Original Article

The Effect of Crocin and its Mechanism of Action on Chronic Pain Induced by Spinal Cord Contusion in a Rat Model

Masoume Karami[1], Seyede Zahra Bathaie[2*], Taqi Tiraihi[3], Mehran Habibi Rezaie[4], Jalil Arab-Kheradmand[5], Soghrat Faghihzadeh[6]

1- Ph.D. Candidate, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2- Associated Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
4- Associated Professor, Department of Molecular Biology, School of Biology, College of Science, Tehran University, Tehran, Iran
5- M.D., Shefa Neuroscience Research Center, Khatam al-Anbia Hospital, Tehran, Iran
6- Associated Professor, Department of Biostatistics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran*
Email: bathai_z@modares.ac.ir

Received: 17/Jan/2013, Accepted: 07/Mar/2013

Abstract

Objective: Various approaches have been offered for resolution of pain resulting from spinal cord injuries. One approach is the use of herbal and natural products. In the present research, as a preliminary study, we investigate the effect of crocin on chronic pain induced by contusion in the rat spinal cord (SCI).

Methods: We randomly divided female Wistar rats into five groups. Groups I and II were contused at the L1 level and immediately treated with crocin (50 mg/kg). These groups were sacrificed after 2 hours and 1 week, respectively. The remaining three groups consisted of group III (control group), group IV (treated with crocin and no contusion), and group V (the contused group that underwent no treatment). Groups III-V were sacrificed after one week. The mechanical behavioral test that used Von Frey hairs; the thermal behavioral test that used a hot-plate and the locomotor recovery test with Basso, Beattie and Bresnahn (BBB) scoring were conducted daily to evaluate the extent of injury and recovery of the rats. The calcitonin-gene related peptide (CGRP) was determined in the animals' plasma by the ELISA kit.

Results: The results showed a significant increase in plasma CGRP of contused rats that significantly reduced following crocin treatment. The behavioral tests were not changed significantly due to this treatment.

Conclusion: The present study shows the beneficial effects of crocin treatment that may occur by decreasing CGRP on chronic pain induced by SCI. This project is continuing using higher dose of crocin for longer time.

Keywords: Crocin, Mechanical behavioral test, Locomotor recovery test, Thermal behavioral test, CGRP

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 16, No 1, Spring 2013, Pages: 63-73

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

مقاله اصیل

بررسی اثر کروسین و مکانیسم آن بر درد مزمن ناشی از له‌شدگی نخاع در رت

معصومه کرمی[1]، سیده زهرا بطحائی[2*]، تقی طریحی[3]، مهران حبیبی رضایی[4]، جلیل عرب‌خردمند[5]، سقراط فقیه‌زاده[6]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۲- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۳- استاد، گروه علوم تشریح، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴- دانشیار، گروه بیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۵- جراح اعصاب، مرکز تحقیقاتی شفا، بیمارستان خاتم الانبیا، تهران، ایران
۶- دانشیار، گروه آمار حیاتی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱٤۱۱۷۱۳۱۱٦، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی
Email: bathai_z@modares.ac.ir

دریافت مقاله: ۹۱/۱۰/۲۷ پذیرش مقاله: ۹۱/۱۲/۱۶

چکیده

هدف: به منظور کاهش درد ناشی از ضایعات نخاعی تحقیقات بسیاری از جمله استفاده از گیاهان دارویی و سایر مواد طبیعی به دلیل داشتن خواص التیام‌بخش انجام شده است. در این مطالعه به عنوان یک مطالعه مقدماتی، اثر کروسین بر درد مزمن ناشی از ضایعه نخاعی از طریق ایجاد له‌شدگی در مدل حیوانی رت بررسی شد.

مواد و روش‌ها: رت‌های ماده نژاد ویستار به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم شدند. در گروه‌های اول و دوم له‌شدگی در ناحیه مهره L1 ایجاد و سپس کروسین به طور داخل صفاقی (۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تزریق شد. در دو گروه G1 و G2 به فاصله ۲ ساعت و یک هفته بعد، نمونه‌های پلاسما جمع‌آوری شد. در گروه سوم له‌شدگی ایجاد شد ولی بدون تزریق کروسین و دو گروه کنترل نیز به ترتیب بدون له‌شدگی با و بدون تزریق کروسین در نظر گرفته شد. برای ارزیابی ضایعه و روند بهبودی به طور یک روز در میان آزمون مکانیکی با استفاده از ون فری هیر، آزمون حرارتی با استفاده از صفحه داغ و بررسی روند بهبود حرکتی با استفاده از آزمون باسو- بیتی- برسنان انجام شد. ارزیابی پپتید وابسته به ژن کلسیتونین نیز در پلاسما انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان پپتید وابسته به ژن کلسیتونین در پلاسمای رت‌های دچار آسیب نخاعی بدون درمان افزایش می‌یابد، اما در گروه درمان شده با کروسین بعد از یک هفته کاهش معنی‌داری در این پارامتر مشاهده شد. آزمون‌های رفتاری تغییرات معنی‌داری را در اثر این تیمار نشان نداد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اثر مفید کروسین در درمان درد مزمن ناشی از له‌شدگی را از طریق کاهش پپتید وابسته به ژن کلسیتونین نشان داد.

کلیدواژگان: کروسین، آزمون رفتاری، آزمون بهبود حرکتی، آزمون حرارتی، پپتید وابسته به ژن کلسیتونین

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، صفحات: ۶۳-۷۳

مقدمه

درد یک احساس ناخوشایند و مکانیسم پیشگیری برای جلوگیری از صدمه به بافت‌ها است. درد از نظر طول مدت به دو نوع حاد و مزمن تقسیم می‌شود [۱]. برای درمان درد حاد می‌توان از داروهای ضد التهاب غیر استرویدی (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs)

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

مثل آسپیرین، مسکن‌های افیونی و مخدرهای موضعی استفاده نمود [۲]. ولی درد مزمن دردی است که از نظر طول مدت و علت به وجود آمدن آن با درد حاد متفاوت است و مکانیسم‌های اساسی و مهمی در به وجود آمدن آن دخیل است. درد مزمن ممکن است یک صدمه در حال پیشرفت باشد که به داروهای ضدالتهاب و مواد مخدر یا پاسخ نمی‌دهد یا به طور ناچیزی جواب می‌دهد. برای درمان درد مزمن باید اطلاعات بیشتری در رابطه با علت پایداری آن و آزمون‌های مختلف موجود در راستای شناسایی آن داشت. همچنین می‌توان به دنبال یافتن نشانگرهای جدیدی برای تعیین میزان آن بود. مهم‌ترین علل درد مزمن عوامل روانشناختی، درد محیطی (مربوط به ضایعه عصب) و مرکزی است.

همان طور که بیان شد، برای پیدا کردن راهی برای کاهش درد مزمن، باید آگاهی کامل از مکانیسم‌های آن داشت [۳]. بنابراین برای مطالعه درد مزمن و درمان آن می‌توان از مدل‌های حیوانی استفاده نمود. مدل‌های حیوانی متعددی به منظور شبیه‌سازی درد انسانی ابداع شده که بیشترین آن‌ها در زمینه ایجاد بیماری و ضایعات جراحتی است که عواقب دردناکی دارد [٤، ٥]. درد ناشی از ضایعه عصبی عصب شناختی (Neuropathic) در بیماری‌هایی مثل مالتیپل اسکلروز (Multiple Sclerosis)، ضایعه عصبی دیابتی و سکته مغزی گزارش شده است و شبیه دردهای ناشی از ضایعات مکانیکی نظیر قطع عضو، صدمه مغزی و ضایعات نخاعی است [٦]. همان طور که بیان شد برخی از ضایعات انسانی می‌تواند در مدل‌های حیوانی ایجاد شود. یکی از انواع این مدل‌ها، القای فشردگی مزمن در گانگلیون ریشه پشتی است که سبب ایجاد آلودینیا (Allodynia) (حساسیت بیش از اندازه به تحریکات) شده و همراه با افزایش تحریک پذیری نورون‌ها در این ناحیه می‌شود [۷]. در این تحقیق از روش دیگری، یعنی ایجاد لهشدگی در نخاع استفاده شد که شباهت زیادی به درد مزمن در انسان دارد. آزمون‌های رفتاری متفاوتی نیز برای ارزیابی روند ایجاد ضایعه و روند بهبود درد مزمن در مدل‌های حیوانی ابداع شده‌است. در این آزمون‌ها رفتارهای حرکتی، پاسخ به حرارت، فشار، تحریکات مکانیکی و غیره سنجیده می‌شود [۸-۱۰].

درباره خواص ضد درد برخی گیاهان از قدیم اطلاعات زیادی در دست است ولی در طب جدید نیز از آن‌ها به عنوان درمان قطعی یا تکمیلی استفاده شده و در این رابطه مطالعات متنوعی انجام شده است [۱۱]. زعفران به عنوان یک چاشنی غذایی گران قیمت که دارای خواص مختلف پزشکی بوده از دیرباز در تمام دنیا شناخته شده است. بهره‌گیری از خواص پزشکی زعفران طی تاریخ، توسط ملیت‌های مختلف، همچنین در طب نوین و در کشورهای مختلف توسط بطحائی و موسوی در دو مقاله مروری گزارش شده است [۱۲، ۱۳]. از جمله خواص درمانی زعفران می‌توان از خواص محافظتی از نورون‌ها، ضد افسردگی، کمک کننده به حافظه کوتاه مدت، ضد سرطان، ضد دیابت، مهار کننده تجمع پلاکت‌ها و ضد آترواسکلروز (Atherosclerosis)، نام برد [۱۲]. از بین اجزای زعفران، کروسین (Crocin) دارای آثار دارویی (Pharmacologic Effects) گسترده‌ای است [۱۲]. کروسین یک کاروتنویید محلول در آب است که از کلاله زعفران (*Crocus sativus* L.) استخراج می‌شود. علاوه بر خواص نام برده در بالا برای زعفران، خواص ضد التهابی و ضد دردی نیز برای کروسین در کاهش هر دو درد حاد و مزمن گزارش شده است [١٤، ١٥]. با توجه به تحقیقات قبلی محققان حاضر در رابطه با خواص درمانی زعفران و اجزای آن [۱۲، ١٦، ۱۷]، مطالعه حاضر تلاشی در راستای بررسی خواص ضد درد کروسین در درد مزمن ناشی از ضایعه نخاعی با روش لهشدگی در مدل حیوانی رت و بررسی مکانیسم احتمالی آن است.

مواد و روش‌ها

کروسین

کروسین از کلالهٔ خشک زعفران با روشی که قبلاً توسط گروه تحقیقاتی حاضر گزارش شده بود [۱۸]، جداسازی و

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

خالص شد. در طرح حاضر، روند خالص سازی توسط طیف جذبی و خلوص کروسین توسط TLC (Thin Layer Chromatography) تأیید شد.

حیوان‌ها

۲۵ سر رت بالغ ماده از نژاد ویستار با وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم از انستیتو پاستور خریداری شد. حیوان‌ها در یک دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و در شرایط مطلوب و استاندارد حیوانخانه دانشگاه تربیت مدرس نگهداری شدند.

جراحی حیوان‌ها

تمام گروه‌ها قبل از انجام آزمون، تحت آزمون رفتاری باسو- بیتی- برسنان (Basso, Beattie and Bresnahan: BBB scoring) قرار گرفتند. بعد از بیهوش کردن حیوان‌ها (تزریق داخل شکمی کتامین (Ketamine) ۸۰-۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم و زایلوزین (Xylazine) ۵-۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) عمل لامنکتومی (Laminectomy) روی مهره L1 انجام شد. به منظور ایجاد لهشدگی، پس از تثبیت حیوان یک ضربه از فاصله تعریف شده ۲۵ میلی‌متری توسط میله فلزی ۱۰ گرمی با مقطع ۲ میلی‌متر، با شدت متوسط به ناحیه مورد نظر وارد شد [۸، ۱۹، ۲۰]. در حین جراحی تزریق سرم فیزیولوژیک ۲۰ میلی‌لیتر به صورت زیر جلدی برای جبران خون از دست رفته انجام شد. مراقبت‌های بعد از جراحی شامل تزریق سفازولین (Cefazoline) (جابر ابن حیان، تهران) به مدت سه روز و هر روز دو نوبت به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم برای جلوگیری از عفونت ادراری صورت گرفت [۲۱]. تخلیه مثانه حیوان نیز به صورت دستی، روزانه سه بار تا زمانی که حیوان قادر به ادرار کردن باشد، انجام شد.

گروه‌بندی و تیمار حیوان‌ها

حیوان‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند. درگروه‌های اول و دوم (G1 و G2) هر دو عمل القای ضایعه نخاعی و تزریق داخل صفاقی کروسین حل شده در نرمال سالین (Normal Saline) به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم انجام گرفت. در گروه اول ۲ ساعت و گروه دوم یک هفته بعد، نمونه خون حیوان جمع‌آوری شد و سپس حیوان‌ها کشته شدند. گروه سوم (G3) با جراحی و بدون تزریق کروسین، گروه چهارم به عنوان کنترل بدون تیمار (به عنوان شاهد یا B) و گروه پنجم، حیوان‌های سالم تحت تزریق کروسین (به عنوان کنترل یا C) در نظر گرفته شدند که بعد از یک هفته نمونه خونشان جمع‌آوری شد و سپس کشته شدند.

آزمون‌های رفتاری مرتبط با درد و حرکت

الف- آزمون‌های رفتاری مرتبط با درد

۱- آزمون رفتاری مکانیکی

حیوان‌ها به جز گروه اول، قبل از عمل جراحی به مدت یک هفته هر روز ۱۵-۳۰ دقیقه روی صفحه‌ای توری یا مشبک قرار داده شدند تا به شرایط آزمایش عادت کرده و علایم ترس حیوان از بین برود. پس از عمل جراحی نیز همه روزه حیوان‌ها روی این صفحات به همان مدت قرار گرفتند. سپس با استفاده از ون فری هیر (von Frey Hairs) که رشته‌هایی با وزن بین ۰/۰۲۱-۳۰۰ گرم بود، به کف پای عقبی حیوان نیرو وارد شد، به طوری که رشته قوس بردارد. این نیرو بین ٦-۸ ثانیه وارد و این کار بین ۵-۱۰ بار تکرار شد. نیروی رشته‌ای که حیوان به آن عکس‌العمل نشان داد و پایش را عقب کشید، یادداشت و به عنوان آستانه عقب‌کشی بیان شد. آستانه عقب‌کشی در حیوان سالم ٦۰ گرم بود [۲۲].

۲- آزمون رفتاری گرمایی

در این آزمون، حیوان‌ها (به جز گروه اول) از چند روز قبل از جراحی برای عادت دادن به محیط آزمایش به صورت روزانه روی دستگاه صفحه داغ (شرکت دید سبز، مدل DS.8310) قرار داده شدند. در این آزمون حیوان‌ها روی صفحه داغ با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و فاصله زمانی تا لیسیدن اندام

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

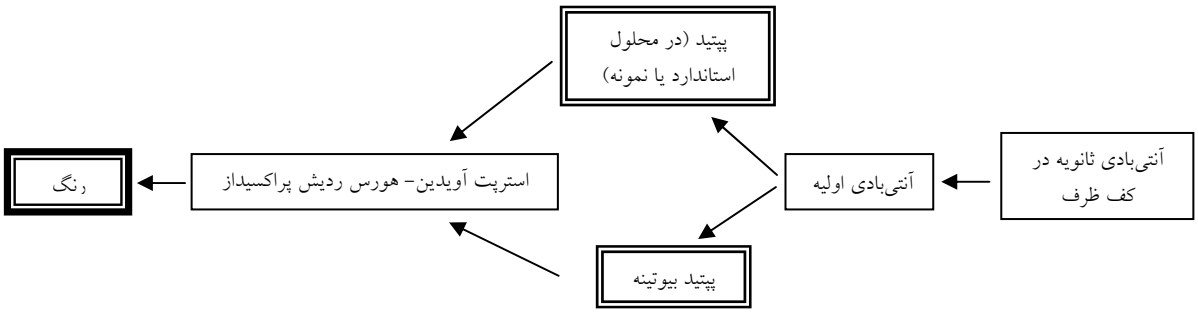
عقبی حداکثر تا ۱۰۰ ثانیه، اندازه‌گیری شد. زمان تأخیر در لیسیدن در حیوان‌های سالم بین ۱۵-۳۰ ثانیه بود [۲۳].

۳- آزمون رفتاری مرتبط با حرکت

آزمون BBB [۸] برای ارزیابی ضایعه نخاعی و تشخیص میزان بهبود عملکردی انجام شد. در این آزمون ابتدا مرحله عادت کردن حیوان به محیط آزمایش از چند روز قبل از عمل جراحی انجام شد. از یک روز پس از ایجاد ضایعه نخاعی، همه روزه به مدت یک هفته و هر بار به مدت ٤ دقیقه حیوان داخل محفظه‌ای به قطر ۱۱۰ و ا رتفاع ۵۰ سانتی‌متر قرار داده شد و از حرکات حیوان توسط دوربین (مدل سونی) که در چهار گوشه محفظه قرار داشت، فیلمبرداری شد [۱۹]. فیلم تهیه شده از حرکات حیوان توسط کامپیوتر بررسی و توانایی حرکت حیوان با مقیاس آزمون BBB اندازه‌گیری شد. این مقیاس بین ۰-۲۱ درجه‌بندی (Score) شده است؛ این درجات از عدم حرکت پای عقبی تا حرکت طبیعی است. عوامل مهم برای بررسی شامل وضعیت پنجه پا، حرکت مفصل و استقامت تنه در نظر گرفته شد. درجه‌های ۰-۷ مربوط به ارزیابی وضعیت مفصل ران، زانو و مچ پا، درجه‌های ۸-۱۳ مربوط به ارزیابی وضعیت پنجه پا و هماهنگی حرکت آن و درجه‌های ١٤-۲۱ مربوط به ارزیابی سرعت پایداری تنه، موقعیت دم و وضعیت پنجه پا بود. این آزمون در گروه اول انجام نشد. این درجه در حیوان‌های سالم ۲۱ بود.

اندازه‌گیری پپتید وابسته به ژن کلسیتونین

برای اندازه‌گیری پپتید وابسته به ژن کلسیتونین (Calcitonin-Gene Related Peptide: CGRP) در نمونه‌های پلاسما از کیت آنزیمی سنجش ایمنی رقابتی (شرکت Phoenix Pharmaceutical، INC، EK-015-09) استفاده شد. اندازه‌گیری براساس روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA) بود که به طور خلاصه در شمای ذیل نشان داده شده است.



در این روش آنتی‌بادی ثانویه متصل شده به کف پلیت به ناحیه Fc آنتی‌بادی اولیه متصل و ناحیه Fab آنتی‌بادی اولیه آزاد است. این ناحیه می‌تواند به وسیله هر دو پپتید بیوتینه یا CGRP اشغال شود. بنابراین، این دو پپتید با هم رقابت کرده و هر چه غلظت CGRP بیشتر باشد پپتید بیوتینه کمتر به زوج استرپت‌آویدین- هورس‌ردیش‌پراکسیداز متصل شده و رنگ کمتری ایجاد می‌شود. با تهیه محلول‌های استاندارد و رسم منحنی استاندارد می‌توان غلظت CGRP را در نمونه‌ها اندازه‌گیری نمود.

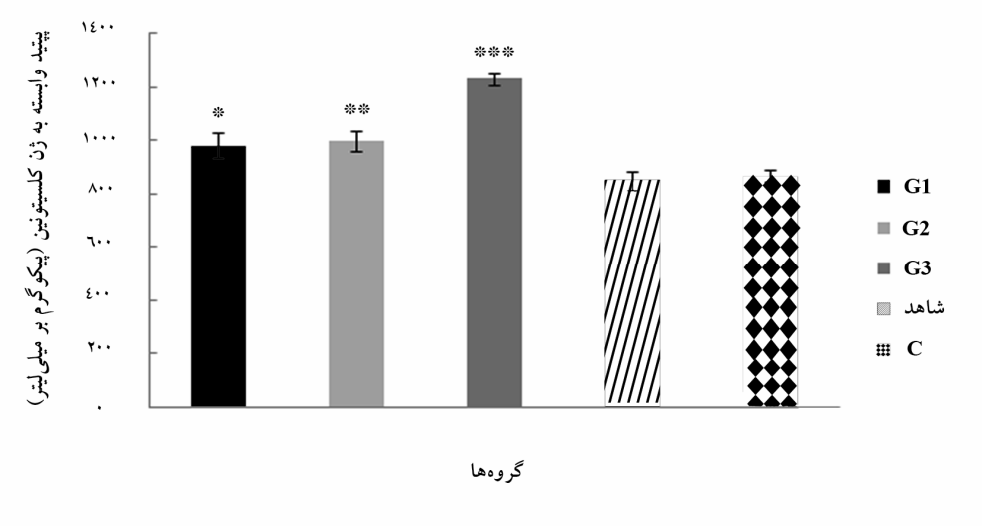
تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ١٦، سنجش‌های آماری پارامتری با استفاده از آزمون‌های آنالیز واریانس یک طرفه (One- way Analysis of Variance: ANOVA)، آزمون توکی (Tukey's) (Test as post hoc) انجام شد.

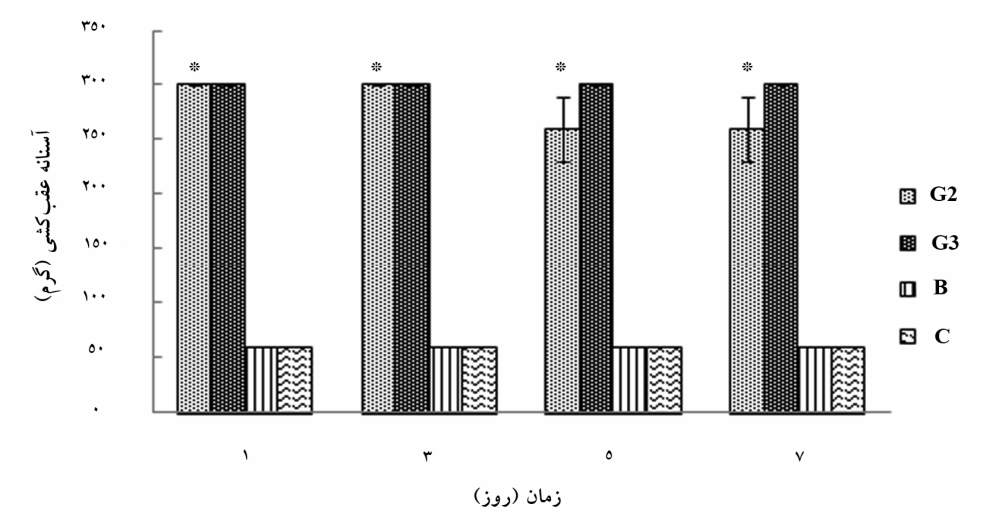
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

نتایج

شکل ۱ نتایج اندازه‌گیری CGRP را نشان می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در میزان این پپتید در پلاسمای رت‌های دچار له‌شدگی (G3) نسبت به گروه‌های شاهد (B) و کنترل (C) وجود دارد. همچنین گروه دچار له‌شدگی و درمان شده با کروسین (G2) اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) را با گروه له‌شدگی و بدون تزریق کروسین (G3) نشان داد.



شکل ۱ میزان CGRP در پلاسمای رت‌های گروه‌های مختلف تحت آزمایش؛ G1: گروه ضایعه دیده بر اثر له‌شدگی نخاع در مهره L1 که کروسین دریافت کرده و بعد از ۲ ساعت کشته شدند. G2: مشابه گروه قبل که پس از یک هفته کشته شدند. G3: مشابه گروه قبل بدون تجویز کروسین که پس از یک هفته کشته شدند. C: گروه کنترل بدون هیچ‌گونه ضایعه‌ای که کروسین دریافت کردند. B: گروه شاهد بدون هیچ‌گونه ضایعه و درمان؛ ستاره نشان دهنده معنی‌دار بودن تغییرات بین گروه‌ها به شرح ذیل است: *اختلاف معنی‌دار گروه G1 با گروه‌های B، C، G3، **اختلاف معنی‌دار G2 با گروه‌های B، C، G3، *** اختلاف معنی‌دار گروه G3 با سایر گروه‌ها



شکل ۲ آستانه تحریک پس کشیدن پای عقبی رت‌های گروه‌های مختلف؛ این پارامتر در گروه ۱ که بلافاصله کشته شد، اندازه‌گیری نشد. گروه‌ها همانند شکل ۱ است.
* اختلاف معنی‌دار بین گروه G2 با گروه‌های B، C

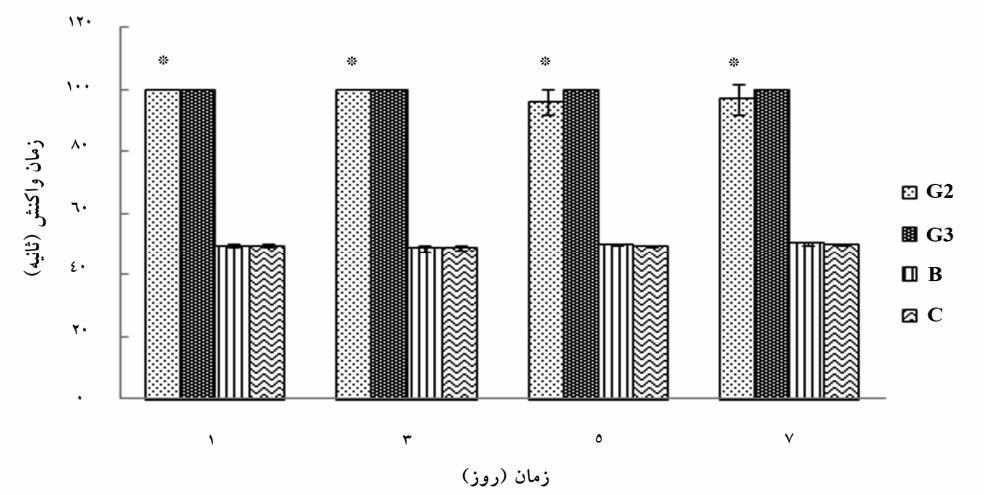
[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

نتایج آزمون رفتاری مکانیکی

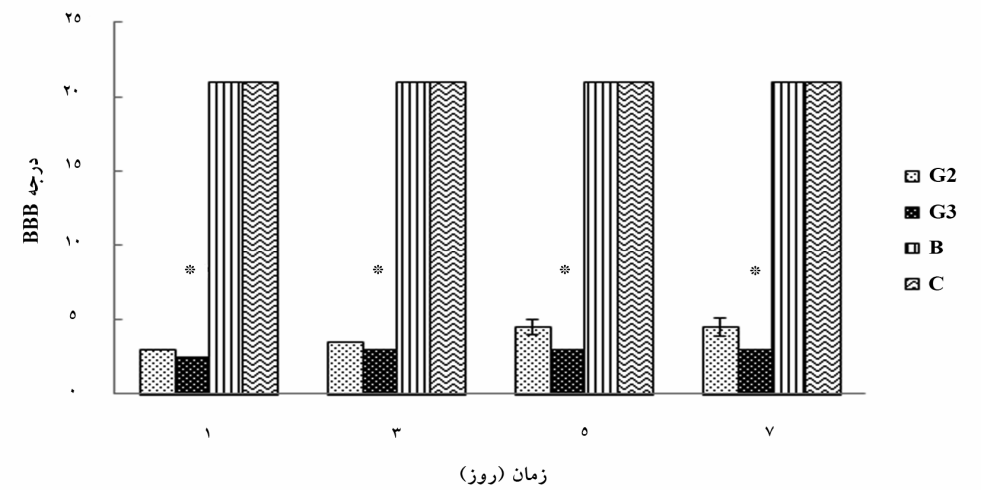
نتایج آزمون رفتاری مکانیکی که در آن آستانه تحریک به صورت روزانه اندازه‌گیری شد، در شکل ۲ نشان داده شده است. این نتایج اختلاف معنی‌داری را در میزان آستانه تحریک گروه رت‌های دچار له‌شدگی و تزریق کروسین (G2) با گروه بدون تزریق کروسین (G3) نشان نداد ولی این پارامتر در گروه رت‌های دچار له‌شدگی با گروه‌های شاهد و کنترل اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

نتایج آزمون رفتاری حرارتی

در تمام گروه‌ها (به غیر از گروه اول) آزمون حرارتی به طور روزانه انجام شد. این نتایج در شکل ۳ نشان می‌دهد که تغییرات معنی‌داری در زمان واکنش در گروه‌های دچار له‌شدگی (G2 و G3) نسبت به گروه‌های کنترل (B و C) وجود داشت (P<۰/۰۵). این آزمون اثر معنی‌داری در این پارامتر روی گروه تحت درمان با کروسین نشان نداد.



شکل ۳ زمان پاسخ به محرک در رت‌های گروه‌های مختلف؛ این پارامتر در گروه ۱ که بلافاصله کشته شد، اندازه‌گیری نشد. گروه‌ها همانند شکل ۱ است. * اختلاف معنی‌دار بین گروه G2 با گروه‌های B، C



شکل ٤ درجه BBB در رت‌های گروه‌های مختلف؛ این پارامتر در گروه ۱ که بلافاصله کشته شد، اندازه‌گیری نشد. گروه‌ها همانند شکل ۱ است. * اختلاف معنی‌دار بین گروه G2 با گروه‌های B، C

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

آزمون رفتاری حرکتی

برای بررسی روند بهبود حرکتی آزمون رفتاری BBB به‌طور روزانه انجام شد. شکل ٤ میانگین درجه به دست آمده در گروه‌های مختلف را نشان می‌دهد. این شکل نشان می‌دهد که درجه BBB در گروه‌های دچار له‌شدگی (G2 و G3) اختلاف معنی‌داری با گروه‌های کنترل و شاهد داشت (P<۰/۰۵).

بحث

درد ناشی از ضایعه عصبی دردی است مزمن و پیچیده که درمان پیشگیری کننده یا یک استراتژی مؤثر برای رفع آن وجود ندارد و استفاده از ضد دردهای مؤثر برای درد حاد، مثل داروهای ضد التهاب غیر استروییدی اغلب بر آن اثری ندارد. از آن‌جایی که هدف اولیه در روش‌های درمانی برای درد مزمن، استفاده از یک برنامه منظم و کامل در راستای کاهش درد این بیماران است، استفاده از داروهایی مثل داروهای ضد افسردگی و ضد تشنج در شرایط خاص، توصیه شده‌است. اطلاعات جدید به دست آمده در رابطه با مکانیسم‌های ایجاد درد مزمن می‌تواند کمک زیادی به طراحی درمان مؤثر برای این درد نماید.

به منظور درمان دردهای مزمن استفاده از گیاهان یا فرآورده‌های آن‌ها به عنوان درمان تکمیلی یا قطعی پیشنهاد شده است [٢٤-٢٦]. از آن‌جایی که درد مزمن به عوامل مختلفی از جمله التهاب، بستگی دارد؛ بنابراین یافتن گیاهانی که دارای خواص مختلف باشند در این میان می‌تواند بسیار مفید باشد. همان طور که در مقدمه ذکر شد، زعفران به عنوان یک داروی شناخته شده برای درمان بسیاری از بیماری‌ها در طول تاریخ و در ملیت‌های مختلف استفاده شده است [١٢، ١٣]. کروسین که یک کاروتنویید محلول در آب است به عنوان جزء اصلی زعفران می‌تواند مسئول بسیاری از خواص مفید زعفران از جمله خاصیت بهبود حافظه [٢٦، ٢٧]، ضد التهاب [١٤] و فعالیت‌های ضد اکسیدانی [٢٨] باشد. به علاوه اثر ضد مرگ سلولی برنامه ریزی شده (Apoptosis) کروسین علیه سلول‌های PC-12 در رت تیمار شده با دائنوروبیسین (Daunorubiocin) و همچنین اثر مهاری روی مرگ سلولی ناشی از تومور نکروز عامل آلفا (Tumor Necrosis Factor-alpha: TNF-α) نشان داده شده است [٢٩]. همچنین کروسین سلول‌ها را در برابر ایسکمی مغزی گذرا [٣٠] و تنش اکسیداتیو ناشی از مرگ سلول‌های عصبی محافظت می‌کند [٣١، ٣٢].

حسین‌زاده و همکاران اثر مفید زعفران و عصاره گلبرگ آن را در موشی که گیرنده‌های درد در آن با استیک اسید تحریک شده بود را نشان دادند [١٤]. همچنین اثر ضد درد کروسین در درد القا شده با فرمالین توسط تمدن‌فرد و همکارانش گزارش شده بود [١٥]. بنابراین در تحقیق حاضر اثر کروسین در مدل حیوانی درد مزمن بررسی شد. تمدن‌فرد و همکارانش از دوزهای مختلف کروسین بین ٥٠ تا ٤٠٠ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم استفاده کرده و بهترین دوز را ٢٠٠ گزارش کرده بودند. در این تحقیق به عنوان مطالعه اولیه، از پایین‌ترین دوز مؤثر یعنی ٥٠ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم استفاده شد.

برای ایجاد ضایعه نخاعی در میان روش‌های مختلف القای درد ناشی از ضایعه عصبی مزمن در مدل حیوانی [٥] از روش له‌شدگی به دلیل سادگی، مطمئن بودن و تکرارپذیری استفاده شد. بنابراین برای القای درد محیطی ناشی از ضایعه عصبی، نخاع در ناحیه مهره L1 طی جراحی مورد له‌شدگی قرار گرفت. در این تحقیق میزان CGRP در پلاسما تمام رت‌ها اندازه‌گیری و آزمون‌های رفتاری برای ارزیابی روند بهبود بررسی شد.

با توجه به نتایج به دست آمده، حیوان دچار ضایعه نخاعی بر اثر تیمار با کروسین (در گروه دوم) تفاوت معنی‌داری در درجه BBB نسبت به گروه سوم که بدون تیمار با کروسین است، نداشت. این نتیجه در مورد آزمون‌های مکانیکی و حرارتی نیز مشاهده شد. به نظر می‌رسد برای بررسی آزمون‌های رفتاری دوره نگهداری حیوان باید طولانی‌تر باشد و یک هفته برای بررسی اثر کروسین کافی نبوده است.

CGRP یک پپتید ٣٧ آمینو اسیدی حاصل از پیرایش متناوب نسخه RNA ژن کلسیتونین است [٣٣]. این پپتید به

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

طور وسیعی در سیستم عصبی رت [۳٤] و انسان [۳۵] وجود دارد. این پپتید به عنوان یک عامل فعال در اتساع عروق، فرآیند التهاب و درد مزمن شناخته شده است. تحقیقات نشان داده که این پپتید در انسان و رت اثر قوی روی رگ‌های خونی داشته و تزریق زیر جلدی آن سبب اتساع عروق ریز و افزایش جریان خون می‌شود [۳٦]. همچنین CGRP سبب مهار ماکروفاژها، سلول‌های دندریتی و عملکرد لنفوسیت‌ها شده و سبب مهار آزاد شدن TNF-α در ماکروفاژهای احشایی موش می‌شود [۳۷] شواهدی که نشان می‌دهد این نوروپپتید نقش مهمی را در موتورهای حسی و سامانه‌های تابعه ایفا می‌کند در حال افزایش است. نتایج بررسی حاضر نشان داد که این نوروپپتید بعد از القای ضایعه نخاعی در پلاسما افزایش و بعد از تجویز کروسین، کاهش یافت. بنابراین آثار مفید کروسین نه تنها از طریق خاصیت ضد اکسیدانی و ضد التهابی آن بلکه از طریق اثر کاهندگی CGRP نیز هست. با توجه به مطالب بالا چون CGRP در هر دو پدیدهٔ التهاب و درد دخالت دارد، بنابراین اثر کروسین در تنظیم آن، پدیده مهمی در کاهش درد مزمن است.

با توجه به نتایج به دست آمده کروسین می‌تواند سبب کاهش درد مزمن شود و احتمالاً این کار را از طریق کاهش CGRP انجام می‌دهد. از آن‌جایی که زمان لازم برای بررسی آزمون‌های رفتاری محدود بوده، به نظر می‌رسد برای بررسی اثر کروسین در بهبود نورون‌های حسی و حرکتی باید این تحقیق در محدوده زمانی وسیع‌تری انجام شود. تغییر غلظت کروسین نیز شاید اثر بهتری داشته باشد؛ این مطالعه ادامه دارد.

تشکر و قدردانی

از مرکز تحقیقاتی شفا و دانشگاه تربیت مدرس به دلیل تأمین هزینه این پژوهش و تهیه امکانات قدردانی می‌شود. همچنین از آقای دکتر عبدانی‌پور به دلیل همکاری در انجام مراحل این تحقیق تشکر می‌شود.

منابع

[1]Marchand S. The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. Rheum Dis Clin North Am 2008; 34(2): 285-309.

[2] Massey T, Derry S, Moore RA, McQuay HJ. Topical NSAIDs for acute pain in adults. Cochrane Database Syst Rev 2010; (6): CD007402.

[3]Gonzalez-Nunez V, Rodríguez RE. The zebrafish: a model to study the endogenous mechanisms of pain. ILAR J 2009; 50(4): 373-86.

[4] Vallin JA, Kingery WS. Adjacent neuropathic hyperalgesia in rats: a model for sympathetic independent pain. Neurosci Lett 1991; 133(2): 241-4.

[5] Wang LX, Wang ZJ. Animal and cellular models of chronic pain. Adv Drug Deliv Rev 2003; 55(8): 949-65.

[6] Sharp K, Boroujerdi A, Steward O, Luo ZD. A rat chronic pain model of spinal cord contusion injury. Methods Mol Biol 2012; 851: 195-203.

[7]Niederberger E, Kühlein H, Geisslinger G. Update on the pathobiology of neuropathic pain. Expert Rev Proteomics 2008; 5(6): 799-818.

[8] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection. Exp Neurol 1996; 139(2): 244-56.

[9] Onifer SM, Rabchevsky AG, Scheff SW. Rat models of traumatic spinal cord injury to assess motor recovery. ILAR J 2007; 48(4): 385-95.

[10]Pajoohesh-Ganji A, Byrnes KR, Fatemi G,

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

Faden AI. A combined scoring method to assess behavioral recovery after mouse spinal cord injury. Neurosci Res 2010; 67(2): 117-25.

[11]Bruce JC, Oatway MA, Weaver LC. Chronic pain after clip-compression injury of the rat spinal cord. Exp Neurol 2002; 178(1): 33-48.

[12]Bathaie SZ, Mousavi SZ. New applications and mechanisms of action of saffron and its important ingredients. Crit Rev Food Sci Nutr 2010; 50(8): 761-86.

[13]Mousavi SZ, Bathaie SZ. Historical uses of saffron: Identifying potential new avenues for modern research. AJP 2011; 1(2): 57-66.

[14]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]Tamaddonfard E, Hamzeh-Gooshchi N. Effect of crocin on the morphine-induced anti-nociception in the formalin test in rats. Phytother Res 2010; 24(3): 410-3.

[16]Bathaie SZ, Bolhasani A, Hoshyar R, Ranjbar B, Sabouni F, Moosavi-Movahedi AA. Interaction of saffron carotenoids as anticancer compounds with ctDNA, Oligo (dG.dC)15, and Oligo (dA.dT)15. DNA Cell Biol 2007; 26(8): 533-40.

[17]Hoshyar R, Bathaie SZ, Ashrafi M. Interaction of safranal and picrocrocin with ctDNA and their preferential mechanisms of binding to GC- and AT-rich oligonucleotides. DNA Cell Biol 2008; 27(12): 665-73.

[18]Bolhasani A, Bathaie SZ, Yavari I, Moosavi-Movahedi AA, Ghaffari M. Separation and purification of some components of iranian saffron. Asian J Chem 2005; 17(2): 725-9.

[19]Kaka G. A study on in vitro transdifferentiation of bone marrow stromal cells into oligodendrocyte like cells and autologous transplanting them into contusion spinal cord injury in rat. Ph.D. Thesis, Tehran: Tarbiat Modares University, Iran, 2009.

[20]Ohta M, Suzuki Y, Noda T, Ejiri Y, Dezawa M, Kataoka K, Chou H, Ishikawa N, Matsumoto N, Iwashita Y, Mizuta E, Kuno S, Ide C. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. Exp Neurol 2004; 187(2): 266-78.

[21]Khalatbary AR, Tiraihi T. Localization of bone marrow stromal cells in injured spinal cord treated by intravenous route depends on the hemorrhagic lesions in traumatized spinal tissues. Neurol Res 2007; 29(1): 21-6.

[22]Wu WP, Hao JX, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Koek W, Colpaert FC. The very-high-efficacy 5-HT1A receptor agonist, F 13640, preempts the development of allodynia-like behaviors in rats with spinal cord injury. Eur J Pharmacol 2003; 478(2-3): 131-7.

[23]Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment. Exp Neurol 1985; 88(1): 123-34.

[24]Abebe W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. J Clin Pharm Ther 2002; 27(6): 391-401.

[25] 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 2005;

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]

28(11): 2106-10.

[26]Pitsikas N, Zisopoulou S, Tarantilis PA, Kanakis CD, Polissiou MG, Sakellaridis N. Effects of the active constituents of Crocus sativus L., crocins on recognition and spatial rats' memory. Behav Brain Res 2007; 183(2): 141-6.

[27]Abe K, Saito H. Effects of saffron extract and its constituent crocin on learning behaviour and long-term potentiation. Phytother Res 2000; 14(3): 149-52.

[28]Bathaie SZ, Nobakht BB, Mirmiranpour H, Jafarnejad A, Moosavi-Nejad SZ. Effect of chemical chaperones on glucose-induced lysozyme modifications. Protein J 2011; 30(7): 480-9.

[29]Soeda S, Ochiai T, Paopong L, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin suppresses tumor necrosis factor-alpha-induced cell death of neuronally differentiated PC-12 cells. Life Sci 2001; 69(24): 2887-98.

[30]Xi L, Qian Z, Du P, Fu J. Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. Phytomedicine 2007; 14(9): 633-6.

[31]Ochiai T, Soeda S, Ohno S, Tanaka H, Shoyama Y, Shimeno H. Crocin prevents the death of PC-12 cells through sphingo-myelinase-ceramide signaling by increasing glutathione synthesis. Neurochem Int 2004; 44(5): 321-30.

[32]Akhondzadeh S, Tahmacebi-Pour N, Noorbala AA, Amini H, Fallah-Pour H, Jamshidi AH, Khani M. Crocus sativus L. in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized and placebo-controlled trial. Phytother Res 2005; 19(2): 148-51.

[33]van Rossum D, Hanisch UK, Quirion R. Neuroanatomical localization, pharmacological characterization and functions of CGRP, related peptides and their receptors. Neurosci Biobehav Rev 1997; 21(5): 649-78.

[34]Kresse A, Jacobowitz DM, Skofitsch G. Detailed mapping of CGRP mRNA expression in the rat central nervous system: comparison with previous immuno-cytochemical findings. Brain Res Bull 1995; 36(3): 261-74.

[35]Saldanha G, Hongo J, Plant G, Acheson J, Levy I, Anand P. Decreased CGRP, but preserved Trk A immunoreactivity in nerve fibres in inflamed human superficial temporal arteries. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999; 66(3): 390-2.

[36]Noureini SK, Wink M. Antiproliferative effects of crocin in HepG2 cells by telomerase inhibition and hTERT down-regulation. Asian Pac J Cancer Prev 2012; 13(5): 2305-9.

[37]Amin B, Hosseinzadeh H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, Crocus sativus L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. Fitoterapia 2012; 83(5): 888-95.

[Downloaded from mjms.modares.ac.ir on 2022-08-15]