

Investigation of The Effects of Intracerebroventricular Crocin Injection on Extinction and Reinstatement Periods Following Morphine Conditioning in Male Rats: A Behavioural, Biochemical, and Histological Study

Mahdiye Faraji¹
Ali Siahposht- Khachki²

¹ Medical Student, Faculty of Medical Sciences, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Associated Professor, Immunogenetics Research Center, Department of Physiology, Mazandarn University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received September 30, 2024; Accepted July 13, 2025)

Abstract

Background and purpose: The reward system of the brain plays a critical role in regulating behavior in both humans and animals. Crocin, the active component of saffron, has been shown to reduce the symptoms of morphine withdrawal. Additionally, administration of saffron extract has demonstrated a dose-dependent improvement in morphine-induced side effects. Given crocin's influence on the brain's reward circuitry, this study, for the first time, investigates the effects of intracerebroventricular injection of crocin on extinction and reinstatement behaviors in rats conditioned with morphine.

Materials and methods: In this animal study, a total of six control and experimental groups were used. The samples were categorized into three groups: a solvent group, a repeated crocin injection group, and a single crocin injection group. Crocin was administered via intracerebroventricular injection at the following coordinates: AP: -0.48 mm; Lat: ± 1.2 mm; Depth: 4.2 mm. Behavioral observations were recorded during the extinction and reinstatement phases. At the end of the experiment, the rats were euthanized, and their brains were collected for biochemical and histological examinations.

Results: Daily intraventricular administration of crocin during the extinction period at doses of 10, 20, and 40 μg , particularly the 40- μg dose, reduced the extinction period in a dose-dependent manner, significantly shortening the number of extinction days ($P < 0.001$). In addition, a single effective dose of 40 μg of crocin administered intraventricularly prior to the reinstatement phase resulted in a significant change in conditioned scores compared to the post-test ($P < 0.01$). Biochemical findings showed that crocin caused a significant reduction in c-Fo's expression in the nucleus accumbens ($P < 0.001$). Furthermore, histological analysis revealed that neuronal damage in the CA1 region of the hippocampus was reduced in the crocin-treated groups, particularly at the 40- μg dose, compared to the solvent-treated group.

Conclusion: It has been shown that crocin may be effective in modulating the brain's reward system and the neural circuitry involved in addiction.

Keywords: crocin, morphine, conditioning, hippocampus, rat

J Mazandaran Univ Med Sci 2025; 35 (247): 13-26 (Persian).

Corresponding Author: Ali Siahposht- Khachki - Department of Physiology, Mazandarn University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: a.siahposht@mazums.ac.ir)

بررسی اثر تزریق داخل بطن مغزی کروسین بر روی دوره خاموشی و بازگشت به مصرف مجدد به دنبال شرطی سازی با مورفین در موش صحرایی نر: یک مطالعه رفتاری، بیوشیمیایی و هیستولوژیکی

مهديه فرجی^۱

علی سیاه پشت خاچکی^۲

چکیده

سابقه و هدف: سیستم پاداش مغز نقش مهمی را در تعیین رفتار در انسان و حیوان دارد. کروسین ماده موثره زعفران بوده و علائم ترک مورفین را کاهش می دهد و استفاده از عصاره زعفران توانسته عوارض ناخواسته ناشی از مورفین را به صورت وابسته به دوز بهبود بخشد. این مطالعه با توجه به اثرات کروسین بر مغز، برای اولین بار با هدف بررسی شواهد رفتاری، بیوشیمیایی و هیستولوژیکی به دنبال تزریق داخل بطن مغزی کروسین بر دوره خاموشی (extinction) و بازگشت به مصرف مجدد (reinstatement) در موش های شرطی شده با مورفین، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه حیوانی جمعا از ۶ گروه کنترل و آزمون استفاده شد و گروه بندی نمونه ها، سه دسته گروه حلال، گروه تزریقات مکرر کروسین و گروه تک تزریق کروسین بوده است. بعد از جراحی استروئیکسی و گذاشتن کانول در بطن مغزی (AP: ۰/۴۸، Lat ± ۱/۲، Deep: ۴/۲) نسبت به برگما، مشاهدات رفتاری رفتاری در دوره خاموشی و بازگشت ثبت شد و مغز موش ها خارج گردید و برای بررسی بیوشیمیایی و هیستولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت.

یافته ها: تزریق روزانه داخل بطنی کروسین در دوره خاموشی در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم و مخصوصاً دوز ۴۰ میکروگرم سبب کاهش دوره خاموشی گردید به طوری که به صورت وابسته به دوز روزهای خاموشی کوتاه گردیده است ($P < ۰/۰۰۱$)، ولی با تزریق دوز ۱۰ میکروگرم دوره خاموشی یک روز کوتاه شده است ($P < ۰/۰۰۱$)، در دوز ۲۰ دو روز و ۴۰ میکروگرم سه روز از دوره خاموشی کم شد ($P < ۰/۰۰۱$). کروسین سبب کاهش معنی داری در میزان c-Fos در هسته اکومبنس می گردد ($P < ۰/۰۰۱$). هم چنین میزان تخریب نورون ها در ناحیه هیپوکمپ (CA1) در گروه هایی که کروسین دریافت کردند مخصوصاً دوز ۴۰ میکروگرم نسبت به گروهی که حلال دریافت کرده کاهش پیدا کرده است. **استنتاج:** نشان داده شده که کروسین می تواند احتمالاً در پدیده پاداشی و محور اعتیاد موثر باشد.

واژه های کلیدی: کروسین، مورفین، شرطی سازی، هیپوکمپ، موش صحرایی

Email: a.siahposht@mazums.ac.ir

مؤلف مسئول: **علب سبته پشت خاچکی** - ساری: دانشکده پزشکی، فیزیولوژی، پزشکی، علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۱. دانشجوی پزشکی، فیزیولوژی، پزشکی، علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. دانشیار، مرکز تحقیقات ایمنوژنتیک، گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده پزشکی، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۷/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۳/۷/۲۲ تاریخ تصویب: ۱۴۰۴/۴/۲۲

مقدمه

خلق و خوی، حالت‌های عاطفی آگاهانه‌ای است که در طول زمان تغییر پیدا می‌کند. هم‌چنین اهمیت تکاملی طولانی دارند و به عنوان یک مکانیسم عاطفی تطبیقی مهم عمل می‌کنند (۱، ۲). مطالعات نشان داده است که خلق می‌تواند روی دریافت غذا و دارو، فعالیت جنسی و فرایند‌های روحی و روانی هم موثر باشد. سیستم پاداش مغز نقش مهمی را در تعیین رفتار در انسان و حیوان بازی می‌کند. حتی تعدادی از بیماری‌های روانی و عصبی مثل آلزایمر، پارکینسون و تشنج با اختلال در تنظیم سیستم پاداش مغز در ارتباط می‌باشند (۳-۵). دو هسته هسته‌ای اکومبنس (NAc) و ناحیه تکمتموم شکمی مغز جلویی (VTA) در مدار پاداش مغز نقش دارند. از نظر ساختاری هسته اکومبنس ساختار پیچیده‌ای از مغز جلویی است که بخشی از استریاتوم شکمی را تشکیل می‌دهد و از استریاتوم پشتی (هسته دمدار و پوتامن) بر مبنای اتصالات و عملکردش قابل تشخیص است (۶).

عوامل محیطی و سوء مصرف دارو‌ها اثر به‌سزایی روی وضعیت سیستم پاداشی مغز دارد و سوء مصرف دارو در انسان سبب افزایش دوپامین خارج سلولی در ناحیه تکمتموم شکمی می‌شود. شواهد متعدد اهمیت سیستم دوپامینرژیک مزولمیک را نشان می‌دهد که از VTA شروع شده و به هسته اکومبنس ختم می‌شوند و در سیستم پاداش ناشی از مورفین نقش دارند. در واقع اپیوئیدها و گیرنده هایش در سیستم پاداشی مغز از طریق تعدیل سیستم دوپامینرژیک نقش ایفاء می‌کنند (۵، ۷).

اپیوئیدها داروهای قدرتمندی هستند که بر عملکرد پاداش مواد افیونی درون‌زا غلبه می‌کنند. در مدل‌های حیوانی، دسترسی طولانی مدت مکرر به مواد مخدر یا مواد افیونی منجر به حالت‌های هیجان‌مانند منفی می‌شود که با افزایش آستانه‌های پاداش، آستانه‌های درد پایین‌تر، رفتارهای اضطراب‌مانند و پاسخ‌های ناخوشایند همراه است (۸). اعتیاد به مواد مخدر نشان دهنده یک بی‌نظمی چشمگیر در مدارهای انگیزشی است که در سه

مرحله ایجاد می‌شود. اثرات سودآور سوء مصرف، ایجاد برجستگی انگیزشی، و ایجاد عادات به دنبال مواد مخدر در مرحله پرخوری / مسمومیت به دلیل تغییرات دوپامین و پپتیدهای مواد افیونی در گانگلیون‌های پایه است (۹). ولع مصرف مواد مخدر یک مشکل مهم بالینی در معتادان به مواد مخدر است که باعث می‌شود حتی مدت‌ها بعد از سم زدایی، رفتارهای تعقیب مواد مخدر را از خود نشان دهند و تمایل برای بازگشت به مصرف مورفین داشته باشند (۱۰). تداوم سوء مصرف مواد مخدر به دلیل بیش فعالیت سیستم دوپامینرژیک مسیر مزوکورتیکولیمیک است که نقش مهمی در اثرات تقویت کننده مثبت (positive reinforcing) مواد مخدر دارد (۱۱). داروهای آنتاگونیست دوپامینی از قبیل هالوپریدول، ریسپریدون و کلوزاپین در مهار اثرات شرطی سازی با مورفین موثر می‌باشند (۱۲). به دنبال مصرف مورفین نورون‌های دوپامینرژیک در VTA فعال گردیده و با مهار نورون‌های گابا نورژیک در اکومبنس باعث کاهش اثر مهاری گابا می‌گردند (۱۰).

زعفران (*Crocus sativus*) یک گیاه پیازی و چند ساله از خانواده زنبق (Iridaceae) است (۱۳). این گیاه به عنوان یک گیاه دارویی اثرات درمانی زیادی دارد. مطالعات نشان دادند که زعفران حداقل از چهار ماده فعال تشکیل شده است که شامل کروسین، کروسستین، پیکروکروسین و سافرانال است (۱۴). عصاره آبی و اتانولی کلاله زعفران و ماده تشکیل دهنده آن، کروسین، شدت علائم ترک مورفین را کاهش می‌دهد و بنابراین زعفران و ماده موثره آن سافرانال در کاهش سندرم withdrawal از طریق تداخل با سیستم اپیوئیدی نقش مهمی ایفاء می‌کند (۱۵).

داروهای گیاهی از دیرباز برای تسکین علائم سندرم ترک مصرف می‌شده است (۱۶). مصرف زعفران و متادون علائم سندرم ترک را کاهش می‌دهد. در مطالعه‌ای مشخص شده که زعفران علائم سندرم ترک را در بیماران تحت درمان نگهدارنده اعتیاد به مواد افیونی

کاهش می دهد (۱۷). زعفران در صورت مصرف خوراکی، ایمن و به خوبی قابل تحمل است، اما با مصرف داخل وریدی ممکن است خطراتی داشته باشد (۱۸).

عصاره آبی زعفران ممکن است بیش فعالی (hyperactivity) ناشی از مورفین و هم چنین اکتساب (acquisition) و بیان (expression) حساسیت رفتاری ناشی از مورفین را در موش های ماده مهار کند (۱۹). مطالعه ای نشان داده است که عصاره زعفران در حین القای وابستگی به مورفین، شدت علائم ترک را کاهش می دهد، در حالی که تأثیری بر رفتارهای اضطرابی و افسردگی نداشت. همچنین عصاره زعفران ممکن است از طریق افزایش سطح سروتونین، اثر محافظتی در برابر حساسیت های رفتاری ناشی از مورفین در موش ها داشته باشد (۲۰).

کروسین به عنوان یک ترکیب محلول در آب و سافرانال به عنوان یک ترکیب محلول در چربی عمل می کند. بر این اساس، آن ها با دو مکانیسم متفاوت عمل می کنند. احتمالاً کروسین بر سیستم دوپامینرژیک و مهار بازجذب نوراپی نفرین تأثیر می گذارد و سافرانال بر سیستم سروتونرژیک تأثیر می گذارد. یک مطالعه جدید نشان داد که کروسین (آلکالوئید اصلی زعفران) سطح دوپامین را در جسم مخطط افزایش می دهد و از تخریب نورون های دوپامین جلوگیری می کند (۲۱). از طرفی در تنها یک مطالعه نشان داده شده است که تجویز سافرانال احتمالاً با خصوصیت مصرف اجباری مورفین برهمکنش می کند و سبب سرکوبی در فاز اکتساب و بیان شرطی سازی با مورفین می گردد (۲۲). کاروتوئید کروسین می تواند با افزایش بیان ژن *BDNF* و *CREB* در *VTA* مغز و افزایش سطح سرمی *BDNF*، اثرات نامطلوب مورفین بر سیستم عصبی را تا حدودی مهار کند (۲۳).

حال با توجه به اثرات کروسین بر روی مدار سیستم پاداشی مغز، با توجه به این که مطالعات درباره نقش *crocinn* در دوره *extinction* (خاموشی) و *reinstatement* (بازگشت مجدد به مصرف) شرطی سازی با مورفین

صورت نگرفته است، در این مطالعه برای اولین بار شواهد رفتاری، هیستولوژیکی و آنزیمی را به دنبال تزریق داخل بطن مغزی *crocinn* بر دوره *extinction* و بیان (reinstatement) شرطی سازی با مورفین، بررسی گردید.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی، بعد از دریافت کد اخلاق از کمیته اخلاق به شماره IR.MAZUMS.AEC.1401.059 دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام گرفت. برای شروع مطالعه، بر اساس مطالعات قبلی مشابه و این که این حیوانات همه از یک نژاد بودند در این پژوهش موش سفید صحرایی (rat) نر بالغ با وزن تقریبی ۲۵۰-۳۳۰ گرم و به تعداد حیوانات در هر گروه ۶ تا ۸ سر، استفاده شد. لذا با در نظر گرفتن تعداد گروه های کنترلی و آزمونی (۶ گروه) در این پژوهش و تلفات احتمالی، ۶۰ سر موش صحرایی نر مورد نیاز بود. در این مطالعه جمعا از ۶ گروه کنترل و آزمون استفاده شد.

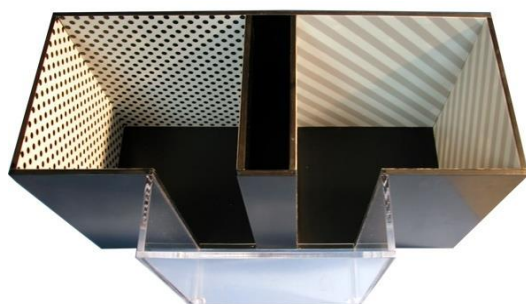
گروه های تحقیقی

گروه حلال: در این گروه موش ها کروسین دریافت نکرده و صرفاً مورفین ۵ میکرو گرم بر کیلوگرم را دریافت کردند.

گروه تزریقات مکرر: در این گروه، یک هفته بعد از جراحی و بهبودی زخم های محل کانول گذاری حیوان، با توجه به شکل شماره ۱ پس از طی دوره شرطی سازی ۵ روزه توسط مورفین (M) حیوان وارد مرحله خاموشی (Extinction) گردید و در روزهای خاموشی نیم ساعت قبل از تست CPP، دوز های مختلف کروسین (۱۰، ۲۰، ۴۰ میکروگرم بر کیلوگرم) را به صورت داخل بطن مغزی دریافت کرد و سپس بعد از ایجاد مرحله بازگشت به مصرف مورفین (Reinstatement) مشاهدات رفتاری حیوان ثبت گردید و در انتها حیوان در بیهوشی کامل با استفاده از کتامین (50mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) همراه با ایجاد

ارزیابی تست های رفتاری

موش ها با استفاده از روش رفتاری ترجیح مکانی شرطی (CPP) آزموده شدند. این آزمون دارای سه مرحله، پیش مواجهه (Preconditioning)، شرطی سازی (Conditioning) و آزمون ترجیح مکانی (Test)، انجام شد. در این روش از جعبه ای استفاده شد که دارای سه چار دیواری بود و توسط یک دوربین فیلمبرداری مخصوص در بالای جعبه ترجیح مکانی رفتار موش ها پیوسته پایش و در یک کامپیوتر ثبت گردید (تصویر شماره ۱).

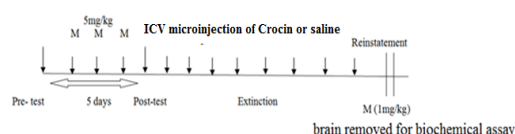


تصویر شماره ۱: نمونه ای از جعبه گرایش به جایگاه شرطی (CPP box)

برای ایجاد ترجیح مکانی، در روز نخست، مرحله پیش مواجهه انجام گرفت. برای این کار ابتدا موش برای مدت یک دقیقه، در حالی که درهای کشویی بسته هستند در چار دیواری مرکزی قرار داده شد تا با محیط آشنا شود. سپس هر دو در باز می شوند و برای مدت ده دقیقه به موش اجازه رفت و آمد آزادانه درون هر سه چار دیواری داده شد. مدت زمان گذرانده شده در هر چار دیواری و نیز میزان فعالیت حرکتی موش سنجیده شد، و سپس موش به قفس خود در حیوان خانه برده شد. برای رد کردن هر گونه سوگیری (Bias) ابتدایی موش نسبت به چار دیواری ها از چند معیار برای ورود موش ها به مطالعه استفاده قرار گرفت.

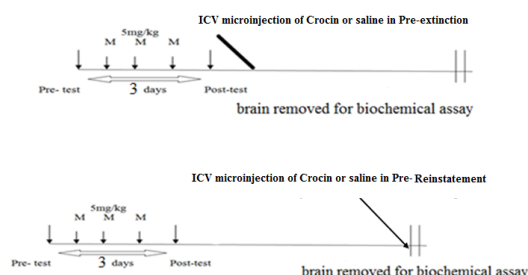
در مرحله شرطی سازی با مورفین حیوان دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن مورفین را به صورت زیر جلدی دریافت کرد (۲۷).

بی دردی با کوکتل میدازولام (۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی) و مدتومدین (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) کشته شد (۲۴). ناحیه هسته اکومبئس بر اساس اطلس واتسون پاکسینوس جدا گردید و در نیتروژن مایع فیکس شد و جهت انجام کارهای آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. (۳ گروه + یک گروه حلال) تعیین دوزهای تزریقی کروسین بر اساس مطالعات مشابه انجام شد (۲۵-۲۷).



تصویر شماره ۱: سیر زمانی در گروه های تزریقات مکرر

گروه تک تزریق: در این گروه حیوان تنها یک تک دوز موثر کروسین که از تزریق چند دوز به دست آمده است را در روز Post test (pre-extinction) و روز Pre-reinstatement دریافت کرد. سپس مشاهدات رفتاری آن ثبت شد و در انتها حیوان در بیهوشی کامل با استفاده از کتامین (50mg/kg) و زایلازین (10 mg/kg) همراه با ایجاد بی دردی با کوکتل میدازولام (۲ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن به صورت زیر جلدی) و مدتومدین (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن) کشته شد (۲۴). ناحیه هسته اکومبئس بر اساس اطلس واتسون پاکسینوس جدا گردید و در نیتروژن مایع فیکس و برای انجام کارهای آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (۲ گروه، تصویر شماره ۲) (۲۵ - ۲۷).



تصویر شماره ۲: سیر زمانی در گروه های تک تزریق

در روزهای دوم، سوم و چهارم آزمایش، مرحله شرطی سازی انجام شد. در هر یک از این روزها، بر پایه گروهی که هر موش در آن قرار دارد، ابتدا مداخله پیش‌بینی شده انجام گرفت (مانند تزریق کروسین و یا نرمال سالین در ناحیه صفاق یک ساعت قبل از تزریق مورفین یا گرفتن تست در روزهای extinction یا reinstatement). سپس موش در حالی که درهای کشویی بسته هستند برای مدت ۴۵ دقیقه در یکی از چار دیواری‌های طرفی قرار داده شد. پس از گذشت این زمان موش به قفسش برده شد و پس از ۶ ساعت، مداخله دیگری دریافت نمود و برای مدت ۴۵ دقیقه دیگر در چار دیواری طرف دیگر محدود شد. برای موش‌های درون هر گروه، چار دیواری که با دارو یا سالین مرتبط می‌شود و ترتیب دریافت دارو یا سالین به میزانی برابر توزیع شد. به این ترتیب هر موش یاد گرفت که یکی از چار دیواری‌های کناری با داروی پاداش آور ارتباط دارد و چار دیواری کناری دیگر ارتباطی با پاداش ندارد.

در روز پنجم، آزمون ترجیح مکانی انجام شد. ابتدا موش برای یک دقیقه در چار دیواری مرکزی گذاشته شد و سپس درها باز شده و موش اجازه یافت برای مدت ده دقیقه آزادانه بین چار دیواری‌ها رفت و آمد کند. در این هنگام مدت زمانی که موش در هر چار دیواری سپری کرد و نیز میزان فعالیت حرکتی سنجیده و ثبت شد. ترجیح مکانی به صورت اختلاف بین زمان سپری شده در چار دیواری مرتبط با دارو در روز آزمون و زمان سپری شده در همان چار دیواری در روز نخست تعریف می‌گردد و به صورت تغییر در ترجیح مکانی (بر حسب ثانیه) گزارش شد.

پس از پایان بخش رفتاری برای گروه‌های مربوط به بررسی ایجاد ترجیح مکانی، حیوان وارد فاز خاموشی (extinction) شد و در صورتی که در دو روز پشت سر هم حیوان به هیچ اتاقی سوگیری (Bias) نداشته باشد، پایان روزهای خاموشی بوده و فردای آن روز را با تزریق دوز غیر موثر مورفین (1 mg/kg) فاز reinstatement

نامیده شد. بعد از فاز reinstatement مغز موش‌ها برای بررسی میزان c-fos در نورون‌های ناحیه هسته اکومبیس با تکنیک‌های الایزا کنار گذاشته شد (۲۷).

در روز نخست و پنجم آزمون‌های پیش و پس از شرطی سازی انجام شد. در هنگام انجام این دو آزمون هیچ دارویی داده نشد، در میان دو چار دیواری کناری باز نگه داشته شد، و جانور برای ده دقیقه آزادانه درون جعبه رفت و آمد می‌کرد. برای انجام شرطی‌سازی، برای نیمی از موش‌ها الگوی نشان داده شده با پیکان‌های پررنگ پیش‌بینی شده بود و برای نیم دیگر برنامه نشان داده شده با پیکان‌های خط‌چین پیگیری شد. شماره‌های درون هر چار دیواری شماره دوره آموزشی را نشان می‌دهند. برای هر موش، چار دیواری که در آن مورفین (یا سالین) داده شد همیشه یکی بوده است. در روز سوم ترتیب دوره‌های صبح و عصر، نسبت به روزهای دوم و چهارم، جا به جا شد.

ارزیابی آزمون‌های رفتاری که شامل آزمون پس از شرطی‌سازی (Expression) است، در روز پنجم، آزمون ترجیح مکانی انجام شد. ابتدا موش برای یک دقیقه در چار دیواری مرکزی گذاشته شد و سپس درها باز شده و موش اجازه داشت برای مدت ۱۰ دقیقه آزادانه بین چار دیواری‌ها رفت و آمد کند. در این هنگام مدت زمانی که موش در هر چار دیواری سپری می‌کند و نیز میزان فعالیت حرکتی سنجیده و ثبت شد. ترجیح مکانی به صورت اختلاف بین زمان سپری شده در چار دیواری مرتبط با دارو در روز آزمون و زمان سپری شده در همان چار دیواری در روز نخست تعریف گشته و به صورت تغییر در ترجیح مکانی (بر حسب ثانیه) گزارش شد.

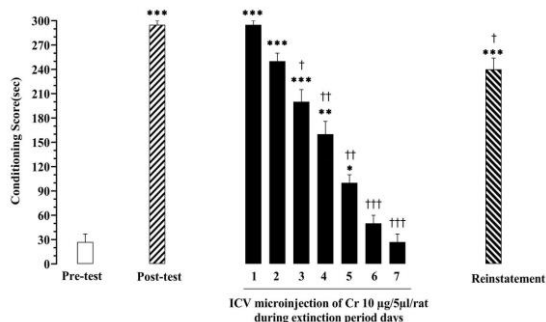
در مورد آزمون آماری اگر توزیع داده‌ها نرمال بود جهت مقایسه متغیرهای کمی بین گروه‌های مورد آزمون در صورت رعایت مفروضات ابتدا برای بررسی اختلاف بین گروه‌ها از آزمون repeated-measure ANOVA استفاده کرد. سپس از آزمون ANOVA یک

اضافه کردن اسید، خاتمه یافت و جذب در 450 nm اندازه گیری شد (۲۹-۲۷).

در این مطالعه با توجه به استفاده از حیوان آزمایشگاهی، کلیه ملاحظات اخلاقی بر اساس بیانیه هلسینکی و عدم آسیب به حیوان طراحی شد. ضمناً معدوم کردن حیوان از طریق بیهوشی بسیار عمیق با تیوپنتال و سپس جدا کردن سر از بدن (Decapitation) با استفاده از گیوتین انجام شد. در حین کار با حیوانات همه اصول مطرح شده راجع به اخلاق پژوهش های حیوانی رعایت شد و مجوز کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مازندران برای کار روی حیوان ها اخذ گردید. در تمام مراحل حیوان بیهوش بودند.

یافته ها

همان طور که در نمودار شماره ۱ نشان داده شده است آنالیز آماری repeated-measure ANOVA و آرایانس یک طرفه و تست تعقیبی Newman-Keuls مربوطه نشان می دهد تجویز مورفین در سه روز با دوز ۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش نمره شرطی سازی در روز post-test گردیده است ($P < 0.0001$).



نمودار شماره ۱: اثر تزریق ۱۰ میکروگرم داخل بطن مغزی کروسین بر روی طول دوره خاموشی و بازگشت به مصرف مجدد مورفین در موش های صحرایی نر شرطی شده با مورفین، حیوانات دوز ۱۰ میکروگرم کروسین را روزانه در طول دوره خاموشی یک ساعت قبل از CPP test دریافت نموده اند. داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ برای ۶ تا ۸ موش نمایش داده شده است، $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ different from $P < 0.001$ different from $P < 0.01$, $^{***}P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ the pretest day. the Post-test day.

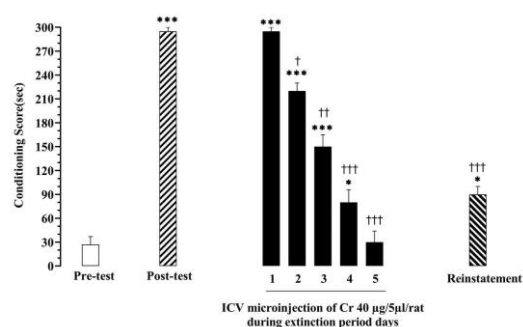
طرفه و در صورت نیاز از post test نیومن کولز و در آزمون دو طرفه در صورت نیاز از post test آن یعنی Tukey استفاده شد و در صورت توزیع غیر نرمال آزمون Kruskal-Wallis استفاده شد. برای مقایسه میانگین های دو گروه از روش t-test استفاده گردید. تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار Prism8 GraphPad انجام شد. همه داده ها با $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ نشان داده شده اند در تمام موارد سطح معنی داری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

اندازه گیری c-Fos به روش ELISA (Enzyme Linked

Immunosorbent Assay) در در ناحیه هسته اکومبیس

این روش بر اساس واکنش بین آنتی ژن و آنتی بادی طراحی شده است. در این روش آنتی بادی پلی کلونال اولیه که مخصوص آنتی ژن گونه مورد نظر است، از قبل به دیواره چاهک های اندازه گیری، چسبیده است. ابتدا در چاهک های جداگانه استاندارد، کنترل و نمونه مورد نظر ریخته شد، سیتوکین به آنتی بادی اولیه متصل گردید سپس به کلیه این چاهک ها، آنتی بادی دوم که یک آنتی بادی پلی کلونال حاوی بیوتین است اضافه شد، این آنتی بادی به آنتی ژن متصل به آنتی بادی اولیه متصل گردید. در طی اولین مرحله انکوباسیون، آنتی ژن از یک طرف به آنتی بادی اولیه به دام افتاده متصل شده و از طرف دیگر به آنتی بادی ثانویه حاوی بیوتین متصل گردید. پس از شستشو و خارج کردن آنتی بادی ثانویه اضافی، استرپتاویدین-HRP که آنزیم است به چاهک اضافه شد. این ماده به آنتی بادی ثانویه حاوی بیوتین متصل گردید، از این زمان به بعد مرحله دوم انکوباسیون شروع شد. پس از شستشو و خارج کردن آنزیم های باند نشده از محیط، محلول سوبسترا به چاهک ها اضافه گردید. این ماده پس از واکنش با آنزیم تولید رنگ کرد، که مرحله سوم انکوباسیون است. شدت رنگ به طور مستقیم با غلظت c-Fos در نمونه مورد نظر بستگی دارد. واکنش به وسیله

واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Newman-Keuls مربوطه نشان می‌دهد تجویز مورفین در سه روز با دوز ۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش نمره شرطی سازی در روز post-test گردیده است، لیکن تجویز روزانه داخل بطن مغزی دوز ۴۰ میکروگرم کروسین یک ساعت قبل از گرفتن تست در طول دوره خاموشی (Extinction) سبب کوتاه تر شدن روزهای این دوره به مدت ۳ روز گردید به طوری که روزهای دوره خاموشی ۵ روز بوده است ($P < 0.001$). هم‌چنین در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است که تجویز دوز ۴۰ میکروگرم کروسین سبب کاهش در بازگشت به مصرف مجدد مورفین (reinstatement) شده است ($P < 0.001$).

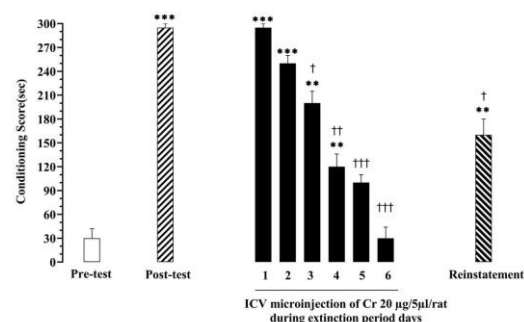


نمودار شماره ۳: اثر تزریق ۴۰ میکروگرم داخل بطن مغزی کروسین بر روی طول دوره خاموشی و بازگشت به مصرف مجدد مورفین در موش‌های صحرایی نر شرطی شده با مورفین، حیوانات دوز ۴۰ میکروگرم کروسین را روزانه در طول دوره خاموشی یک ساعت قبل از CPP test دریافت نموده‌اند. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ برای ۶ تا ۸ موش نمایش داده شده است، $P < 0.01$ and $***P < 0.001$ different from the pretest day $P < 0.05$, $†††P < 0.001$ different from the Post-test day

براساس نمودار شماره ۴، آنالیز آماری ANOVA repeated-measure آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Newman-Keuls مربوطه نشان می‌دهد که تجویز دوزهای مختلف کروسین ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم یا حلال آن (سالین) در طول دوره خاموشی سبب تغییرات معنی‌داری در فعالیت حرکتی حیوان (مسافت طی شده) نگردیده است و هیچ گونه اختلاف

با تجویز روزانه ۱۰ میکروگرم کروسین به صورت داخل بطن مغزی، روزهای خاموشی کوتاه شده و به ۷ روز رسیده است، و بازگشت به مصرف مجدد مورفین نیز کاهش پیدا کرده است ($P < 0.05$).

با توجه به نمودار شماره ۲، آنالیز آماری ANOVA repeated-measure آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Newman-Keuls مربوطه نشان می‌دهد تجویز مورفین در سه روز با دوز ۵ میکروگرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش نمره شرطی سازی در روز post-test گردیده است. لیکن تجویز روزانه داخل صفاقی دوز ۲۰ میکروگرم کروسین یک ساعت قبل از گرفتن تست در طول دوره خاموشی (Extinction) سبب کوتاه تر شدن روزهای این دوره به مدت دو روز گردید، به طوری که روزهای دوره خاموشی ۶ روز بوده است ($P < 0.001$) در همین نمودار نشان داده شده است که تجویز دوز ۲۰ میکروگرم کروسین سبب کاهش در بازگشت به مصرف مجدد مورفین (reinstatement) شده است ($P < 0.05$).

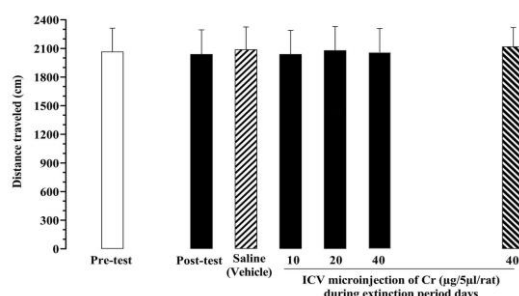
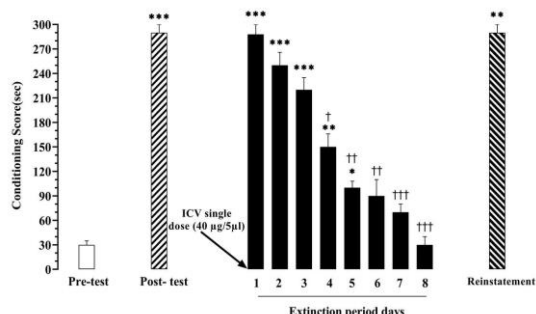


نمودار شماره ۲: اثر تزریق ۲۰ میکروگرم داخل بطن مغزی کروسین بر روی طول دوره خاموشی و بازگشت به مصرف مجدد مورفین در موش‌های صحرایی نر شرطی شده با مورفین، حیوانات دوز ۲۰ میکروگرم کروسین را روزانه در طول دوره خاموشی یک ساعت قبل از CPP test دریافت نموده‌اند، داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ برای ۶ تا ۸ موش نمایش داده شده است، $***P < 0.001$ and $**P < 0.01$ different from the pretest day. $†††P < 0.001$ different from the Post-test day. $P < 0.01$, $†††$

همان‌طور که در نمودار شماره ۳ نشان داده شده است آنالیز آماری ANOVA repeated-measure آنالیز

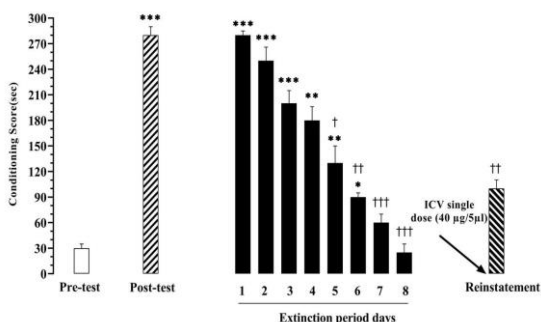
معنی‌داری بین تمام گروه‌های مورد مطالعه وجود ندارد ($P > 0.05$).

تزریق تک دوز پیش از خاموشی (pre-reinstatement) در روند پاداش مورفین موثر واقع شده است.



نمودار شماره ۵: اثر تجویز داخل بطنی مغزی تک دوز موثر ۴۰ میکرو گرم کروسین پیش از شروع دوره خاموشی بر روی طول دوره خاموشی مورفین و بازگشت به مصرف مجدد مورفین در موش های صحرایی نر شرطی شده با مورفین، حیوانات تک دوز ۴۰ میکرو گرم کروسین در پیش از شروع دوره خاموشی یک ساعت قبل از تزریق مورفین غیر موثر (1 mg/kg) به صورت داخل بطنی مغزی دریافت نموده اند و سپس تست CPP از آن ها گرفته شده است. داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ برای ۶ تا ۸ موش نمایش داده شده است، $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ different from the pretest day. $P < 0.001$ different from the Post-test day.

نمودار شماره ۶: اثر تجویز دوز کروسین ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرو گرم یا حلال آن بر روی فعالیت حرکتی طی روزهای دوره خاموشی و بازگشت به مصرف شرطی سازی با مورفین در موش های صحرایی نر، هیچ گونه اختلاف معنی داری بین گروه های آزمایش در مقایسه با گروه سالیین مشاهده نشده است، تمامی حیوانات دوزهای مختلف کروسین یا سالیین را در مرحله خاموشی دریافت نمودند و میزان مسافت طی شده آن ها ثبت گردید. داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ برای ۶ تا ۸ موش نمایش داده شده است، $P < 0.01$ and $P < 0.001$ different from the pretest day. $P < 0.001$ different from the Post-test day.

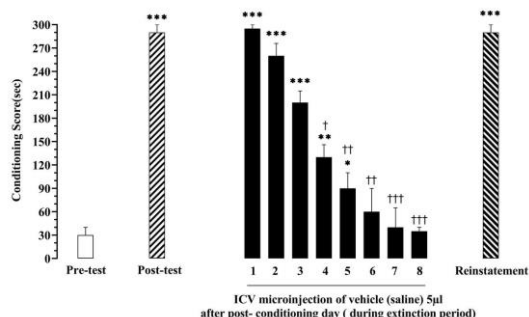


نمودار شماره ۶: اثر تجویز داخل بطن مغزی تک دوز موثر ۴۰ میکرو گرم کروسین پیش از دوره بازگشت به مصرف مجدد در موش های صحرایی نر شرطی شده با مورفین، حیوانات تک دوز ۴۰ میکرو گرم کروسین در پیش از شروع روز بازگشت به مصرف reinstatement یک ساعت قبل از تزریق مورفین غیر موثر (1 mg/kg) به صورت داخل بطنی مغزی دریافت نموده اند و سپس تست CPP از آن ها گرفته شده است، داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ برای ۶ تا ۸ موش نمایش داده شده است، $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$ different from the pretest day. $P < 0.001$ different from the Post-test day.

همان طور که در نمودار شماره ۵ نشان داده شد، آنالیز آماری repeated-measure ANOVA واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Newman-Keuls مربوطه نشان می دهد که تزریق تک دوز موثر ۴۰ میکرو گرم کروسین پیش از دوره خاموشی سبب کاهش طول دوره خاموشی و بازگشت به مصرف مجدد مورفین نشده است ($P > 0.05$). بنابراین تزریق تک دوز پیش از خاموشی (pre-extinction) در روند پاداش مورفین موثر واقع نشده است.

همان طور که در نمودار شماره ۶ نشان داده شده است آنالیز آماری repeated-measure ANOVA و آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Newman-Keuls مربوطه نشان می دهد که تزریق تک دوز موثر کروسین (۴۰ میکرو گرم پیش از دوره بازگشت به مصرف مجدد مورفین سبب کاهش بازگشت به مصرف مجدد مورفین (عود) گردیده است ($P < 0.01$). بنابراین

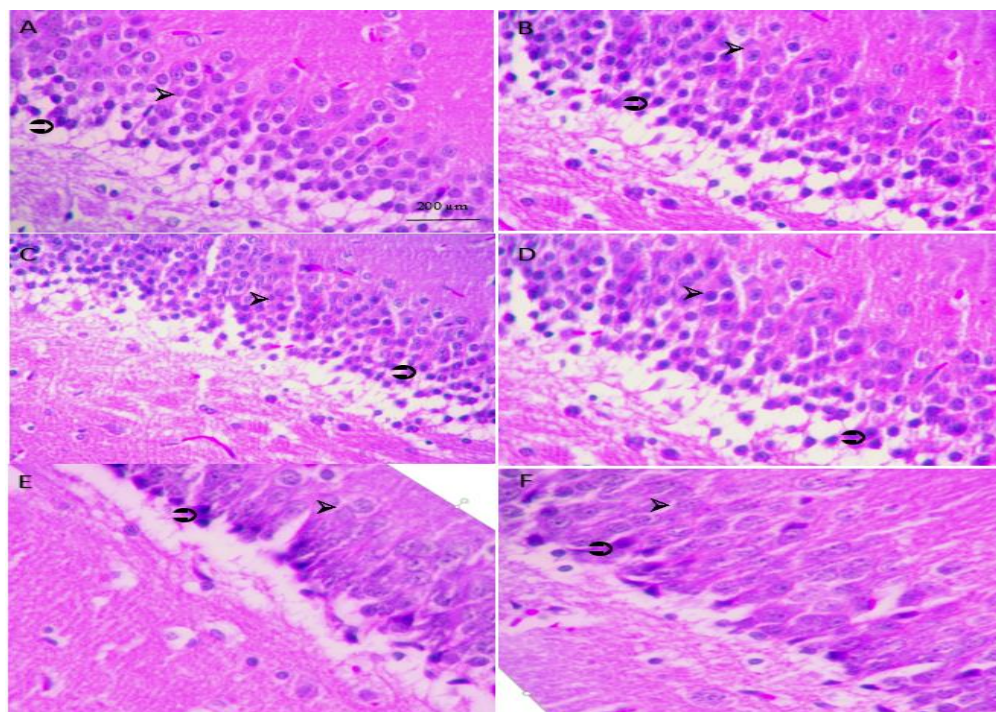
وابسته به دوز نسبت به گروهی که فقط سالیین دریافت کرده کاهش پیدا کرده است (تصویر شماره ۲).



نمودار شماره ۲: اثر تجویز روزانه داخل بطن مغزی حلال (سالیین) بر روی طول دوره خاموشی و بازگشت به مصرف مجدد مورفین در موش های صحرایی نر شرطی شده با مورفین، حیوانات حلال را روزانه در طول دوره خاموشی یک ساعت قبل از CPP test دریافت نموده اند. داده ها به صورت mean $\pm$ SEM برای ۶ تا ۸ موش نمایش داده شده است. $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ different from the pretest day. $^{††}P < 0.05$, $^{†††}P < 0.01$, $^{††††}P < 0.001$ different from the Post-test day.

همان طور که در نمودار شماره ۷ نشان داده شده است آنالیز آماری ANOVA repeated-measure آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی-Newman-Keuls مربوطه نشان می دهد تجویز مورفین در سه روز با دوز ۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن سبب افزایش نمره شرطی سازی در روز post-test گردیده است ($P < 0.001$) با تجویز روزانه حلال سالیین به صورت داخل بطنی نه روزهای خاموشی کوتاه شده و نه بازگشت به مصرف مجدد مورفین کاهش پیدا کرده است ($P > 0.01$).

همان طور که در نمودار شماره ۸، نشان داده شده است، تزریق ۴۰ و ۲۰ میکرو گرم کروسین در روزهای خاموشی نسبت به سایر دوزهای دیگر، و نیز تک تزریق ۴۰ میکرو گرم کروسین در فاز قبل از بازگشت در مقایسه با گروه سالیین، باعث کاهش CFOS در نورون های هسته اکومبنس شدند. میزان دژنراسیون نورونی در گروه هایی که کروسین دریافت کردند به صورت



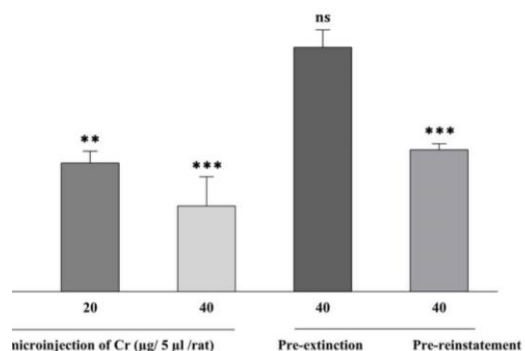
تصویر شماره ۴: نمونه هیستولوژی لام مغز موش ها، اثرات کروسین بر هیستوپاتولوژی پس از مرحله بازیابی با بزرگنمایی ۴۰۰ در سلول های عصبی هیپوکامپ CA1 موش نر، $\rightarrow$: نورون نرمال، $\odot$: نورون دژنره شده، A: گروه حلال، B: کروسین ۱۰ میکروگرم/۵ میکرولیتر در موش صحرایی، C: کروسین ۲۰ میکروگرم/۵ میکرولیتر در موش صحرایی، D: کروسین ۴۰ میکروگرم/۵ میکرولیتر در موش صحرایی، E: پیش از خاموشی، F: پیش از بازگشت به مصرف مجدد

بطنی نه روزهای خاموشی کوتاه شده و نه بازگشت به مصرف مجدد مورفین کاهش پیدا کرده است که تاییدی بر صحت گروه کنترل در این مطالعه است.

در مطالعه حسین زاده و همکاران که با هدف بررسی اثرات عصاره های آبی و اتانولی کلالة و ترکیبات آن بر سندرم ترک مورفین در موش ها انجام شد، نشان داد که عصاره ها و کروسین ممکن است با سیستم اپیوئیدی برای کاهش سندرم ترک تداخل داشته باشند (۳۰).

در مطالعه هدایت صحرایی و همکاران که به بررسی تاثیر کسب و بیان حساسیت حرکتی ناشی از مورفین در موش های ماده پرداختند، نشان داده شد عصاره کلالة گل زعفران دارای اثر کاهنده بر کسب و بیان حساسیت رفتاری به مورفین است همچنین اثر مورفین را در القای فعالیت حرکتی در موش های کوچک آزمایشگاهی ماده از بین می برد. همچنین تزریق عصاره زعفران قبل از شرطی سازی حیوان با مورفین سبب کاهش حساسیت به مورفین شد (۱۹). مطالعه بهروز خاکپور و همکاران با شیوه و با دوز مورفین و عصاره زعفران مشابه بر روی موش های نر انجام شد نیز به همین نتایج دست یافت (۳۱). با وجودی که مطالعه صحرایی و همکاران برخلاف مطالعه حاضر در حیوانات ماده انجام شد و تزریق به صورت داخل رگی بوده است، ولی نتایج همسو با مطالعه حاضر بود که نشان داد تجویز کروسین یا همان عصاره زعفران می تواند وابستگی و تمایل روانی به مورفین را کاهش دهد. تفاوت دیگر این مطالعه با مطالعه حاضر در دوز تجویزی عصاره زعفران بود که در این مطالعه، این کاهش حساسیت در دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ بوده است که بیش تر از دوزهای تجویزی مطالعه حاضر بود که به نظر می رسد به دلیل نحوه تزریق عصاره بوده است.

در مطالعه حسین زاده همکاران که با هدف بررسی اثرات ضد اضطراب و خواب آور عصاره آبی زعفران و ترکیبات آن کروسین و ساfranال در موش های سوری انجام شد، نشان داد عصاره آبی زعفران که به طور داخل



نمودار شماره ۸: اثر تجویز کروسین به صورت تزریقات مکرر و تک تزریق در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین بر میزان c-fos در نورون های هسته اکومبئیس

بحث

تجویز روزانه داخل بطنی کروسین در دوره خاموشی در دوزهای ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم و مخصوصاً دوز ۴۰ میکروگرم سبب کاهش دوره خاموشی شد به طوری که به صورت وابسته به دوز روزهای خاموشی کوتاه گردیده است، ولی با تزریق دوز ۱۰ میکروگرم دوره خاموشی یک روز کوتاه شده است، در دوز ۲۰ دو روز و ۴۰ میکروگرم سه روز از دوره خاموشی کم شده است یعنی حیوان ۲ و ۳ روز زودتر bias خود را از اتاقت CPP از دست داده است. با تزریق تک دوز موثر ۴۰ میکروگرم کروسین پیش از شروع دوره خاموشی به صورت داخل بطنی دوره بازگشت به مصرف مورفین نسبت به Post Test تغییر نکرده است. با تزریق تک دوز موثر ۴۰ میکروگرم کروسین پیش از دوره بازگشت به صورت داخل بطنی دوره بازگشت به مصرف مورفین نسبت به Post Test تغییر کرده است. اثر تجویز دوز کروسین ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم یا حلال آن بر روی فعالیت حرکتی طی روزهای دوره خاموشی و بازگشت به مصرف شرطی سازی با مورفین در موش های صحرایی نر هیچ گونه اختلاف معنی داری بین گروه های آزمایش در مقایسه با گروه سالین نداشت.

هم چنین تجویز روزانه حلال سالین به صورت داخل

تزریق روزانه مورفین، وابستگی به مورفین را کاهش می‌دهد، و این اثر ممکن است مربوط به مهار تولید $TNF-\alpha$ باشد (۳۴). نتایج این مطالعه همسو با نتایج مطالعه حاضر بود که نشان داد تزریق تک دوز موثر ۴۰ میکرو گرم کروسین پیش از دوره بازگشت به صورت داخل بطنی دوره ی بازگشت به مصرف مورفین نسبت به Post Test تغییر کرده است.

این مطالعه به صورت منحصر به فرد به بررسی تاثیر تزریق داخل بطنی کروسین در دوزهای مختلف به شیوه های مختلف پرداخت. بسیاری از جنبه های مختلف اثرات کروسین در مغز هنوز ناشناخته است. به عنوان مثال این که چرا تزریق یک جا داخل بطنی کروسین قبل از فاز خاموشی تاثیری بر بازگشت به مصرف مجدد نداشته است، همچنان جای سوال است و کم تر مطالعه ای به این موضوع پرداخته است، به نظر می رسد بررسی بیش تر گیرنده های کروسین و تاثیری که بر روی گیرنده های مورفینی دارد، می تواند در دستیابی به نتایج بهتر و دقیق تر کمک کند.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران بابت حمایت مالی این طرح که پایان نامه دکترای پزشکی عمومی خانم دکتر مهدیه فرجی بوده کمال تقدیر و تشکر را به عمل آورند.

References

1. Bliss-Moreau E, Rudebeck PH. Animal models of human mood. *Neurosci Biobehav Rev* 2021; 120: 574-582. PMID: 33007355.
2. Kontaris I, East BS, Wilson DA. Behavioral and neurobiological convergence of odor, mood and emotion: a review. *Front Behav Neurosci* 2020; 14: 35. PMID: 32210776.
3. Carlezon WA Jr, Thomas MJ. Biological substrates of reward and aversion: a nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology* 2009; 56: 122-132. PMID: 18675281.
4. Ikemoto S, Glazier BS, Murphy JM, McBride WJ. Role of dopamine D1 and D2 receptors in the nucleus accumbens in mediating reward. *J Neurosci* 1997; 17(21): 8580-8587. PMID: 9334429.
5. Volkow ND, Michaelides M, Baler R. The neuroscience of drug reward and addiction. *Physiol Rev* 2019; 99(4): 2115-2140. PMID: 31507244.

6. Ikemoto S. Brain reward circuitry beyond the mesolimbic dopamine system: a neurobiological theory. *Neurosci Biobehav Rev* 2011; 35(2): 129-150. PMID: 20149820.
7. Wolf ME. Regulation of AMPA receptor trafficking in the nucleus accumbens by dopamine and cocaine. *Neurotox Res* 2010; 18(3-4): 393-409. PMID: 20361291.
8. Koob GF. Neurobiology of opioid addiction: opponent process, hyperkatifeia, and negative reinforcement. *Biol Psychiatry* 2020; 87(1): 44-53. PMID: 31400808.
9. Koob GF, Volkow ND. Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. *Lancet Psychiatry* 2016; 3(8): 760-773. PMID: 27475769.
10. Do Couto BR, Aguilar M, Manzanedo C, Rodriguez-Arias M, Minarro J. NMDA glutamate but not dopamine antagonists blocks drug-induced reinstatement of morphine place preference. *Brain Res Bull* 2005; 64(6): 493-503. PMID: 15639545.
11. Manzanedo C, Aguilar M, Rodriguez-Arias M, Minarro J. Effects of dopamine antagonists with different receptor blockade profiles on morphine-induced place preference in male mice. *Behav Brain Res* 2001; 121(1-2): 189-197. PMID: 11275296.
12. Lee B, Kwon S, Yeom M, Shim I, Lee H, Hahm DH. Wild ginseng attenuates repeated morphine-induced behavioral sensitization in rats. *J Microbiol Biotechnol* 2011; 21(7): 757-765.
13. Akhondzadeh S. *Crocus sativus* (saffron), an herb with a history as long as the history of Iran with psychotropic effects. *J Med Plants* 2016; 15(58): 1-6.
14. Hosseini A, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Pharmacokinetic properties of saffron and its active components. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2018; 43(4): 383-390. PMID: 29134501.
15. Hosseinzadeh H, Jahanian Z. Effect of *Crocus sativus* L. (saffron) stigma and its constituents, crocin and safranal, on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother Res* 2010; 24(5): 726-730. PMID: 19827024.
16. Haghighizad H, Pourmotabbed A, Sahraei H, Ghadami MR, Ghadami S, Kamalinejad M. Protective effect of saffron extract on morphine-induced inhibition of spatial learning and memory in rat. *Physiol Pharmacol* 2008; 12(3): 170-179.
17. Nemat Shahi M, Asadi A, Behnam Talab E, Nemat Shahi M. The impact of saffron on symptoms of withdrawal syndrome in patients undergoing maintenance treatment for opioid addiction in Sabzevar parish in 2017. *Adv Med* 2017; 2017. PMID: 29359178.
18. Egtesadi R, Safavi S, Rasouli-Azad M, Ghaderi A. The effects of saffron on psychiatric disorders: a review. *Int J Pharm Res* 2020; 12(2).
19. Sahraei H, Shams J, Marjani S, Molavi S, Kamalinejad M. Effects of the *Crocus sativus* L. extract on the acquisition and expression of morphine-induced behavioral sensitization in female mice. *J Med Plants* 2007; 6(21): 26-35.
20. Kiashemshaki B, Safakhah HA, Ghanbari A, Khaleghian A, Miladi-Gorji H. Saffron (*Crocus sativus* L.) stigma reduces symptoms of morphine-induced dependence and spontaneous withdrawal in rats. *Am J Drug Alcohol Abuse* 2021; 47(2): 170-181. PMID: 33497577.
21. Maj M. Development and validation of the current concept of major depression.

- Psychopathology 2012; 45(3): 135-146. PMID: 22399134.
22. Ghoshooni H, Daryaafzoon M, Sadeghi-Gharjehdagi S, Zardooz H, Sahraei H, Tehrani S, et al. Saffron (*Crocus sativus*) ethanolic extract and its constituent, safranal, inhibits morphine-induced place preference in mice. *Pak J Biol Sci* 2011; 14(20): 939-944. PMID: 22514895.
 23. Rezai M, Mahmoodi M, Kaeidi A, Karimabad MN, Khoshdel A, Hajizadeh MR. Effect of crocin carotenoid on BDNF and CREB gene expression in brain ventral tegmental area of morphine treated rats. *Asian Pac J Trop Biomed* 2018; 8(8): 387.
 24. Chakraborty N, Hammamieh R, Gautam A, Miller SA, Condlin ML, Jett M, et al. TBI weight-drop model with variable impact heights differentially perturbs hippocampus-cerebellum specific transcriptomic profile. *Exp Neurol* 2021; 335: 113516. PMID: 33172833.
 25. Rezaei F, Saebipour MR, Ghaemi K, Hassanzadeh-Taheri MM, Foadoddini M, Hosseini M. Intra-cerebroventricular administration of crocin attenuates sleep deprivation-induced hyperalgesia in rats. *Basic Clin Neurosci* 2020; 11(3): 261.
 26. Rameshrad M, Razavi BM, Hosseinzadeh H. Saffron and its derivatives, crocin, crocetin and safranal: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2018; 28(2): 147-165. PMID: 28705037.
 27. Siahposht-Khachaki A, Ezzatpanah S, Razavi Y, Haghparast A. NMDA receptor dependent changes in c-fos and p-CREB signaling following extinction and reinstatement of morphine place preference. *Neurosci Lett* 2018; 662: 147-151. PMID: 33007355.
 28. Siahposht-Khachaki A, Fatahi Z, Haghparast A. Reduction of the morphine maintenance by blockade of the NMDA receptors during extinction period in conditioned place preference paradigm of rats. *Basic Clin Neurosci* 2016; 7(4): 341-350. PMID: 27872695.
 29. Boyajyan A, Zakharyan R, Atshemyan S, Chavushyan A, Mkrtchyan G. Schizophrenia-associated risk and protective variants of c-Fos encoding gene. *Recent Adv DNA Gene Seq* 2015; 9(1): 51-57. PMID: 25706621.
 30. Hosseinzadeh H, Jahanian Z. Effect of *Crocus sativus* L. (saffron) stigma and its constituents, crocin and safranal, on morphine withdrawal syndrome in mice. *Phytother Res* 2010; 24(5): 726-730.
 31. Khakpour BR, Sahraei H, Kamalnejhad M, Shams J. Effects of the *Crocus sativus* L. extract on the acquisition and expression of morphine-induced behavioral sensitization in male mice. *Kowsar Med J* 2007; 12(4): 305-313.
 32. Karkoula E, Lemonakis N, Kokras N, Dalla C, Gikas E, Skaltsounis AL, et al. Trans-crocin 4 is not hydrolyzed to crocetin following IP administration in mice, while it shows penetration through the blood brain barrier. *Fitoterapia* 2018; 129: 62-72. PMID: 29920295.
 33. Ali A, Yu L, Kousar S, Khalid W, Maqbool Z, Aziz A, et al. Crocin: functional characteristics, extraction, food applications and efficacy against brain related disorders. *Front Nutr* 2022; 9: 1009807.
 34. Majidpour S. Evaluation of the effects of meloxicam and crocin in dependency induced by morphine in mice. *Tabriz Univ Med Sci Faculty Pharm* 2020.