.
- [۵] صحرایی هدایت، شمس جمال، مرجانی صدیقه، مولوی صفیه، کمالی نژاد محمد، بررسی اثر عصاره آبی کلالة گل زعفران (*Crocus sativus*) بر کسب و بیان حساسیت حرکتی ناشی از مورفین در موش های سوروی ماده. *فصلنامه گیاهان دارویی* ۲۱ (۱۳۸۵) ۲۶ تا ۳۵.
- [۶] صحرایی هدایت، مبشر مینا، صادقی راد بهنام، کمالی نژاد محمد، شمس جمال، بررسی اثر عصاره زعفران (*Crocus sativus*) بر کسب و بیان ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مورفین در موش های کوچک آزمایشگاهی. *مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان* ۳ (۱۳۸۵) ۱۴۳ تا ۱۵۰.
- [۷] میرزایی دیزگاه ایرج، کریمیان مرتضی، زرین دست محمدرضاء، سوهانکی حمید، اثرات تزریق عوامل دوپامینرژیک گیرنده های D1 در هسته لوكوس سرولتوس بر علائم قطع مصرف القاء شده به وسیله نالوکسان در موش های بزرگ آزمایشگاهی نر وابسته به مورفین. *فیزیولوژی و فارماکولوژی* ۹ (۲) (۱۳۸۴) ۱۶۷ تا ۱۷۲.
- [8] Abdullaev FI, Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of Saffron (*Crocus sativus* L.). *Exp Biol Med* 227 (1) (2002) 20-25.
- [9] Abe K, Saito H, Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. *Phytother Res* 14 (2000) 149-152.
- [10] Abe K, Sugiura M, Shoyama Y, Saito H, Crocin antagonizes ethanol inhibition of NMDA receptor-mediated responses in rat hippocampal neurons. *Brain Res* 787 (1998) 132-138.
- [11] Ahmad AS, Ansari MA, Ahmad M, Saleem S, Yousuf S, Hoda MN, Islam F, Neuroprotection by crocetin in a hemi-parkinsonian rat model. *Pharmacol Biochem Behav* 81 (2005) 805-813.
- [۲۲]. همچنین در تحقیقات دیگری مشخص شده است که آزاد شدن دوپامین بصورت آندوژن و یا تجویز آگونیست های آن می تواند سبب افزایش LTP در ناحیه CA1 هیپوکمپ از طریق افزایش القا LTP زودرس شود [۳۵]. این اثر از طریق گیرنده های D1/D5 و در نتیجه فعال شدن cAMP می باشد [۲۲، ۳۵]. بنا بر این احتمال دارد زعفران از طریق افزایش میزان دوپامین در نواحی از مغز که با فرآیندهای یادگیری و حافظه در ارتباط هستند، نظیر هیپوکمپ، بر آنها مؤثر واقع شود. بدیهی است چنانچه آنتاگونیست های دوپامینی در حضور عصاره زعفران در مدل حاضر مورد استفاده قرار گیرد، صحت تئوری فوق الذکر می تواند مورد ارزیابی قرار گیرد.
- از طرف دیگر نتایج مطالعات حاضر نشان داد که سرعت شنای حیوانات تحت تاثیر تجویز مورفین کاهش می یابد، به بیان دیگر فعالیت حرکتی حیوانات تحت تاثیر تجویز مورفین کاهش یافته است. اثر مهارتی تجویز مورفین بر فعالیت حرکتی در گزارشات محققین دیگر ارائه شده است. بعنوان مثال Mc Namara و همکاران گزارش نمودند که مورفین می تواند باعث افزایش دمای بدن و سختی عضلانی شود که این دو می تواند سبب آسیب به یادگیری مکانی شوند [۲۶]. محققین دیگری هم اعلام داشتند که دوزهای بالای مورفین (۱۰ mg/kg و بیشتر) سبب سختی عضلانی و کاتالپسی می شود [۱۵]. در تحقیق حاضر از آنجا که تجویز عصاره به تنهایی تاثیری بر سرعت شنای حیوانات نداشت، لذا نمی توان انتظار داشت کاهش سرعت شنای ناشی از مورفین را بهبود بخشد [۶].
- بطور خلاصه می توان گفت که تجویز عصاره آبی کلالة زعفران بصورت وابسته به دوز می تواند اثرات مهارتی مورفین در روند یادگیری و حافظه فضائی موش صحرایی را سرکوب نماید. تعیین مکانیسم های دقیق ایجاد این اثرات نیازمند مطالعات تکمیلی است.

## سپاسگزاری

این مقاله موضوع طرح تحقیقاتی مصوب حوزه معاونت محترم آموزشی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه می باشد. نویسندگان مقاله بدین وسیله مراتب تشکر و قدردانی خود را از مسؤولین محترم حوزه مذکور اعلام می دارند.

- [24] Li Z, Wu CF, Pei G, Xu NJ, Reversal of morphine-induced memory impairment in mice by withdrawal in Morris water maze: possible involvement of cholinergic system. *Pharmacol Biochem Behav* 68 (2001) 507-513.
- [25] Mc Namara RK, Skelton RW, Pretraining morphine impairs acquisition and performance in the morris water maze: Motivation reduction rather than amnesia. *Psychobiol* 19 (4) (1991) 313-322.
- [26] Mc Namara RK, Skelton, RW, Pharmacological dissociation between the spatial learning deficits produced by morphine and diazepam. *Psychopharmacology* 108 (1992) 147-152.
- [27] Mc Namara RK, Skelton RW, The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the morris water maze. *Brain Res Rev* 18 (1993) 33-49.
- [28] Morris RGM., Anderson E, Lynch G, Baudry S, Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* 319 (27) (1986) 774-776.
- [29] Noorbala AA, Akhondzadeh Sh, Tahmacebi-Pour N, Jamshidi AH, Hydro-alcoholic extract of Crocus sativus L. versus fluoxetine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized pilot trial. *J Ethnopharmacol* 97 (2005) 281-284.
- [30] Otmakhova NA, Lisman JE, D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapse. *J Neurosci* 16 (23) (1996) 7478-7486.
- [31] Papandreou MA, Kanakis CD, Polissiou MG, Efstathiopoulos S, Cordopatis P, Margaritis M, Lamari FN, Inhibitory activity on amyloid-beta aggregation and antioxidant properties of Crocus sativus stigmas extract and its crocin constituents. *J Agri Food Chem* 15 (54) (23) (2006) 8762-8768.
- [32] Pitsikas N, Sakkellaridis N, Crocus sativus L. extracts antagonize memory impairments in different behavioural tasks in the rat. *Behav Brain Res* 173 (2006) 112-115.
- [33] Pu L, Bao GB, Xu NJ, Ma L, Pei G, Hippocampal long-term potentiation is reduced by chronic opiate treatment and can be restored by re-exposure to opiates. *J Neurosci* 22 (2002) 1914-1921.
- [34] Shiigi Y, Takahashi M, Kaneto H, Facilitation of memory retrieval by pretest morphine mediated by mu but not delta and kappa opioid receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 102 (1990) 329-332.
- [35] Swant J, Wagner JJ, Dopamine transporter blockade
- [12] Aguilar MA, Minarro J, Simon VM, Dose –dependent impairing effects of morphine on avoidance acquisition and performance in male mice. *Neurobiol Learn Mem* 69 (1998) 92-105.
- [13] Akhondzadeh Sh, Fallah-Pour H, Afkham K, 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* 2 (2004) 4-12.
- [14] Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP, Radical Scavenging activity of Crocus Sativus L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res* 19 (11) (2005) 997-1000.
- [15] Castellano C, Cestari V, Ciamei A, NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets* 2 (3) (2001) 273-283.
- [16] Fischer DA, Ferger B, Kuschinsky K, Discrimination of morphine-and haloperidol-induced muscular rigidity and akinesia/catalepsy in simple test in rats. *Behav Brain Res* 134 (2002) 317-321.
- [17] Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR, Protective effect of safranal on pentylentetrazol-induced seizures in the rat: Involvement of GABAergic and opioids systems. *Phytomedicine* 14 (2007) 256-262.
- [18] 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.
- [19] Jang CG, Lee SY, YOO JH, Yan JJ, Song DK, Loh HH, Ho Ik, Impaired water maze learning performance in  $\mu$ -receptor knockout mice. *Mol Brain Res* 117 (2003) 68-72.
- [20] Kavaliers M, Ossenkopp KP, Prato FS, Innes DG, Galea LA, Kinsella DM, Perrottsinal TS, Spatial learning in deer mice: sex differences and the effects of endogenous opioids and 60 Hz magnetic fields. *J Comp Physiol A* 179 (1996) 712-724.
- [21] Lee IA, Lee JH, Baek NI, Kim DH, Antihyperlipidemic effect of Crocin isolated from the fructus of Gardenia jasminoides and its metabolite Crocetin. *Biol Pharm Bull* 28 (11) (2005) 2106-2110.
- [22] Lemon N, Manhan-Vaughan D, Dopamine D1/D5 receptors gate the acquisition of novel information through hippocampal long-term potentiation and long term depression. *J Neurosci* 19 (26) (2006) 7723-7729.
- [23] Chen L, Gu Y, Huang LY, The opioid peptide dynorphin directly blocks NMDA receptor channels in the rat. *J Physiol* 482 (3) (1995) 575-581.

- receptors. *Eur J Pharmacol* 497 (2004) 197-204.
- [37] Zhang Y, Shoyama Y, Sugiura M, Satio H, Effects of *Crocus sativus* on the ethanol-induced impairment of passive avoidance performances in mice. *Biol Pharm Bull* 17 (2) (1994) 217-21
- increase LTP in the CA1 region of the rat hippocampus via activation of the D3 dopamine receptor. *Learn Mem* 13 (2) (2006) 161-167.
- [36] Zarrindast MR, Rezayof A, Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine