

تأثیر عصاره آبی گیاه زعفران (*Crocus sativus*) بر درد مزمن ناشی از آزمون فرمالین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده

صدیقه اربابیان^۱ PhD، حمیدرضا ایزدی^۲ MD، حسن قشونی^۳ MSc، جمال شمس^۴ MD، حمیرا زردوز^۴ PhD، محمد کمالی نژاد^۵ MSc، هدایت صحرائی^{*} PhD، علی نوروززاده^۲ MSc

چکیده

اهداف. در این مطالعه، اثر ضد درد عصاره آبی کلاله گل زعفران (*Crocus sativus*) و نیز تداخل احتمالی آن با مکانیزم‌های درگیر در کاهش درد در موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده نژاد N-MARI در محدوده وزنی ۲۵-۲۰ گرم بررسی شد.

مواد و روش‌ها. این مطالعه با استفاده از آزمون فرمالین انجام شد. داروهای مورد استفاده، ۳۰ دقیقه قبل از شروع تجویز فرمالین ۲٪ به کف پای حیوانات مورد استفاده قرار گرفتند. پس از تزریق فرمالین، پاسخ حیوانات برای مدت زمان ۶۰ دقیقه در فواصل ۵ دقیقه‌ای توسط ناظر ثبت شد.

یافته‌ها. تجویز مورفین (۱، ۵ و ۱۰ mg/kg) سبب کاهش پاسخ حیوانات به فرمالین در فاز حاد و همچنین فاز مزمن شد. اثربخشی مورفین در فاز حاد وابسته به دوز و در فاز مزمن غیروابسته به دوز بود. تجویز عصاره گل زعفران (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) نیز سبب بروز بی‌دردی در حیوانات در فاز مزمن شد. تجویز نالوکسان (۱، ۲ و ۴ mg/kg) نتوانست اثربخشی عصاره زعفران در کاهش درد ناشی از فرمالین در فاز مزمن را مهار یا تقویت کند. تجویز دکسترومتورفان (۲۰ mg/kg) باعث تقویت اثرات عصاره زعفران در فاز مزمن شد. استفاده از داروی L-NAME (۱۰ mg/kg) باعث تقویت اثربخشی عصاره زعفران شد، درحالی‌که تجویز ایندومتاسین (۲/۵ mg/kg) نتوانست تاثیر دوز بی‌اثر زعفران (۲/۵ mg/kg) را تقویت نماید.

نتیجه‌گیری. عصاره آبی زعفران تاثیر خود بر کاهش فاز مزمن درد ناشی از تزریق فرمالین در موش‌های ماده را با مهار احتمالی مسیرهای وابسته به گیرنده‌های NMDA و نیتریک اکساید انجام می‌دهد.

کلیدواژه‌ها: *Crocus sativus*، بی‌دردی، تست فرمالین، نیتریک اکساید، گیرنده‌های گلوتاماتی NMDA

مقدمه

درد، تلخ‌ترین تجربه بشری عنوان شده و امروزه دولت‌های مختلف مبالغه‌هنگامی برای درمان یا کاهش درد هزینه می‌کنند [۱]. به همین دلیل، یافتن راه‌ها و داروهایی که بتواند میزان درد را کاهش داده و علائم و اثرات آن را تخفیف دهد همواره مد نظر محققان و پزشکان در سراسر دنیا بوده است.

مطالعات مختلف، مسیرهای انتقال درد در دستگاه عصبی را تا حدود زیادی روشن کرده است و امروزه این مسیرها و نیز نوروترانسمیترهای مداخله‌گر در آنها نسبتاً شناخته شده هستند. از نظر تشریحی، مسیر انتقال درد به سه بخش محیطی، نخاعی و مسیرهای فوق نخاعی تقسیم می‌شوند. داروهای مورد استفاده در کاهش درد معمولاً یک یا چند بخش از این مسیرها را هدف قرار داده و آنها را مهار می‌کنند [۱، ۲]. مثلاً بسیاری از داروهای ضد درد اویپوئیدی، مسیرهای نخاعی و فوق نخاعی را بیشتر از بخش محیطی مهار می‌کنند [۲]. در این میان، داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی با مهار تولید ایکوزانوئیدها (مانند پروستاگلاندین‌ها) باعث مهار درد در مراحل اولیه آن و در قسمت محیطی می‌شوند [۳]. نکته مهم در مورد این داروها آن است که مصرف طولانی مدت آنها همواره با خطرات زیادی همراه است. برای مثال، مصرف طولانی مدت اویپوئیدها منجر به القای وابستگی و تحمل می‌شود [۴، ۵] و یا مصرف داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی ممکن است سبب خونریزی معده شود [۳]. به همین دلیل، همواره محققان در پی یافتن داروهای جدیدی در زمینه کاهش درد هستند تا عوارض کمتری نسبت به داروهای موجود داشته باشند. گیاهان دارویی و داروهای مشتق از آنها از قدیم به عنوان منابع مهم درمانی توسط بشر شناخته شده است و امروزه نیز با توجه به سهولت دسترسی به این داروها، تمرکز زیادی بر استفاده از آنها و تحقیق در مورد خواص آنها وجود دارد [۶].

زعفران از جمله گیاهانی است که از قدیم در نقاط مختلف دنیا به عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرار گرفته است [۷]. در ایران نیز این گیاه به عنوان ضداسپاسم، آرام‌بخش، تسهیل‌کننده هضم غذا، ضدنفخ، معرق، خلط‌آور، محرک میل جنسی و تسکین‌دهنده درد مورد استفاده بوده است [۷]. در طب چینی این گیاه برای درمان آمنوره [۶] نیز استفاده شده است. این گیاه را به صورت دم‌کرده مصرف می‌کنند. زعفران گیاهی است از تیره زنبق و چندساله به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و دارای بنه‌ای سخت و مدور و گوشت‌دار و پوشیده از غشاهای 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 هستند که همین قسمت به عنوان زعفران ارزش تجاری دارد [۷]. زعفران دارای مواد چرب، املاح معدنی، موسیلاژ، اسانس بی‌رنگی مرکب از

ترین‌ها و سینئول (که بوی زعفران مربوط به این مواد است)، پیکروکروسین (که هتروزیدی 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) و کروسین (ماده اصلی رنگی زعفران و نوعی کاروتنوئید) است [۷].

در تحقیقات قبلی، در مورد اثر عصاره زعفران در برخی بیماری‌ها در انسان، تحقیقاتی انجام گرفته است. آقاحسینی و همکاران [۸] اخیراً تاثیر زعفران بر افسردگی خانم‌های مبتلا به سندرم پیش از قاعدگی را در مقایسه با گروه پلاسبو مورد مطالعه قرار دادند. این تحقیق نشان داد که عصاره زعفران قادر به کاهش علائم افسردگی است. همچنین، آخوندزاده و همکاران در تحقیق دیگری اثر عصاره گیاه زعفران را با ایمی‌پرامین به عنوان داروی ضدافسردگی رایج در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط مطالعه کردند [۹]. این تحقیق نیز نشان داد که عصاره زعفران همان کارایی ایمی‌پرامین را بدون عوارض جانبی آن دارد. همچنین در تحقیق دیگری، نوربالا و همکاران [۱۰] اثر عصاره آبی-الکلی زعفران را بر بهبود افسردگی خفیف تا متوسط مطالعه کرده و اثر آن را با فلوکزین مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نیز بر اثر مثبت زعفران در کاهش علائم افسردگی در مقایسه با فلوکزین تاکید دارد. از سوی دیگر، تحقیقات پیشین بر توانایی ضددردی و ضدالتهابی عصاره زعفران در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نسبت به داروهای ضد درد و ضدالتهاب رایج تاکید دارد [۱۱]. محققان همچنین بر تاثیر کروسین در بهبود حافظه و القای پدیده تقویت طولانی‌مدت در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر تاکید دارند [۱۲]. با این حال تاکنون تحقیقی در مورد اثرات زعفران بر بی‌دردی ناشی از آزمون فرمالین به عنوان مدلی که امکان بررسی درد حاد و مزمن را فراهم کند [۱۳] انجام نشده است. به همین دلیل، در تحقیق حاضر توانایی عصاره آبی زعفران در القای بی‌دردی در مدل درد مزمن به روش آزمون فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی ماده بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری: کلاله گیاه زعفران تهیه شده در سال ۱۳۸۴ توسط شرکت طلاکاران مزرعه (تربت حیدریه، خراسان رضوی) در اختیار این گروه قرار گرفت. زعفران به آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل شده و مورد شناسایی قرار گرفت و کد ۴۰۸ به آن داده شد. سپس از پودر این کلاله به روش جوشاندن، عصاره آبی گرفته شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم از پودر کلاله خشک شده در بالن شیشه‌ای به حجم ۲ لیتر ریخته شد و به آن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد جوشانده شد. سپس محلول رویی از صافی کاغذی متغیر با قطر منفذ ۴ میکرومتر عبور داده شد.

زمان اوج پاسخ در این دو فاز در هر آزمایش محاسبه شده و از آن به‌عنوان معیار القای بی‌دردی استفاده شد. در این تحقیق بیشترین اثر فرمالین در فاز حاد در دقیقه ۵ پس از تزریق و بیشترین اثر آن در فاز مزمن در دقیقه ۲۵ پس از تزریق تعیین شد.

بررسی اثر داروهای مختلف بر بی‌دردی ناشی از عصاره آبی زعفران: در این مرحله از آزمایش‌ها، ابتدا دوزهای مختلف عصاره زعفران (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) ۳۰ دقیقه قبل از تزریق دکسترومتورفان (۲۰ mg/kg)، نالوکسان (۴ mg/kg) و L-NAME (۱۰ mg/kg) به حیوانات تزریق و ۳۰ دقیقه بعد به کف پای آنها فرمالین تزریق شد. در تحقیقی جانبی، اثر تجویز دوزهای بی‌اثر عصاره زعفران (۲/۵ mg/kg) و ایندومتاسین (۲/۵ mg/kg) بر فاز مزمن درد ناشی از تزریق فرمالین بررسی شد تا اثر توأم این داروها بررسی شود.

اطلاعات به‌دست‌آمده به‌صورت "انحراف معیار ± میانگین" استاندارد نمره درد بیان شدند. به‌منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و به‌دنبال آن آزمون توکی استفاده شد. $p < 0.05$ به‌عنوان معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.

نتایج

القای بی‌دردی توسط عصاره زعفران و مورفین: در این قسمت از آزمایش، موش‌ها به هشت گروه تقسیم شدند. گروه اول سالین (به روش ذکرشده در قسمت روش‌ها)، سه گروه بعدی دوزهای مختلف عصاره زعفران (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) را به‌صورت داخل صفاقی و سه گروه آخر دوزهای مختلف مورفین (۱، ۵ و ۱۰ mg/kg) را به‌منظور القای بی‌دردی دریافت کردند. تجویز عصاره زعفران در هر سه دوز باعث القای بی‌دردی در فاز مزمن فرمالین تست شد (نمودار ۲). اثر مورفین به‌صورت بی‌دردی در هر دو فاز حاد (در دوزهای ۵ و ۱۰ mg/kg) و مزمن (هر سه دوز ۱، ۵ و ۱۰ mg/kg) بود (نمودار ۱ و ۲).

بررسی اثر آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران: به‌منظور بررسی مهار گیرنده‌های NMDA بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران، از چهار گروه حیوان استفاده شد. سه گروه از حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از دریافت عصاره آبی زعفران (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg)، دکسترومتورفان (۲۰ mg/kg) را دریافت کردند. گروه چهارم به‌عنوان کنترل فقط دکسترومتورفان (۲۰ mg/kg) دریافت کرده و ۳۰ دقیقه بعد تست شدند. تجویز دکسترومتورفان به همراه عصاره زعفران باعث القای بی‌دردی در فاز حاد در دوزهای بالای عصاره زعفران (۵۰ و ۱۰۰ mg/kg) و بهبود (اما از نظر آماری بی‌معنی) کارایی عصاره زعفران در فاز مزمن درد آزمون فرمالین شد (نمودار ۴).

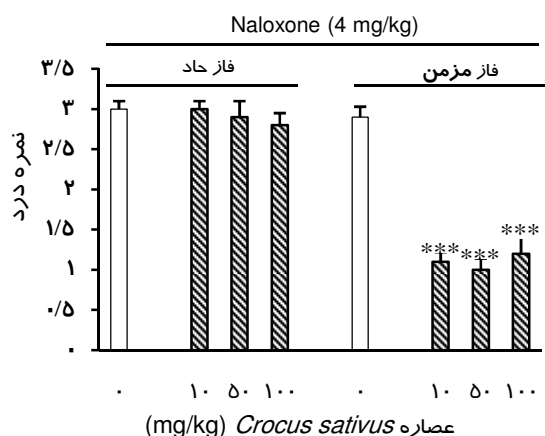
این محلول برای مدت یک روز در دستگاه بن‌ماری با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و یک هفته در انکوباتور با دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آب آن نیز به آرامی تبخیر شده و پودر عصاره به‌جا بماند. این عصاره در سالیین حل شده و به‌صورت داخل صفاقی به حیوانات تزریق شد. از هر ۱۰۰ گرم پودر گیاه، ۲۵ گرم عصاره خشک به‌دست آمد.

حیوانات: در این تحقیق از موش‌های کوچک آزمایشگاهی ماده نژاد N-MRI با میانگین وزنی ۲۵-۲۰ گرم (۶ سر در هر آزمایش) استفاده شد. حیوانات در قفس‌های ۶تایی با دوره شبانه‌روزی طبیعی و در دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد، با آب و غذای کافی نگهداری شدند.

روش بررسی درد در حیوانات: برای بررسی درد در حیوانات از روش آزمون فرمالین استفاده شد. در این روش حیوانات یک ساعت قبل از شروع تحقیق به محیط آزمایشگاه منتقل شده و پس از عادت به این محیط، ۲ میکرولیتر محلول فرمالین ۲٪ به کف پنجه موش تزریق شد. حیوان بلافاصله پس از تزریق فرمالین در داخل محفظه‌ای از جنس پلاکسی‌گلاس به ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ سانتی‌متر (طول، عرض، ارتفاع) قرار گرفته و هر ۵ دقیقه یکبار به مدت ۶۰ دقیقه از نظر میزان بی‌دردی به روش دوبیسون و دنیس [۱۴] مورد بررسی قرار گرفت. آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه در زیر این محفظه تعبیه شده بود تا پنجه پای حیوان به راحتی دیده شود. داروهای مورد استفاده در این تحقیق، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین به‌صورت زیرجلدی یا داخل صفاقی به حیوانات تزریق شدند. در مواردی که بیش از یک دارو مورد استفاده قرار می‌گرفت، رعایت فاصله زمانی ۳۰ دقیقه بین تزریق‌ها انجام شد.

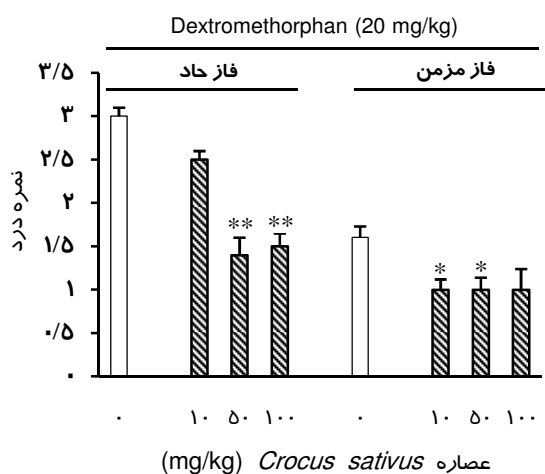
داروها: در این تحقیق، مورفین سولفات (تماد، ایران)، دکسترومتورفان هیدروبروماید، ایندومتاسین هیدروکلراید، L-NAME و نالوکسان هیدروکلراید (سیگما، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. همه داروها در سالیین حل شده و با حجم ۱۰ ml/kg به‌صورت زیرجلدی (مورفین) و یا داخل صفاقی (سایر داروها) تزریق شدند. عصاره زعفران نیز پس از توزین، در سالیین حل شده و به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه‌های کنترل، سالیین را به صورت زیرجلدی یا داخل صفاقی دریافت کردند.

بررسی اثر تجویز عصاره زعفران در القای بی‌دردی و مقایسه آن با مورفین: در ابتدا، به‌منظور تعیین اثربخشی عصاره آبی زعفران در القای بی‌دردی در مدل آزمون فرمالین، دوزهای مختلف عصاره به حیوانات تزریق شد و منحنی دوز-پاسخ عصاره به‌دست آمد. برای مقایسه اثربخشی عصاره، از مورفین به‌عنوان داروی ضددرد شناخته‌شده نیز استفاده شد و منحنی دوز-پاسخ برای مورفین نیز تعیین شد. در این مرحله، گروه‌های کنترل سالیین دریافت کردند. به این دلیل که پاسخ به فرمالین در حیوانات دارای دو فاز حاد و مزمن است،



نمودار ۳ اثر مهار گیرنده‌های اوبیوئیدی بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران در آزمون فرمالین. ۳۰ دقیقه قبل از تجویز دوزهای مختلف عصاره (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg)، نالوکسان (آنتاگونیست گیرنده‌های اوبیوئیدی) به صورت داخل صفاقی به هر حیوان (۴ mg/kg) تزریق و ۳۰ دقیقه بعد از دریافت عصاره، آزمون فرمالین انجام شد. نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" نمره درد در مورد ۶ سر حیوان است.

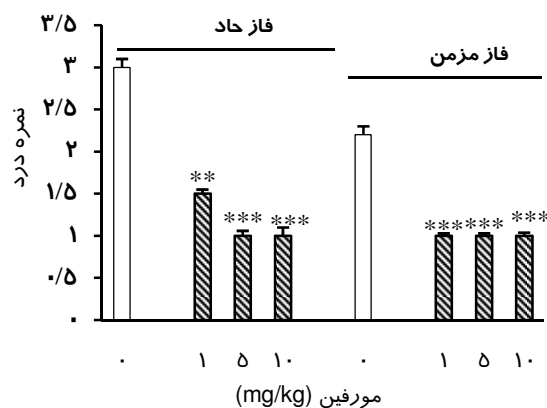
*** $p < 0.001$ تفاوت از گروه شاهد (نالوکسان + سالیین) است.



نمودار ۴ اثر تجویز آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران. حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از دریافت دوزهای مختلف عصاره زعفران (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg)، دکسترومتورفان با دوز (۲۰ mg/kg) را به صورت داخل صفاقی دریافت و ۳۰ دقیقه بعد پس از تجویز فرمالین به مدت یک ساعت مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" نمره درد در مورد ۶ سر حیوان است.

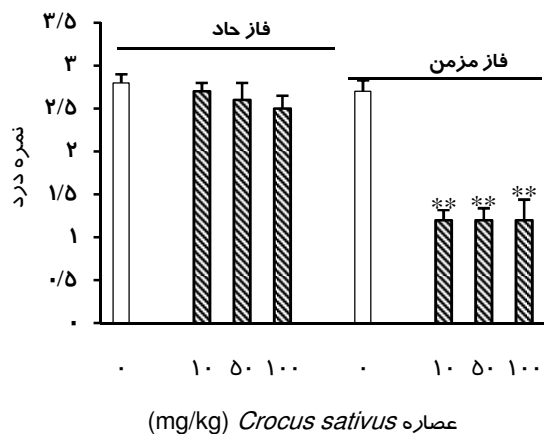
*** $p < 0.001$ تفاوت از گروه شاهد (دکسترومتورفان + سالیین) است.

بررسی اثر مهارگر آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (L-NAME) بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران: به منظور بررسی اثر L-NAME بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران نیز از چهار گروه حیوان استفاده شد. گروه اول سالیین دریافت کرد. گروه دوم دوز بی‌اثر عصاره زعفران (۲/۵ mg/kg)، گروه سوم L-NAME (۱۰ mg/kg)



نمودار ۱ اثر مورفین در القای بی‌دردی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی به روش آزمون فرمالین. چنان‌که در نمودار مشخص است، تزریق مورفین به حیوانات باعث القای بی‌دردی در حیوانات، هم در فاز حاد و هم در فاز مزمن آزمون فرمالین شده است. این نتیجه در مورد دوزهای ۵ و ۱۰ mg/kg مورفین در فاز حاد و هر سه دوز مورفین در فاز مزمن از نظر آماری معنی‌دار بود. نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" نمره درد در مورد ۶ سر حیوان است.

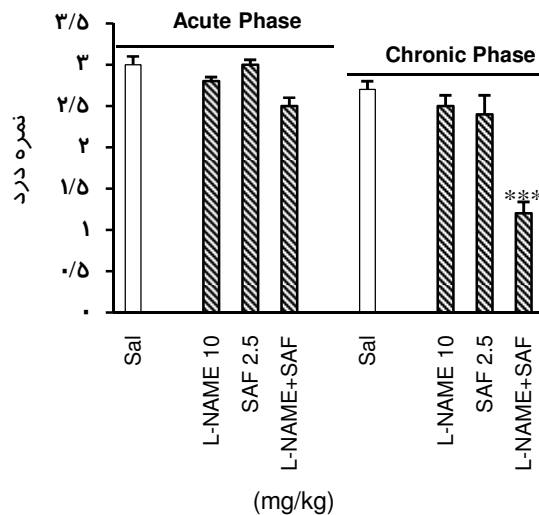
*** $p < 0.001$ تفاوت از گروه شاهد (سالیین) است.



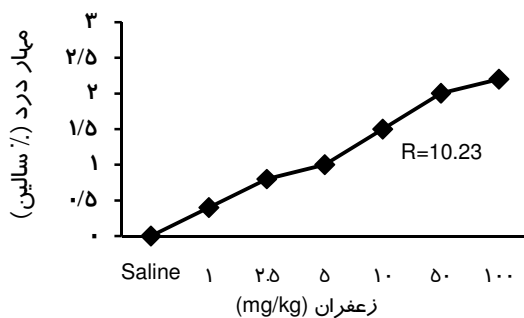
نمودار ۲ اثر عصاره آبی زعفران در القای بی‌دردی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی به روش آزمون فرمالین. تزریق عصاره به حیوانات در هر سه دوز ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg توانایی القای بی‌دردی در حیوانات در فاز مزمن آزمون فرمالین را داشت. نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" نمره درد در مورد ۶ سر حیوان است.

*** $p < 0.001$ تفاوت از گروه شاهد (سالیین) است.

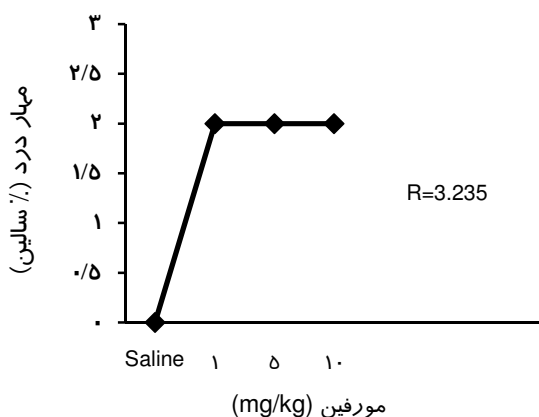
بررسی اثر آنتاگونیست گیرنده‌های اوبیوئیدی بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران: به منظور بررسی نقش گیرنده‌های اوبیوئیدی بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران، از چهار گروه حیوان استفاده شد. سه گروه از حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از دریافت عصاره زعفران (۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ mg/kg)، نالوکسان (۴ mg/kg) را دریافت کردند. گروه چهارم تنها نالوکسان (۴ mg/kg) دریافت کرده و ۳۰ دقیقه بعد تست شدند. تجویز نالوکسان به همراه عصاره زعفران اثری بر کارایی زعفران در فاز حاد و مزمن نداشت (نمودار ۳).



نمودار ۶) اثر مهار آنزیم نیتریک اکساید سنتاز بر عملکرد دوز بی اثر زعفران. حیوانات ابتدا دوز بی اثر زعفران (۲/۵ mg/kg) و ۳۰ دقیقه بعد L-NAME (۱۰ mg/kg) را به صورت داخل صفاقی دریافت کرده و ۳۰ بعد با دریافت فرمالین از نظر شدت پاسخ به محرک دردزا مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" نمره درد در مورد ۶ سر حیوان است. $p < 0.001$ *** تفاوت از گروه شاهد (سالین) است.



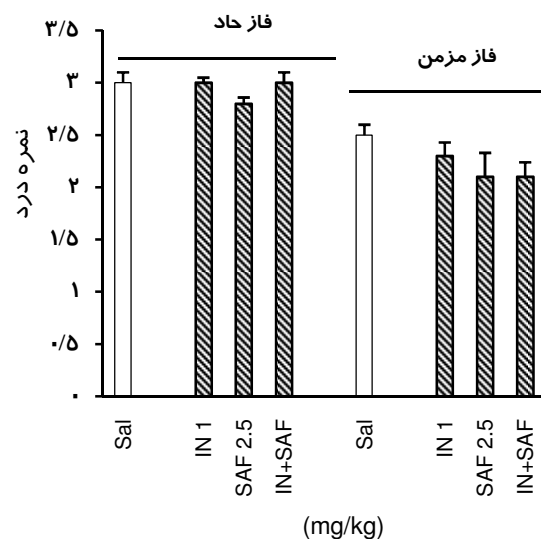
نمودار ۷) منحنی دوز-پاسخ مهار درد توسط عصاره آبی زعفران در مقایسه با سالین در فاز دوم (مزمن) آزمون فرمالین. همان گونه که در شکل مشخص است، میزان مهار درد در دوزهای ۱۰، ۵۰، و ۱۰۰ mg زعفران به ۸۰٪ می‌رسد.



نمودار ۸) منحنی دوز-پاسخ مهار درد توسط مورفین در مقایسه با سالین در فاز دوم (مزمن) آزمون فرمالین. همان گونه که در شکل مشخص است، میزان مهار درد در دوزهای ۱، ۵، و ۱۰ mg زعفران به ۸۰٪ می‌رسد.

و گروه چهارم ترکیبی از دوز بی اثر عصاره زعفران (۲/۵ mg/kg) و L-NAME (۱۰ mg/kg) را دریافت کرده و ۳۰ دقیقه بعد تست شدند. تجویز L-NAME به همراه عصاره زعفران باعث القای بی‌دردی در حیوانات شد. درحالی که هیچ‌یک از دو دارو، به تنهایی قادر به القای بی‌دردی در حیوانات نبودند (نمودار ۶).

بررسی اثر مهارگر آنزیم سیکلواکسیژناز بر عملکرد عصاره در القای بی‌دردی: به این منظور نیز از چهار گروه حیوان استفاده شد. گروه اول سالین دریافت کرد. گروه دوم دوز بی اثر عصاره زعفران (۲/۵ mg/kg)، گروه سوم ایندومتاسین (۱۰ mg/kg) و گروه چهارم ترکیبی از دوز بی اثر عصاره زعفران (۲/۵ mg/kg) و ایندومتاسین (۱ mg/kg) را دریافت کرده و ۳۰ دقیقه بعد تست شدند. تجویز ایندومتاسین به همراه عصاره زعفران اثری بر القای بی‌دردی در حیوانات در فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین نداشت (نمودار ۵).



نمودار ۵) اثر مهار آنزیم سیکلواکسیژناز بر عملکرد دوز بی اثر زعفران. حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از دریافت دوز بی اثر زعفران (۲/۵ mg/kg)، ایندومتاسین (۱ mg/kg) را به صورت داخل صفاقی دریافت کرده و ۳۰ دقیقه بعد با دریافت فرمالین از نظر شدت پاسخ به محرک دردزا مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج به صورت "انحراف معیار ± میانگین" نمره درد در مورد ۶ سر حیوان است. $p < 0.001$ *** تفاوت از گروه‌های شاهد (ایندومتاسین + سالین و زعفران + سالین) است.

منحنی دوز-پاسخ مورفین و عصاره زعفران: با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در فاز دوم آزمون فرمالین در دوزهای مختلف مورفین و عصاره زعفران، منحنی دوز-پاسخ اثر این داروها بر اساس درصد مهار درد توسط آنها ترسیم و شیب منحنی به‌عنوان دوز موثر محاسبه شد. در این روش دوز موثر (توان نسبی) مورفین و عصاره زعفران برای القای بی‌دردی در فاز دوم به ترتیب ۳/۲۳۵ و ۱۰/۲۳ mg/kg به‌دست آمد (نمودارهای ۷ و ۸).

بحث

در این تحقیق، میزان اثربخشی عصاره آبی زعفران بر درد ناشی از تزریق زیرجلدی فرمالین و مکانیزم یا مکانیزم‌های درگیر در آن در موش کوچک آزمایشگاهی ماده مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که تجویز عصاره زعفران بر فاز دوم درد ناشی از تزریق فرمالین موثر است. این تاثیر با تجویز مهارگر آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز و آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی مهار شد، درحالی‌که آنتاگونیست گیرنده‌های اوپیوئیدی (نالوکسان) نتوانست آن را مهار کند. در همین راستا، تجویز مهارگر آنزیم سیکلواکسیژناز نیز نتوانست آن را تقویت کند. بنابراین، می‌توان اظهار کرد که اثر عصاره زعفران در مهار فاز دوم آزمون فرمالین به دلیل تحریک مسیرهای گلوتاماتی و نیز نیتریک‌اکساید است.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که تجویز مورفین به حیوانات سبب القای بی‌دردی در هر دو مرحله آزمون فرمالین (حاد و مزمن) می‌شود. این نتیجه با نتایج قبلی هم‌خوانی دارد [۱۵، ۱۶]. اینکه اثربخشی مورفین در القای بی‌دردی مربوط به کدام دسته از گیرنده‌های اوپیوئیدی موجود در دستگاه عصبی است نیز موضوع تحقیقات زیادی بوده است [۳]. در این تحقیقات مشخص شده است که هر سه دسته اصلی گیرنده‌های اوپیوئیدی یعنی گیرنده‌های مو، کاپا، و دلتای موجود در نواحی نخاعی و فوق نخاعی دستگاه عصبی در این امر دخالت مستقیم دارند [۳]. 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 [۳]. از سوی دیگر، تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که فاز مزمن آزمون فرمالین به دلیل فعال شدن مکانیزم‌های التهابی ناشی از تزریق فرمالین بوده و به همین دلیل، توسط داروهای ضدالتهابی غیراستروئیدی مانند مفنامیک‌اسید، آسپرین و ایندومتاسین [۱۴، ۱۵] و داروهای ضدالتهابی استروئیدی مانند دگزامتازون و هیدروکورتیزون [۱۴] مهار می‌شود. در تحقیق حاضر، هر سه دوز مورد استفاده از عصاره زعفران توانایی مهار فاز اول درد ناشی از تزریق فرمالین را نداشتند، درحالی‌که به‌خوبی فاز دوم آن را مهار کردند. این نتیجه در درجه اول نشان می‌دهد که عصاره زعفران دارای اثر ضدالتهابی است که شاید همین دلیل باعث کاهش درد در حیوان شده و دوم این که عصاره اثر ضددرد نیز از خود نشان می‌دهد. این یافته نیز با یافته پیشین در این زمینه هم‌خوان است [۱۰] و نشان می‌دهد که عصاره زعفران توانایی القای اثرات ضددردی را در فاز دوم آزمون فرمالین دارد. در ادامه تحقیقات برای پی بردن به مکانیزم یا مکانیزم‌های درگیر در عملکرد عصاره زعفران، اثر سیستم‌های دخیل در انتقال درد و کنترل مسیرهای درد در دستگاه عصبی بررسی شد.

در این مطالعات مشخص شد که تجویز آنتاگونیست گیرنده‌های اوپیوئیدی یعنی نالوکسان، قادر به مهار اثرات عصاره زعفران نیست. با توجه به اینکه حسین‌زاده و صادق‌نیا [۱۶] قبلاً نشان داده‌اند که عصاره زعفران احتمالاً از طریق مسیرهای اوپیوئیدی می‌تواند موجب مهار عملکرد پنتیلن‌تترازول در القای حملات صرعی در موش بزرگ آزمایشگاهی شود، اینکه نالوکسان نتوانست باعث مهار (یا تعدیل) عملکرد عصاره زعفران در القای بی‌دردی در فاز مزمن آزمون فرمالین شود، نکته مهمی است که بایستی در تحقیقات بعدی مورد بررسی قرار گیرد. شاید دلیل این اختلاف، به تفاوت ترکیبات عصاره آبی (مورد استفاده در تحقیق حاضر) و عصاره آبی-الکی (مورد استفاده در تحقیق حسین‌زاده و صادق‌نیا) مرتبط باشد. به هر حال، محققان معتقدند که در عصاره آبی زعفران، درصد ساfranال بسیار بیشتر از عصاره الکی آن است [۱۷]. این امر می‌تواند به این فرضیه منجر شود که نوع عصاره‌گیری می‌تواند نتایج متفاوتی را در مورد زعفران باعث شود و این امر نیاز به تحقیق بیشتری دارد. در هر حال، تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که تجویز نالوکسان توانسته است اثرات ضددردی عصاره آبی و الکی زعفران در مدل حیوانی تزریق اسیداستیک به ناحیه زیر پوست شکم موش کوچک را تقویت نماید [۱۰]. اختلاف دیده‌شده، ممکن است به دلیل نوع آزمون به‌کاررفته برای بررسی درد در این تحقیق و تحقیق قبلی باشد.

در ادامه کار، تجویز آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA یعنی دکسترومتورفان قبل از تجویز عصاره زعفران، نتوانست باعث بهبود کارایی عصاره زعفران در فاز حاد آزمون فرمالین شده و در فاز مزمن نیز اگرچه عملکرد دارو از نظر آماری معنی‌دار نبود، اما تقویت نسبی در عملکرد عصاره زعفران دیده شد. در تحقیقات قبلی اثر تقویتی دکسترومتورفان بر عملکرد مورفین در القای بی‌دردی به روش پس‌کشیدن دم در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی اثبات شده است [۱۸]. همچنین، اثرات ضددردی دارو به تنهایی مورد تاکید است [۱۸]. این نتایج با یافته‌های این پژوهش در تضاد نیستند اما تاکنون تحقیقی که به‌طور مستقیم درگیری ترکیبات موجود در زعفران را با گیرنده‌های NMDA نشان دهد، وجود ندارد. اینکه آیا عصاره زعفران خواص آنتاگونیستی گیرنده‌های گلوتاماتی را دارد یا خیر؟ هنوز روشن نیست، اما به نظر برخی محققان، عصاره زعفران توانایی عملکردی شبیه گلوتامات را دارد [۱۲]. به این ترتیب، شاید استفاده از سایر آنتاگونیست‌های گیرنده‌های NMDA مانند MK-801 بتواند در این زمینه راه‌گشا باشد.

استفاده از مهارگر آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز یعنی L-NAME باعث تقویت اثر دوز کم اثر زعفران گردید. تحقیقات قبلی نشان داده‌اند که فعال شدن گیرنده‌های NMDA می‌تواند به تحریک آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز و در نتیجه رهایی نیتریک‌اکساید منجر شود [۱۹].

(تربت حیدریه، خراسان رضوی) به‌خاطر 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 بقیه‌ا... (عج) است. محققان به این وسیله از حمایت مالی مراکز مذکور کمال تشکر را دارند.

منابع

- 1- Schoenen J, Sandor PS. Headache. In: Wall PD, Melzack R, editors. Text book of pain. USA: Churchill Livingstone; 1999. p. 761-98.
- 2- Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. Opiate tolerance and dependence: Receptors, G-proteins and antiopiates. Peptides. 1998;19:1603-4.
- 3- Payan DG. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; Nonopioid analgesics; Drugs used in gout. In: Katzung BG, editor. Basic and clinical pharmacology. USA: Appleton & Lange; 1992. p. 491-512.
- 4- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. Annu Rev Biochem. 2004;73:953-90.
- 5- Law PY, Loh HH, Wei LN. Insights into the receptor transcription and signaling: Implications in opioid tolerance and dependence. Neuropharmacology. 2004;47:300-11.
- 6- Huang KCH. The Pharmacology of Chinese Herb. 2nd ed. USA: CRC Press; 1999.
- 7- Zargari A. Medical Plants. Tehran: Tehran University Press; 1990. [Persian]
- 8- Agha-Hosseini M, Kashani L, Aleyaseen A, Ghoreishi A, Rahmanpour H, Zarrinara AR, et al. Crocus sativus L. (saffron) in the treatment of premenstrual syndrome: A double-blind, randomised and placebo-controlled trial. BJOG. 2008 Mar;115(4):515-9.
- 9- 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. 2004;4:12-6.
- 10- 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. 2005;97:281-4.
- 11- Hosseinzadeh H, Younesi HM. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice. BMC Pharmacol. 2002;2:7-15.
- 12- Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behavior and long-term potentiation. Phytother Res. 2002;14:149-52.
- 13- Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. Pain. 1987;30:103-14.
- 14- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brainstem stimulation in rats and cats. Pain. 1977;4:161-4.
- 15- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. Pain. 1989;38:347-52.
- 16- Hosseinzadeh H, Sadeghnia HR. Protective effect of safranal on pentylentetrazol-induced seizures in the rat: Involvement of GABAergic and opioids systems. Phytomedicine. 2007;14:256-62.

همچنین، برخی محققین معتقدند که عصاره زعفران ممکن است برخی اثرات خود را از طریق تحریک رهاشدن نیتریک‌اکساید انجام دهد [۲۰]. با توجه به اینکه مهار گیرنده‌های NMDA در این تحقیق تا حدودی توانست اثر زعفران را تقویت کند، نتایج حاصل از L-NAME در همین راستا ارزیابی می‌شود.

با توجه به اینکه محققان معتقدند که در فاز مزمن درد ناشی از آزمون فرمالین مسیرهای مرتبط با پروستاگلاندین‌ها فعال می‌شوند و این فاز با مهار سنتز این دسته از میانجی‌های التهابی مهار می‌گردد [۱۴]، اثر توأم تجویز عصاره زعفران و یکی از مهارگران سنتز پروستاگلاندین‌ها یعنی ایندومتاسین بر هر دو فاز درد ناشی از تزریق فرمالین بررسی شد. نتایج نشان داد که تجویز توأم این دو دارو در دوزهای بی‌اثر نمی‌تواند باعث بروز پاسخی قویتر در فاز مزمن درد فرمالین شود. این نتیجه بیانگر آن است که عصاره زعفران و ایندومتاسین اثر یکدیگر را در القای بی‌دردی در فاز مزمن آزمون فرمالین تقویت نمی‌کنند. با توجه به اینکه مکانیزم اثر ایندومتاسین، مهار تولید پروستاگلاندین‌ها از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز است [۱۴]، در این تحقیق نمی‌توان چنین اثری را برای زعفران در نظر گرفت. به این ترتیب، با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیق قبلی [۱۰]، می‌توان تا حدودی اظهار داشت که عصاره زعفران احتمالاً با مهار گیرنده‌های NMDA گلوتاماتی و نیز مهار آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز اثرات ضدالتهابی خود را القاء می‌کند، مکانیزمی که ممکن است در آینده بتوان با کار بر روی اجزای موثر این عصاره کارکرد دقیق آن را روشن کرد. در ضمن، نتایج تحقیق حاضر با عصاره آبی زعفران به‌دست آمد و ممکن است با توجه به تفاوت ترکیبات عصاره‌های آبی و الکلی این گیاه، اثرات قوی‌تر (یا ضعیف‌تری) در این مورد مشاهده شود.

نتیجه‌گیری

در مجموع، عصاره آبی زعفران می‌تواند اثر فرمالین در فاز مزمن را مهار کند و این اثر با آنتاگونیست گیرنده‌های اویپوئیدی و مهارگر آنزیم سیکلواکسیژناز قابل برگشت یا تقویت نیست. درحالی‌که آنتاگونیست گیرنده‌های NMDA و مهارگر آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز، اثر عصاره را تقویت می‌کنند. بنابراین، به نظر می‌رسد عصاره آبی زعفران، اثر خود در کاهش درد در فاز مزمن آزمون فرمالین را نه از طریق مهار تولید پروستاگلاندین‌ها و مهار آنزیم سیکلواکسیژناز، بلکه از طریق مهار آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز انجام می‌دهد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان از جناب آقای مهندس جعفری، مدیر عامل محترم شرکت کشاورزی طلاکاران مزرعه خراسان

- 19- Garthwaite J, Southam E, Anderton M. A kainite receptor, linked to nitric oxide synthesis from arginine. *J Neurochem.* 1989;53:1952-4.
- 20- Yang R, Tan X, Thomas AM, Shen J, Qureshi N, Morrison DC, et al. Crocetin inhibits mRNA expression for tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in hemorrhagic shock. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006;30:297-301.
- 17- Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr.* 2007;157:315-9.
- 18- Chen SL, Huang EYK, Chow LH, Tao PL. Dextromethorphan differentially affects opioid antinociception in rats. *Br J Pharmacol.* 2005;144:400-4.