

## مهار درد و التهاب ناشی از تست فرمالین در موش‌های نر کوچک آزمایشگاهی با عصاره اتانولی زعفران (*Crocus sativus*) و اجزای آن؛ کروسین و ساfranال

سیما نصری<sup>۱</sup> PhD، سیده یاسمن حسینی<sup>۱</sup> MSc، هدایت صحرایی<sup>\*</sup> PhD، حمیرا زردوز<sup>۲</sup> PhD

<sup>\*</sup> مرکز تحقیقات علوم اعصاب کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه... (عج)، تهران، ایران  
<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

### چکیده

**اهداف:** مطالعات نشان داده که عصاره آبی-الکلی زعفران قادر به مهار درد و التهاب ناشی از فرمالین در موش‌های نر کوچک است. به دلیل تفاوت ترکیب عصاره الکلی با عصاره آبی-الکلی، در این مطالعه اثر عصاره اتانولی زعفران بر درد حاد و مزمن در موش‌های نر کوچک بررسی شد.  
**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی روی موش‌های نر نژاد NMRI با میانگین وزنی ۲۰ تا ۲۵ گرم (۶ سر در هر آزمایش) انجام شد. داروها ۳۰ دقیقه قبل از تجویز فرمالین ۲٪ استفاده شدند. پس از تزریق فرمالین، پاسخ حیوانات به مدت ۶۰ دقیقه و هر ۵ دقیقه یکبار بررسی شد. التهاب در دقیقه ۲۵ به روش غوطه‌وری در جیوه بررسی شد. داده‌ها با آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و توکی با SPSS 9.01 تحلیل شد.  
**یافته‌ها:** عصاره الکلی زعفران در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم در فاز حاد و در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در فاز مزمن اثر ضددرد نشان داد. نالوکسان، دکسترومتورفان و L-NAME اثر عصاره زعفران در فاز حاد و مزمن را مهار نمود. ساfranال در فاز حاد و کروسین در فاز مزمن اثر ضددرد نشان داد. عصاره زعفران (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) التهاب را به ترتیب ۳۰٪، ۶۶٪ و ۸۰٪ مهار کرد، اما ساfranال و کروسین در این مورد اثری نداشتند.  
**نتیجه‌گیری:** عصاره اتانولی زعفران توانایی مهار فاز حاد درد ناشی از فرمالین را دارد و احتمالاً این اثر تا قسمتی ناشی از ساfranال است. تحریک احتمالی مسیرهای وابسته به گیرنده‌های اویپوئیدی، NMDA گلوتاماتی و نیتریک‌اکساید در مهار فاز حاد و مزمن درد دخالت دارند.  
**کلیدواژه‌ها:** عصاره اتانولی زعفران، بی‌دردی، ساfranال، کروسین

## Inhibition of pain and inflammation induced by formalin in male mice by ethanolic extract of saffron (*Crocus sativus*) and its constituents; crocin and safranal

Nasri S.<sup>1</sup> PhD, Hosseini S. Y.<sup>1</sup> MSc, Sahraei H.\* PhD, Zardooz H.<sup>2</sup> PhD

\*Applied Neuroscience Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Tehran Branch, Payam-e-Noor University, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Aims:** Previous investigations have confirmed the anti-inflammatory and analgesic effects of aqueous-ethanol extract of saffron on formalin induced pain in small male mice. Since there is difference between ethanol and aqueous-ethanol extract of saffron, this study was performed in order to evaluate the effect of ethanol saffron extract on acute and chronic pain in small male mice.

**Materials & Methods:** This experimental study was performed on male NMRI mice which weighed 20-25 grams (6 in each test). Drugs were administered 30 minutes before 2% formalin solution injection. Then the animals were evaluated for 60 minutes in 5 minutes intervals. Inflammation was investigated in minute 25 by Mercury immersion method. Data were analyzed with one way variance analysis and Tukey's test by SPSS 9.01 software.

**Results:** Ethanol saffron extract showed anti-nociceptive effect in 5 mg/kg dose for acute phase and in 10 mg/kg dose for chronic phase. Naloxane, Dextromethorphan and L-NAME inhibited the extract action in acute phase as well as chronic phase. Safranal showed anti-nociceptive effect in acute phase and Crocin in chronic phase. Saffron extract with dose of 2.5, 5 and 10 mg/kg controlled inflammation 30%, 66% and 80% respectively, but Safranal and Crocin didn't show a similar effect.

**Conclusion:** Ethanol extract of *C. sativus* exerts its effect on the acute phase of formalin test, which is possibly caused by Safranal. Probable stimulation of opioid, NMDA glutamatergic and nitric oxide dependent pathways leads to pain inhibition in acute and chronic phases.

**Keywords:** Ethanol Extract of *Crocus sativus*, Analgesia, Safranal, Crocin

## مقدمه

از آنجا که مهار درد و عوارض ناشی از آن بسیار حایز اهمیت است، همه‌ساله تحقیقات متعدد و مختلفی برای یافتن راه‌های بهتر مقابله با درد در جهان انجام می‌شود. مسیرهایی که در انتقال درد نقش دارند، تا حدود زیادی شناخته شده‌اند و امروزه داروهای زیادی برای کنترل این مسیرها در دسترس پزشکان قرار دارد [۱، ۲] که از آن جمله می‌توان به داروهای ضد درد اویپوئیدی اشاره کرد. این داروها که از دیرباز توسط بشر شناخته شده و به کار رفته است، اثرات خود را بیشتر در نخاع شوکی یا ساقه مغز بروز می‌دهند [۲]. البته باید در نظر داشت که این داروها با القای تحمل و وابستگی، باعث بروز اثرات ناخواسته می‌شوند، بنابراین باید در مصرف آنها احتیاط نمود [۳، ۴]. همچنین داروهای ضد درد ملایم‌تر مانند داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی نیز شناخته شده‌اند که اثرات خود را با مهار مسیرهای التهابی (مسیرهایی پروستاگلندینی) اعمال می‌کنند [۱، ۵]. در حقیقت می‌توان گفت که این داروها اثر خود را در مهار درد، در قسمت‌های محیطی اعمال می‌کنند. متأسفانه این قبیل داروها نیز اثرات جانبی خود را داشته و باعث بروز عوارض گوارشی مانند خونریزی دستگاه گوارش می‌شوند [۶]. به همین دلیل یافتن داروهای جدید برای کاهش درد که عوارض کمتری نسبت به داروهای موجود داشته باشند، از مهم‌ترین اهداف تحقیقات در این زمینه است.

گیاهان دارویی و داروهای مشتق از آنها، از مهم‌ترین منابع مورد تحقیق در خصوص درمان یا تسکین درد هستند که از قدیم‌الایام به‌عنوان منابع مهم درمانی توسط بشر شناخته شده‌اند. امروزه نیز با توجه به سهولت دسترسی به این داروها، تمرکز زیادی برای استفاده از آنها و تحقیق در مورد خواص آنها وجود دارد [۷]. زعفران از جمله گیاهانی است که از قدیم در نقاط مختلف دنیا به‌عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرار گرفته است [۸]. در ایران این گیاه به‌عنوان ضد اسپاسم، آرام‌بخش، کمک‌کننده هضم غذا، ضد نفخ، معرق، خلط‌آور، محرک میل جنسی و تسکین‌دهنده درد استفاده شده است [۸]. در طب چینی نیز این گیاه برای درمان آمنوره [۷] مورد استفاده قرار گرفته است. زعفران، گیاهی از تیره زنبق و چندساله به ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متر و دارای پیازی سخت، مدور، گوشت‌دار و پوشیده از غشاهای نازک و قهوه‌ای‌رنگ است. گل‌های زعفران، بنفش‌رنگ، دارای خامه بلند و کلاله سه‌قسمتی به‌رنگ نارنجی یا قرمز است که همین قسمت به‌عنوان زعفران ارزش تجاری دارد [۸]. زعفران دارای مواد چرب، املاح معدنی و موسیلاژ است. ترکیبات دیگری نیز در زعفران یافت می‌شود؛ از جمله؛ اسانس بی‌رنگی مرکب از تربین‌ها و سینتول که بوی زعفران مربوط به این مواد است. پیکروکروسین که یک هتروزید تلخ است و در آب و الکل به‌راحتی حل می‌شود. گلوکزیدی به نام پیکروکروسین که از هیدرولیز آن پیکوکروسین و گلوکز به دست می‌آید. کروسین که ماده اصلی رنگی زعفران و نوعی کاروتنوئید است [۷].

در تحقیقات قبلی، توجه زیادی به اثر ضد افسردگی عصاره زعفران در انسان شده است. برای مثال، آفاحسینی و همکاران، تاثیر زعفران را بر افسردگی در خانم‌های مبتلا به سندروم پیش از قاعدگی در مقایسه با گروه دارونما مورد مطالعه قرار دادند. این تحقیق نشان داد که عصاره زعفران، قادر به کاهش علائم افسردگی است [۹]. آخوندزاده و همکاران در تحقیق دیگری، اثر عصاره گیاه زعفران را با ایمی‌پرامین به‌عنوان داروی ضد افسردگی رایج در درمان افسردگی‌های خفیف تا متوسط مطالعه کردند [۱۰]. این تحقیق نیز نشان داد که عصاره زعفران، همان کارایی ایمی‌پرامین را بدون عوارض جانبی دارد. همچنین نوربالا و همکاران در تحقیق خود با بررسی اثر عصاره آبی-الکی زعفران بر بهبود افسردگی خفیف تا متوسط و مقایسه اثر آن را با فلوکزین، اثر عصاره را مورد تایید قرار دادند [۱۱].

از سوی دیگر در تحقیقات قبلی، توانایی ضد درد و ضد التهابی عصاره زعفران در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نسبت به داروهای ضد درد و ضد التهاب رایج نشان داده شده است [۱۲]. از جمله این تحقیقات، بررسی اثر ضد درد عصاره آبی زعفران در مدل آزمون فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی است که بر اثربخشی عصاره آبی زعفران در القای بی‌دردی در فاز مزمن آزمون فرمالین (که فاز کاملاً التهابی و با واسطه پروستاگلاندین‌ها است)، تاکید دارد [۱۳]. اثرات دیگری نیز از عصاره زعفران مشاهده شده که از جمله می‌توان به تاثیر کروسین در بهبود حافظه و القای پدیده تقویت طولانی‌مدت (LTP) در موش‌های بزرگ آزمایشگاهی نر اشاره کرد [۱۴]. با این حال تاکنون تحقیقی در مورد اثرات عصاره اتانولی زعفران بر بی‌دردی ناشی از آزمون فرمالین به‌عنوان مدلی که امکان بررسی درد حاد و مزمن را فراهم می‌کند [۱۵]، انجام نشده است.

هدف از این مطالعه، بررسی توانایی عصاره اتانولی زعفران در القای بی‌دردی و مهار التهاب در روش آزمون فرمالین در موش کوچک آزمایشگاهی نر بود.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر 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 ۲۲-۲۴ درجه سانتی‌گراد، با آب و غذای کافی نگهداری می‌شدند.

**عصاره‌گیری:** کلاله گیاه زعفران، تهیه شده در سال ۱۳۸۷ توسط شرکت طلاکاران مزرعه (تربت حیدریه- خراسان رضوی) در اختیار گروه تحقیق قرار گرفت. زعفران به آزمایشگاه دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی منتقل و پس از شناسایی توسط مهندس کمالی‌نژاد، کد ۴۰۸ به آن داده شد. از پودر این کلاله به‌روش "خیساندن"، عصاره اتانولی گرفته شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم از پودر کلاله خشک شده در بالن شیشه‌ای به حجم ۲ لیتر ریخته شد و

به‌عنوان گروه کنترل مثبت، یک گروه ایندومتاسین را به‌عنوان گروه کنترل مثبت و گروه آخر نیز مورفین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به‌عنوان گروه کنترل مثبت دریافت کردند.

**بررسی التهاب ناشی از تجویز فرمالین:** اثر ضدالتهابی عصاره زعفران، سافرانال و کروسین با استفاده از آزمون التهاب ناشی از تزریق فرمالین به کف پا بررسی شد [۱۷، ۱۸]. ابتدا فرمالین به کف پای حیوانات (n=۶) تزریق شد. سپس پای حیوان در دقایق ۵، ۱۰، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ پس از تزریق، در داخل جیوه قرار گرفت تا حجم آن تعیین شود. برای تعیین حجم پای حیوان، وزن جیوه پس از قراردادن پای حیوان در آن بر وزن حجمی جیوه (۱۳/۶ گرم بر سانتی‌متر مکعب) تقسیم شد [۱۷، ۱۸]. در این قسمت نیز تزریق فرمالین ۳۰ دقیقه پس از تزریق سالیان یا دارو انجام گرفت.

**بررسی اثر آنتاگونیست گیرنده‌های اوبیوئیدی، گلوتاماتی و مهارگر آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز بر بی‌دردی ناشی از عصاره اتانولی زعفران:** به‌منظور بررسی نقش گیرنده‌های اوبیوئیدی بر بی‌دردی ناشی از عصاره زعفران، از ۲ گروه حیوان استفاده شد. یک گروه از حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از دریافت عصاره زعفران (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، نالوکسان (۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند. گروه دوم، سالیان (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) دریافت کرده و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند. به‌منظور بررسی اثر مهار گیرنده‌های گلوتاماتی، یک گروه از حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از دریافت عصاره زعفران (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، دکسترومتورفان (۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند. گروه کنترل، سالیان (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) دریافت نموده و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند. نقش مهار آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز بر عملکرد عصاره زعفران با استفاده از داروی L-NAME که مهارگر آنزیم نیتریک‌اکساید سنتاز است، بررسی شد. به این منظور یک گروه از حیوانات ۳۰ دقیقه قبل از دریافت عصاره زعفران (۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، L-NAME (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) دریافت کردند. گروه کنترل نیز سالیان (۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم) دریافت کرده و ۳۰ دقیقه بعد مورد آزمون قرار گرفتند.

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** اطلاعات به‌دست‌آمده به‌صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد بیان شد. به‌منظور تجزیه و تحلیل اطلاعات از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و به‌دنبال آن، آزمون توکی استفاده شد.  $p < 0.05$  مرز معنی‌دار بودن اطلاعات در نظر گرفته شد.

## نتایج

**القای بی‌دردی توسط عصاره زعفران، سافرانال، کروسین، دگزاتازون، ایندومتاسین و مورفین:** تجویز عصاره الکلی زعفران در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم قادر به مهار فاز حاد درد و در دوز ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم قادر به مهار فاز مزمن درد ناشی از تزریق فرمالین بود. تجویز سافرانال در دوز ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم، قادر به

به آن ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰٪ اضافه شده و برای مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور هم زده شد. سپس محلول رویی از صافی کاغذی متغیر با قطر منفذ ۴ میکرومتر عبور داده شد. این محلول برای مدت یک هفته در دستگاه بن‌ماری با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا الکل عصاره به‌آرامی تبخیر شده و پودر عصاره به‌جا ماند. این عصاره در سالیان حل شده و به‌صورت داخل‌صفاقی به حیوانات تزریق می‌شد. از هر ۱۰۰ گرم پودر گیاه، ۲۰ گرم عصاره خشک به‌دست می‌آمد. این عصاره به دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی منتقل و از نظر میزان سافرانال به‌روش HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از وجود ۲۰٪ سافرانال در این عصاره بود. دوزهای عصاره، براساس میزان سافرانال تعیین و مورد استفاده قرار گرفتند.

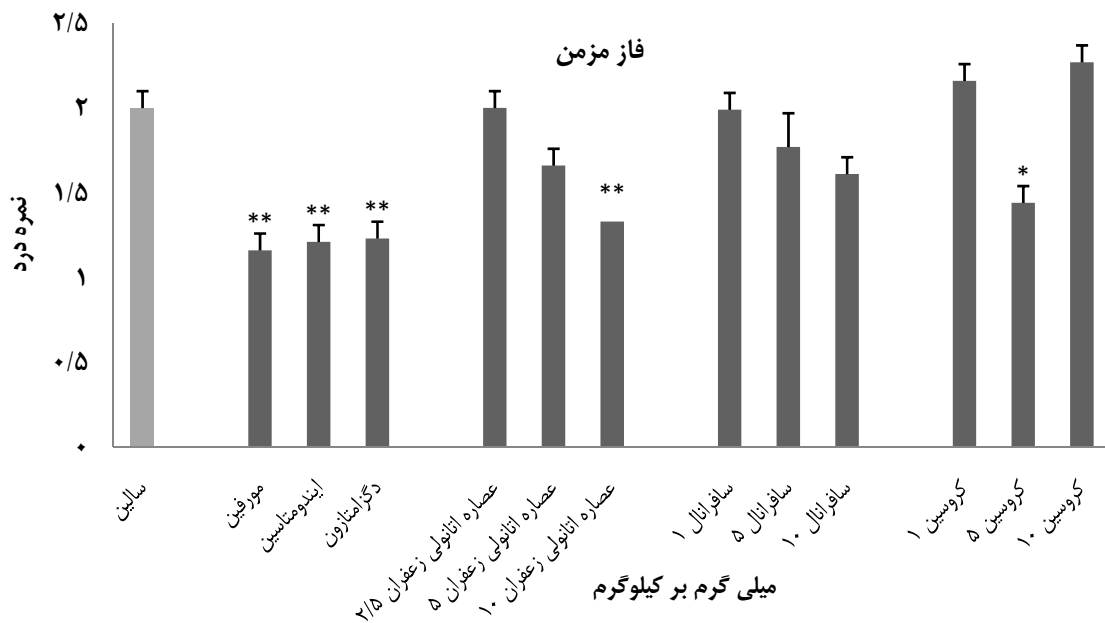
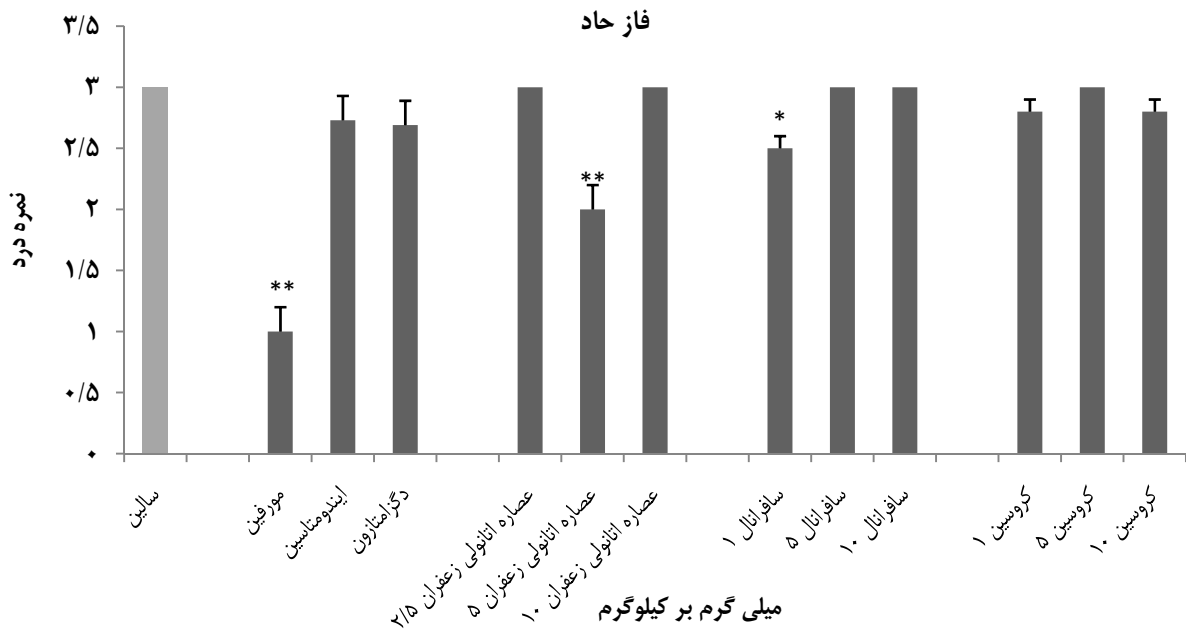
**داروها:** داروهای مورد استفاده، مورفین سولفات (تماد؛ ایران)، دکسترومتورفان هیدروبروماید، ایندومتاسین هیدروکلراید، L-NAME (L-نیترو-آرژینین متیل‌استر) و نالوکسان هیدروکلراید (سیگما؛ ایالات متحده) بودند. همه داروها در سالیان حل شدند و با حجم ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به‌صورت زیرجلدی (مورفین) یا داخل‌صفاقی (بقیه داروها) مورد استفاده قرار گرفتند. عصاره زعفران نیز پس از توزین در سالیان حل شد و به‌صورت داخل‌صفاقی مورد استفاده قرار گرفت. گروه‌های کنترل در هر قسمت سالیان را به‌صورت زیرجلدی یا داخل‌صفاقی دریافت کردند.

**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 می‌شدند و پس از عادت کردن به محیط، ۲ میکرولیتر محلول فرمالین ۲٪ به کف پنجه موش تزریق می‌شد. حیوانات بلافاصله پس از تزریق فرمالین در داخل محفظه‌ای از جنس پلاستیکی گلاس به ابعاد ۳۰×۳۰×۳۰ سانتی‌متر قرار می‌گرفتند و هر ۵ دقیقه یک‌بار به‌مدت ۶۰ دقیقه از نظر میزان بی‌دردی به‌روش دوپیسون و دنس [۱۶] بررسی می‌شدند. آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه در زیر این محفظه تعبیه شده بود تا پنجه پای حیوان به‌راحتی دیده شود. داروهای مورد استفاده، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین به‌صورت زیرجلدی یا داخل‌صفاقی به حیوانات تزریق می‌شد. در مواردی که بیش از یک دارو مورد استفاده قرار می‌گرفت، فاصله زمانی ۳۰ دقیقه بین تزریق‌ها رعایت می‌شد.

**القای بی‌دردی توسط عصاره زعفران، سافرانال، کروسین، دگزاتازون، ایندومتاسین و مورفین:** در این قسمت از آزمایش، موش‌ها به ۱۳ گروه تقسیم شدند. گروه اول سالیان را به‌عنوان گروه کنترل منفی، ۳ گروه دوزهای مختلف عصاره زعفران (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به‌صورت داخل‌صفاقی، ۳ گروه دوزهای مختلف سافرانال (۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به‌صورت داخل‌صفاقی، ۳ گروه دوزهای مختلف کروسین (۱، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به‌صورت داخل‌صفاقی، یک گروه دگزاتازون را

ولی در فاز مزمن در دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش درد شد. تجویز مورفین در هر دو فاز حاد و مزمن، درد را کاهش داد. ایندومتاسین و دگزامتازون در فاز حاد تاثیر معنی داری بر کاهش درد نداشتند، ولی در فاز مزمن منجر به کاهش درد شدند (نمودار ۱).

مهار فاز حاد درد ناشی از فرمالین بود و در دوزهای ۱۰ و ۵ میلی گرم بر کیلوگرم بر فاز حاد درد تاثیر نداشت. سافرانال در فاز مزمن درد در دوز ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم باعث کاهش درد ناشی از تزریق فرمالین شد. تجویز کروسین تاثیر معنی داری بر فاز حاد درد نداشت،

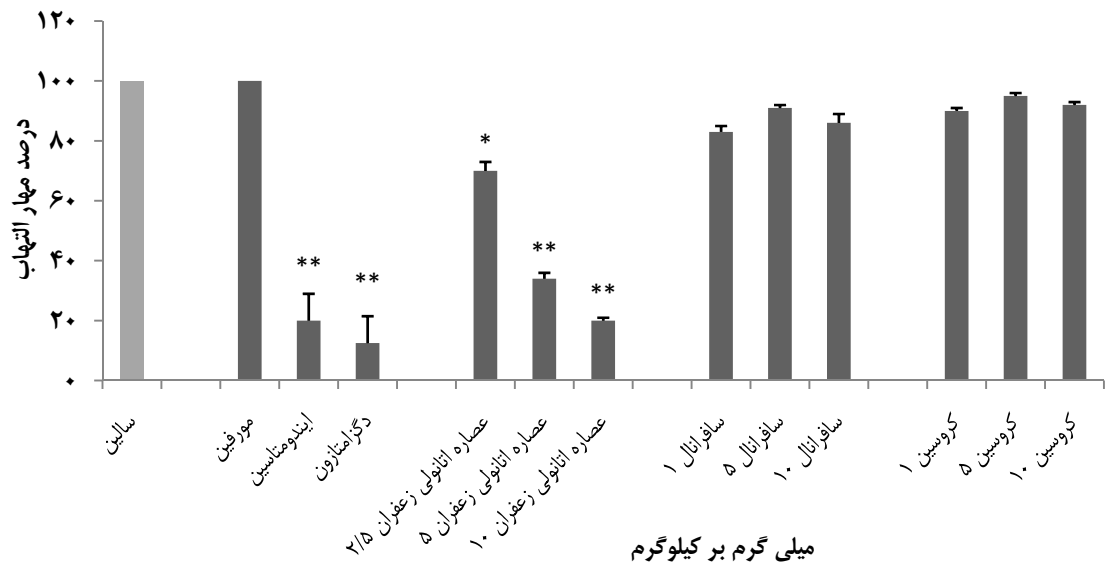


نمودار ۱) اثر عصاره اتانولی زعفران، سافرانال و کروسین در القای بی‌دردی در موش‌های کوچک آزمایشگاهی به روش آزمون فرمالین (فاز حاد و فاز مزمن). نمره درد در مورد ۶ سر حیوان است. \* $p < 0.05$  و \*\* $p < 0.01$  نسبت به گروه شاهد (سالیین) است.

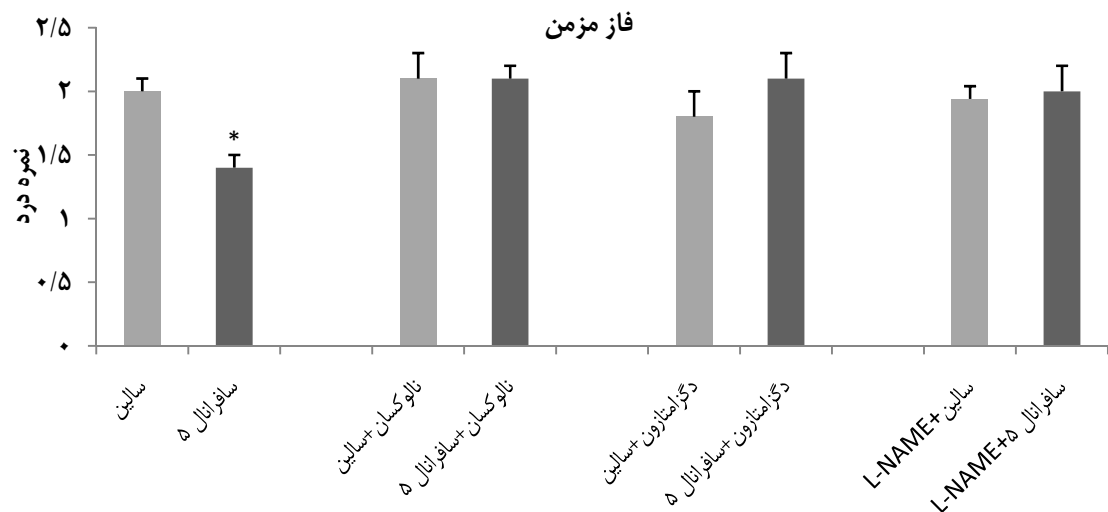
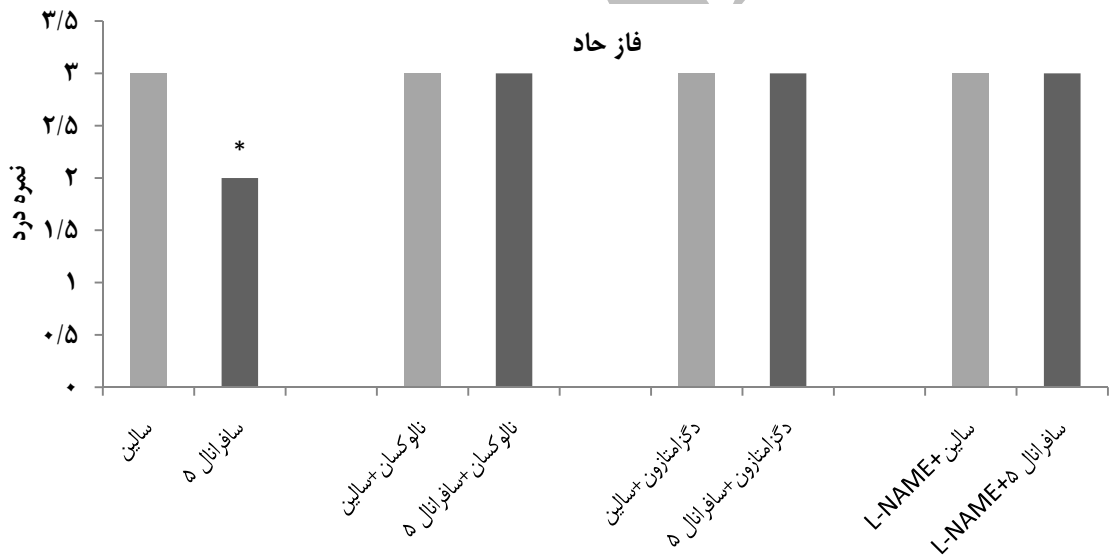
۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و کروسین (۱، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) توانایی مهار التهاب ناشی از فرمالین را نداشتند (نمودار ۲).  
**بررسی اثر آنتاگونیست گیرنده‌های اوبیوئیدی، گلوتاماتی و مهارگر آنزیم نیتریک اکساید سنتاز بر بی‌دردی ناشی از عصاره اتانولی زعفران:** تجویز نالوکسان، دکسترومتورفان و L-

**بررسی مهار التهاب ناشی از تزریق فرمالین توسط عصاره اتانولی زعفران، سافرانال، کروسین، دگزامتازون، ایندومتاسین و مورفین:** عصاره زعفران (۲/۵، ۵ و ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم) توانست التهاب ناشی از تجویز فرمالین را به صورت وابسته به دوز، مهار نماید (به ترتیب ۳۰٪، ۶۶٪ و ۸۰٪). اما سافرانال (۱، ۵ و

مهار درد و التهاب ناشی از تست فرمالین در موش‌های نر کوچک آزمایشگاهی با عصاره اتانولی زعفران و اجزای آن ۱۹۳  
 NAME به همراه عصاره زعفران، باعث مهار بی‌دردی ناشی از تزریق عصاره اتانولی زعفران در هر دو فاز حاد و مزمن شد (نمودار ۳).



نمودار ۲ اثر عصاره اتانولی زعفران، سافراناال و کروسین در مهار التهاب ناشی از تزریق فرمالین در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. حجم پا در مورد ۶ سر حیوان است. \* $p < 0.05$  و \*\* $p < 0.01$  نسبت به گروه شاهد (سالیین) است.



نمودار ۳ اثر مهار گیرنده‌های اوبیوئیدی، گلوتاماتی و آنزیم نیتریک اکساید سنتاز بر بی‌دردی ناشی از عصاره اتانولی زعفران در فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین. نمره درد در مورد ۶ سر حیوان است. \* $p < 0.01$  نسبت به گروه شاهد مربوطه است.

## بحث

تحقیق *اربابیان* و همکاران نشان داد که عصاره الکی زعفران نیز همانند عصاره آبی این گیاه، توانایی مهار درد ناشی از تجویز فرمالین را در موش‌های کوچک آزمایشگاهی دارد [۱۳]. نتایج ما نشان دادند که تجویز عصاره الکی زعفران به صورت وابسته به دوز، باعث مهار فاز مزمن درد ناشی از فرمالین می‌شود. همچنین این عصاره در دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، قادر به مهار فاز حاد درد ناشی از فرمالین بود. در حالی که در فاز مزمن، دوزهای بالای عصاره اثربخشی نشان دادند. از سوی دیگر تجویز سافرانال و کروسین که دو جزء اصلی عصاره زعفران محسوب می‌شوند نیز توانست فاز دوم درد ناشی از تزریق فرمالین را مهار کند، در حالی که تنها سافرانال قادر به مهار فاز حاد درد ناشی از فرمالین بود. به این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مهار درد حاد ناشی از تجویز عصاره الکی زعفران به دلیل وجود سافرانال در این عصاره بوده است. لازم به توضیح است که طبق تحقیقات گذشته، درصد سافرانال در عصاره الکی بیش از عصاره آبی تعیین شده است [۱۹].

در ادامه، تحقیق ما نشان داد که عصاره الکی زعفران، سافرانال و کروسین، همگی قادر به مهار التهاب ناشی از تزریق فرمالین بودند، در حالی که اثربخشی عصاره، بسیار بیشتر از کروسین و سافرانال به تنهایی بود. از این یافته می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که چون عصاره هم حاوی سافرانال و هم حاوی کروسین بوده است، احتمالاً اثربخشی بهتری نسبت به هر کدام از این دو جزء به تنهایی نشان داده است. همچنین ممکن است اجزای دیگری از عصاره نیز در این امر دخالت داشته باشند، از جمله پیکوکروسین و کروسین که بایستی در تحقیقات بعدی اثربخشی آنها نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تحقیق حسین‌زاده نشان داد که عصاره زعفران قادر است فاز دوم درد ناشی از تزریق فرمالین را در موش کوچک آزمایشگاهی نر مهار کند و نیز توانایی مهار ادم ناشی از قراردادن کتان آغشته به گزین در زیر پوست گوش موش را دارد [۱۲]. همچنین عصاره آبی-الکی زعفران توانسته است درد را در روش پس‌کشیدن دم نیز در موش کوچک آزمایشگاهی مهار کند [۲۰]. در تحقیق حاضر همخوان با تحقیقات قبلی، تجویز عصاره الکی زعفران نیز اثرات مشابهی را از خود نشان داد. این تحقیق بیانگر توانایی عصاره الکی زعفران در مهار درد و التهاب است و بیان می‌کند که عصاره الکی زعفران، کروسین، سافرانال و احتمالاً اجزای دیگری از این عصاره قادرند روندهای فعال شده در بدن حیوان را که ناشی از تزریق فرمالین بوده، مهار کنند و این روندها را به حالت عادی برگردانند. تحقیق ما بیانگر آن است که عصاره الکی زعفران برخلاف عصاره آبی آن، توانایی مهار فاز حاد آزمون فرمالین را نیز دارد [۱۳]. از آن‌جا که براساس تحقیقات قبلی، فاز حاد آزمون فرمالین، روند نوروژنیک بوده و ناشی از تحریک شدید پایانه‌های درد موجود در کف پای حیوان است [۲۱]، به نظر می‌رسد که عصاره الکی زعفران و نیز سافرانال دارای توانایی مهار این فاز آزمون

فرمالین به دلیل مهار مکانیزم‌های عصبی هستند. تحقیقات قبلی نشان دادند که عصاره زعفران توانایی مهار گیرنده‌های NMDA-متیل‌دی‌آسپارتاتی (گیرنده‌های NMDA) گلوتاماتی را دارد [۲۲]. از آن‌جا که آنتاگونیست‌های گیرنده‌های NMDA نظیر NK 801 و ممانتین توانایی القای بی‌دردی را دارند [۲۳]، به نظر می‌رسد که سافرانال و نیز جزء یا اجزایی از عصاره الکی با اتصال به این گیرنده‌ها در نواحی مختلف دستگاه عصبی و مهار آنها، در القای بی‌دردی در فاز یک آزمون فرمالین دخالت داشته باشند.

در تحقیق ما، عصاره الکی و نیز سافرانال و کروسین به نحو چشمگیری قادر به مهار درد در فاز دوم آزمون فرمالین و نیز قادر به مهار التهاب ناشی از فرمالین بودند. تحقیقات نشان دادند که فاز دوم درد ناشی از تزریق فرمالین، فاز کاملاً التهابی بوده و روندهای ایجاد التهاب و نیز روندهای ناشی از درد التهابی در ایجاد این مرحله دخالت دارند. به همین دلیل داروهای مهارکننده سنتز پروستاگلندین‌ها (داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی) مانند ایندومتاسین و آسپیرین و اسید سالیسیلیک، این فاز را به خوبی مهار می‌کنند و التهاب را نیز کاهش می‌دهند. همچنین داروهای ضدالتهاب استروئیدی مانند دگزامتازون نیز این فاز را مهار می‌کنند [۲۱]. در تحقیق حاضر نیز مهار التهاب و درد ناشی از فاز دوم آزمون فرمالین توسط عصاره الکی زعفران و اجزای مهم آن ممکن است به یکی از دو دلیل زیر باشد؛ ۱- ممکن است این داروها با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز که آنزیم اصلی تولیدکننده پروستاگلندین‌ها در بدن است، این فاز را کاهش داده باشند.

۲- ممکن است این داروها اثری شبیه هورمون‌های گلوکوکورتیکوئید داشته باشند یا این که اجزای عصاره، باعث تحریک رهاشدن هورمون‌های گلوکوکورتیکوئیدی از قسمت قشری غده فوق کلیه شده باشند.

تحقیق ما در یک جمع‌بندی نشان داد که هر دو فاز نوروژنیک و التهابی آزمون فرمالین، تحت اثر عصاره الکی زعفران قرار گرفته و کاهش می‌یابند.

طبق نتایج تحقیق حاضر، تجویز آنتاگونیست‌های گیرنده‌های اوپیوئیدی، گلوتاماتی و مهارگر آنزیم نیتریک‌اکسیدسنتتاز، باعث مهار اثر عصاره در هر دو فاز اول و دوم درد شد. از آن‌جا که تمام مسیرهای ضد درد در سیستم عصبی، در نهایت اثر خود را از طریق اوپیوئیدهای درون‌زاد اعمال می‌کنند، به نظر می‌رسد که مهار گیرنده‌های اوپیوئیدی به راحتی توانسته است اثربخشی خود را در مهار اثرات ضد درد عصاره نشان دهد. همچنین همان‌طور که در بالا گفته شد، با توجه به این که عصاره، اثر آنتاگونیستی گیرنده‌های NMDA را نیز از خود نشان می‌دهد، اثر عصاره با اثر آنتاگونیست گیرنده NMDA و مهارگر آنزیم نیتریک‌اکسیدسنتتاز مهار شد. لازم به توضیح است که تقریباً نیمی از اثرات گیرنده‌های NMDA از طریق فعال شدن آنزیم نیتریک‌اکسیدسنتتاز و رهاشدن نیتریک‌اکساید انجام می‌گیرد و به

- 10- Akhondzadeh S, 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.
- 11- Noorbala AA, Akhondzadeh S, 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*. 2005;97:281-4.
- 12- 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.
- 13- Arbabian S, Izadi H, Ghoshooni H, Shams J, Zardooz H, Kamalinejad M, et al. Water extract of saffron (*Crocus sativus*) inhibits chronic phase of formaline test in female mice. *Kowsar J*. 2009;14:11-8. [Persian]
- 14- Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. *Phytother Res*. 2002;14:149-52.
- 15- Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987;30:103-14.
- 16- 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.
- 17- Ferreidoni M, Ahmadiani A, Semnani S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *J Pharmacol Toxicol Method*. 2000;43:11-4.
- 18- Ahmadiani A, Hosseiny J, Semnani S, Javan M, Saeedi F, Kamalinejad M, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia* fruit extract. *J Ethnopharmacol*. 2000;72:287-92.
- 19- Schmidt M, Betti G, Hensel A. Saffron in phototherapy: Pharmacology and clinical uses. *Wien Med Wochenschr*. 2007;157:315-9.
- 20- Shams J, Molavi S, Marjani S, Kamalinejad M, Zardooz H, Sahraei H, et al. The aqueous extract of *Crocus sativus* stigma reduces morphine tolerance. *Physiol Pharmacol*. 2009;13(2):170-8. [Persian]
- 21- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain*. 1989;38:347-52.
- 22- Popik P, Kozela E, Danysz W. Clinically available NMDA receptor antagonist's memantine and dextromethorphan reverse existing tolerance to the antinociceptive effects of morphine in mice. *Pharmacology*. 2000;361:425-32.
- 23- Lechtenberg M, Schepmann D, Niehues M, Hellenbrand 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  $\sigma_1$  (Sigma-1) receptors. *Planta Med*. 2008;74:764-72.

همین دلیل به نظر می‌رسد مکانیزم نیتریک‌اکسید وابسته به NMDA گلوتاماتی در عملکرد عصاره در کاهش درد فاز حاد آزمون فرمالین دخالت داشته است.

## نتیجه‌گیری

عصاره اتانولی زعفران، توانائی مهار فاز حاد درد ناشی از آزمون فرمالین را دارد و ممکن است این اثر تا حدودی به سافرانال مربوط باشد. همچنین تحریک احتمالی مسیرهای وابسته به گیرنده‌های اوبیوئیدی، NMDA گلوتاماتی و نیتریک‌اکساید، در مهار فاز حاد و مزمن درد ناشی از آزمون فرمالین دخالت دارند.

**تشکر و قدردانی:** نویسندگان از جناب آقای مهندس جعفری، مدیر عامل محترم شرکت کشاورزی طلاکاران مزرعه خراسان (ترتیب حیدریه- خراسان رضوی) به‌خاطر اهدای زعفران کمال تشکر را دارند.

## منابع

- 1- Schoenen J, Sandor PS. Textbook of pain. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1999.
- 2- Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. Opiate tolerance and dependence: Receptors, G-proteins and antiopiates. *Peptides*. 1998;19:1603-30.
- 3- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. Opioid receptors. *Ann Rev Biochem*. 2004;73:953-90.
- 4- Law PY, Loh HH, Wei LN. Insights into the receptor transcription and signalling: Implications in opioid tolerance and dependence. *Neuropharmacology*. 2004;47:300-11.
- 5- Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*. 2004;56(3):387-437.
- 6- Payan DG. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, nonopioid analgesics, drugs used in gout. In: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. USA: Appleton and Lange; 1992.
- 7- Huang KCH. The pharmacology of Chinese herb. 2<sup>nd</sup> ed. USA: CRC Press; 1999.
- 8- Zargari A. Medical plants. Tehran: Tehran University Press; 1990. [Persian]
- 9- 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;115(4):515-9.