Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017

دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وسوم-شماره ۱۲۱
اسفند ۱۳۹۴

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۴/۱۲/۰۳
پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۲

اثر تجویز درون‌صفاقی عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده و عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیدهٔ پایهٔ مادهٔ گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa*) بر درد در موش صحرایی

نویسندگان: بهرام فرهادی‌مقدم[۱]، مسعود فریدونی[۲*]، علی اسداللهی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۲. دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳. استادیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

* نویسنده مسئول: مسعود فریدونی E-mail: fereidoni@um.ac.ir

چکیده

مقدمه و هدف: گیاه شاهدانه منبع کانابینوئیدهای گیاهی است و از مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به Tetrahydrocannabinolic acid و Cannabidiolic acid اشاره کرد که با تأثیر بر سیستم اندوکانابینوئیدی، اثراتی را بر اضطراب، صرع و تهوع دارند. این تحقیق به بررسی اثرات تجویز داخل صفاقی عصاره‌های هیدروالکلی و هگزانی گل‌های پایهٔ مادهٔ شاهدانه که دارای حداکثر کانابینوئیدهاست، بر درد حرارتی و شیمیایی پرداخته است. علاوه‌براین، تأثیر عامل حرارت نیز بر اثرات فیزیولوژیک این کانابینوئیدهای گیاهی بر درد مورد آزمایش قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعهٔ تجربی، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰تا۲۰۰گرم) در گروه‌های کنترل، شم، عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده با دوزهای mg/kg ۵۰ و ۱۰، ۱، عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده با دوز mg/kg ۵۰ و عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده با دوز mg/kg ۵۰ دسته‌بندی شدند. برای سنجش شدت درد شیمیایی، از آزمون فرمالین و برای سنجش آستانهٔ درد حرارتی، از آزمون Tail flick استفاده گردید.

نتایج: تجویز درون‌صفاقی دوز mg/kg ۵۰ عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده در مقایسه با سایر عصاره‌ها، اثر کاهشی بسیار قابل‌توجهی بر فاز اول و دوم آزمون فرمالین و بر آستانهٔ درد حرارتی داشت.

نتیجه‌گیری: احتمالاً کانابینوئیدهای دکربوکسیله که توسط هگزان به‌میزان بیشتری استخراج می‌گردند، تمایل اتصالی بیشتری به گیرنده‌های CB1 و TRPV1 در مسیر درد دارند و به‌ترتیب، موجب مهار آزادسازی میانجی‌های مؤثر بر پردازش درد و غیرحساس نمودن گیرنده‌های مسیر درد می‌گردد، همچنین موجب مهار عوامل تجزیه‌گر کانابینوئیدهای درون‌زاد نیز می‌شوند.

واژگان کلیدی: شاهدانه (*Cannabis sativa*)، سیستم اندوکانابینوئیدی، درد، آزمون فرمالین، Tail flick.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017

مقدمه

سیستم اندوکانابینوئیدی، سیستم سیگنالینگ تعدیل‌گر و درون‌زاد مشتق‌شده از لیپیدهاست (۱) و با حضور در سیستم‌های عصبی مرکزی، محیطی و بعضی اندام‌ها اثرات متنوعی را از خود بروز می‌دهد؛ به‌عنوان مثال، در سیستم عصبی مرکزی نقش بسیار مهمی در فرایندهای یادگیری، تفکر و عملکردهای احساسی ایفا می‌کند (۳و۲). مفهوم این سیستم در سال ۱۹۹۵ پایه‌ریزی شد (٤). این سیستم شامل کانابینوئیدهای درون‌زاد می‌باشد که دو ترکیب مهم آن‌ها 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) وN-Arachidonylethanolamine (Anandamid, AEA) است که به‌صورت اتوکرین و پاراکرین هستند و بر گیرنده‌های کانابینوئیدی و غیرکانابینوئیدی غشاء تأثیر می‌گذارند (٦و٥). یکی دیگر از بخش‌های سیستم اندوکانابینوئیدی، گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 متصل به G-پروتئین‌ها هستند و در اثر اتصال کانابینوئیدها، فعال شده و موجب مهار آنزیم آدنلیل‌سیکلاز و تولید AMP حلقوی می‌گردند. این مهار، بالطبع می‌تواند باعث محدودیت ورود یون کلسیم به درون سلول و فعال‌نمودن کانال‌های پتاسیمی نوع A شود که درمجموع به کاهش تحریک‌پذیری سلول و آزادسازی میانجی‌های عصبی منتج می‌گردد (۷). ازنظر نحوۀ پراکنش، گیرندۀ CB1 به‌طور غالب در سیستم عصبی مرکزی و CB2 به‌عنوان گیرندۀ محیطی کانابینوئیدی در بافت‌هایی همچون بافت لنفوئیدی، سلول‌های خون‌ساز، سیستم ایمنی و در بعضی نورون‌ها حضور دارند (۹و۸) و در تعدیل آزادسازی سیتوکاین‌ها و پاسخ ایمنی به التهاب نقش دارند (۱۰و۲). لازم به ذکر است که گیرنده‌های غیرکانابینوئیدی نیز هستند که کانابینوئیدها می‌توانند با اتصال به آن‌ها، برخی از اثرات خود را بروز دهند (۱۰). این گیرنده‌ها شامل کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار (TRPV1) و گیرنده‌هایی که درواقع، فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های گیرنده هسته‌ای هستند که از این گروه می‌توان به GPR55 وGPR119 اشاره کرد (٤و۲). سومین بخش از سیستم اندوکانابینوئیدی، پروتئین‌های مسئول تولید، انتقال و تجزیه کانابینوئیدها، به‌عنوان‌مثال، دو آنزیم Fatty acid amide hydrolase (FAAH) وMonoacylglycerol که به‌ترتیب مسئول تجزیه AEA و 2-AG می‌باشد (۱۱). کانابینوئیدها، ازنظر محل تولید به دو دستۀ درون‌زاد و برون‌زاد تقسیم‌بندی می‌شوند که کانابینوئیدهای گیاهی (طبیعی) از نوع برون‌زاد آن‌ها هستند و در گیاه شاهدانه به‌وفور یافت می‌شوند. دو ترکیب Tetrahydrocannabinol و Cannabidiol از اصلی‌ترین این کانابینوئیدها در گیاه شاهدانه هستند (۱۲و۱۰). ازآنجاکه درد، نوعی استراتژی دفاعی است که با سیگنال‌رسانی، انسان را از خطر آسیب‌های ناشی از بیماری‌ها، عوامل فیزیکی و غیره آگاه می‌نماید (۱۳)، درمان آن نیز به‌ویژه دردهای مزمن باتوجه‌به عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای موجود، مشکلاتی را برای پزشکان و بیماران ایجاد نموده است؛ به‌گونه‌ای که یافتن داروهایی با عوارض جانبی کمتر برای کنترل درد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (١٤). باتوجه‌به مطالب مطرح شده، هدف از این تحقیق بررسی اثرات ناشی از فعال‌سازی سسیتم اندوکانابینوئیدی توسط کانابینوئیدهای گیاهی بر آستانۀ درد حرارتی و شدت درد شیمیایی می‌باشد و بدین منظور، از گل‌های پایۀ مادۀ گیاه شاهدانه که دارای حداکثر میزان کانابینوئیدهای گیاهی است (۱۵) عصاره‌گیری و استفاده گردید. همچنین در فرایند عصاره‌گیری به‌منظور یافتن حلال مناسب برای استخراج بیشترین مقدار از کانابینوئیدها، باتوجه‌به ساختار مولکولی آن‌ها از دو نوع حلال هگزان و هیدروالکلی استفاده شد و باتوجه‌به تغییر ساختار کانابینوئدهای گیاهی در اثر حرارت (١٦)، تأثیر عامل حرارت نیز بر اثرات فیزیولوژیک کانابینوئیدها بر درد، مورد بررسی قرار گرفت.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017

مواد و روش‌ها

در این مطالعهٔ تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن در محدودهٔ ۲۰۰تا۲۵۰گرم که در حیوان‌خانهٔ گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط استاندارد با درجهٔ حرارت ۲۱°C، رطوبت ۵۰٪ و سیکل نوری ۱۲ساعته روشنایی/تاریکی و باامکان دسترسی نامحدود به آب و غذا، نگهداری شدند، در گروه‌های ۷تایی شامل گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه شم (دریافت‌کننده حلال شامل ترکیب اتانول، توئین ۸۰ و سالین به‌ترتیب با نسبت‌های ۱:۱:۸)، گروه‌های دریافت‌کنندهٔ عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده با دوزهای ۵۰mg/kg و ۱۰ و ۱، گروه دریافت‌کنندهٔ دوز ۵۰mg/kg عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده و گروه دریافت‌کنندهٔ دوز ۵۰mg/kg عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده استفاده گردید. تمامی تجویزها به‌صورت درون‌صفاقی بود و کلیهٔ مراحل آزمایش‌ها تحت مقررات بین‌المللی رعایت حقوق حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت (۱۷). در این مطالعه، ابتدا دوزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده تجویز شد و پس از مشخص‌شدن دوز ۵۰mg/kg به‌عنوان مؤثرترین دوز، به‌منظور مقایسهٔ اثر عصاره‌ها بر درد، در گروه‌های دیگر فقط دوز ۵۰mg/kg عصاره‌ها تجویز شد.

عصاره‌گیری

گل‌های پایهٔ مادهٔ گیاه شاهدانه که توسط آزمایشگاه بیوسیستماتیک گیاهی تهیه و با کد هرباریومی۴۴۶۹۰ توسط پژوهشکدهٔ علوم گیاهی دانشگاه فردوسی تأیید و نگهداری شده بود، برای عصاره‌گیری استفاده گردید. ابتدا گل‌ها عاری از برگ و ساقه شده و جهت خشک‌کردن در مکانی تاریک و خشک به مدت دو هفته نگهداری شدند و سپس برای هر عصاره‌گیری مقدار ۵۰ گرم از مادهٔ خشک مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیهٔ عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده، مادهٔ خشک به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجهٔ سانتی‌گراد در آون حرارت داده شد و سپس با هگزان و روش ماسراسیون (خیساندن) (۱۸) عصاره‌گیری و سپس توسط کاغذ صافی، صاف گردید. برای تهیهٔ عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، مادهٔ خشک پس از حرارت دیدن، با استفاده از اتانول ۷۰٪ به روش خیساندن عصاره‌گیری شد و به‌منظور تهیه عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده، به‌جز حرارت‌دیدن، سایر موارد ذکر شده انجام گرفت. پس از عصاره‌گیری، حلال‌ها به‌طور کامل تبخیر شدند.

آزمون فرمالین

به‌منظور سنجش شدت درد شیمیایی از آزمون فرمالین استفاده گردید. بدین‌صورت که پس از گذشت ۳۰ دقیقه از هر تجویز درون‌صفاقی، محلول فرمالین ۲/۵٪ به میزان ۰/۰۵ سی‌سی به کف پای حیوان تزریق شد و رفتار حیوان به‌مدت ۶۰ دقیقه، هر ۱۵ ثانیه یک‌بار مورد بررسی و ثبت قرار گرفت. پاسخ رفتاری در جوندگان طی آزمون فرمالین، دومرحله‌ای است. درد در مرحلهٔ اول (فاز نوروژنیک) وابسته به مکانیسم‌های نوروژنیک است و پاسخ درد در این مرحله، ناشی از تحریک مستقیم فرمالین بر روی پایانه‌های عصبی محیطی می‌باشد که در ۵تا۱۰ دقیقهٔ اول تزریق رخ می‌دهد؛ درحالی‌که در مرحلهٔ دوم، پاسخ درد درنتیجهٔ التهاب و آزادشدن میانجی‌های التهابی بروز می‌کند (فاز التهابی) که تقریباً از دقیقهٔ ۲۰ شروع شده و گاهی تا ۶۰ دقیقه به‌طول می‌انجامد. همچنین می‌توان شدت درد را در این آزمون به‌صورت کمیتی از صفر تا ۳ درجه‌بندی کرد، به‌طوری‌که عدد صفر، زمانی است که حیوان هیچ دردی ندارد، در عدد یک حیوان در اثر درد می‌لنگد، در عدد ۲ حیوان پای مورد تزریق فرمالین را در تمام مدت بالا نگه می‌دارد و در عدد ۳ حیوان پا را به‌شدت تکان می‌دهد، گاز می‌گیرد یا لیس می‌زند (۱۹).

آزمون Tail flick

برای سنجش آستانهٔ درد حرارتی در موش صحرایی

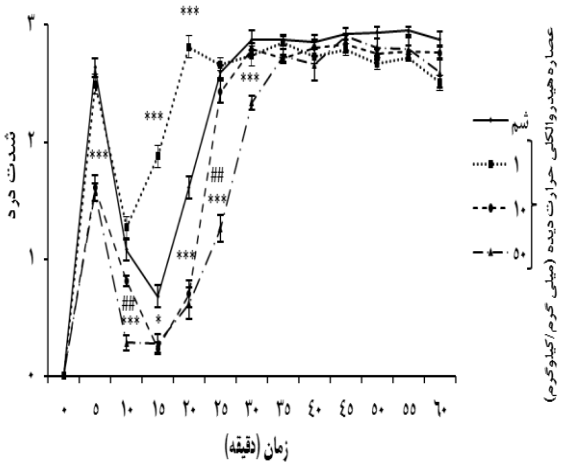
Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017

از آزمون Tail flick استفاده گردید. این آزمون، اولین‌بار توسط D'Amour و Smith (۱۹٤۱) معرفی شد. در این آزمون، حیوان در رستریز (تیوب محدودکننده) قرار گرفت، به‌صورتی که دم آن بیرون باشد. شدت نور دستگاه Tail flick (Sparco، ایران) طوری تنظیم گردید که زمان متوسط پاسخ‌دهی پایه، بین ٤تا٦ ثانیه باشد و زمان ۱۵ ثانیه نیز به‌عنوان زمان قطع تابش نور به یک‌سوم میانی دم حیوان (Cut of time) برای جلوگیری از هرگونه ایجاد آسیب بافتی، درنظر گرفته شد. زمان پاسخ‌دهی، قبل و ۳۰ دقیقه پس از تجویز درون‌صفاقی عصاره‌ها اندازه‌گیری شد، این زمان حاصل میانگین سه‌بار اندازه‌گیری متوالی با فواصل یک‌دقیقه‌ای بود و این میانگین به‌عنوان آستانهٔ درد (Tail flick latency) درنظر گرفته شد (۲۰).

داده‌ها به‌صورت mean±SEM ارائه شدند. معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 6 و به‌دنبال آن مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون T-Student-Neumann-keuls و با حداقل سطح معنی‌داری $p<0.05$ برآورد شدند.

نتایج

مقایسهٔ نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه کنترل و شم حاکی از عدم تأثیرگذاری تجویز حلال در هر دو فاز آزمون فرمالین بود. ازطرفی مقایسهٔ نتایج حاصل از آزمون فرمالین پس از تجویز درون‌صفاقی دوزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده با گروه شم نشان داد که تجویز دوز ۱ mg/kg منجر به افزایش قابل‌توجه شدت درد شیمیایی در دقایق اولیهٔ فاز التهابی آزمون فرمالین گردید ($p<0.001$). تجویز دوز ۱۰mg/kg موجب کاهش قابل‌توجه شدت درد شیمیایی در فاز نوروژنیک و ابتدای فاز التهابی آزمون فرمالین شد ($p<0.001$). به‌دنبال تجویز دوز ۵۰mg/kg شدت درد شیمیایی در هر دو فاز نوروژنیک و التهابی آزمون فرمالین در مقایسه با گروه شم ($p<0.001$) و سایر گروه‌ها ($p<0.01$) کاهش معنی‌داری یافت (نمودار ۱).

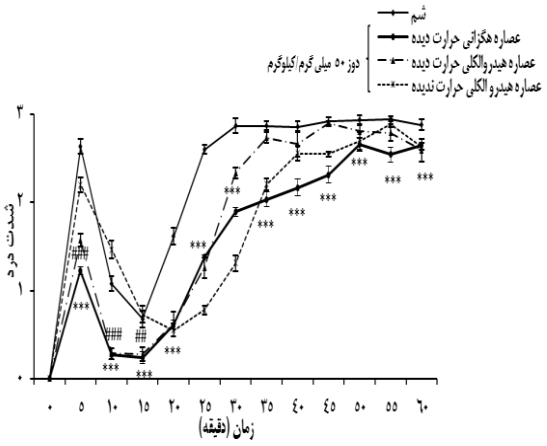


نمودار ۱. مقایسهٔ شدت احساس درد در گروه شم و گروه‌های دریافت‌کنندهٔ دوزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده طی آزمون فرمالین.

نتایج به‌صورت mean±SEM ارائه شده‌اند، (*p<0.05 و ***p<0.001 در مقایسه با گروه شم و ##p<0.01 در مقایسه با دوز ۱۰ mg/kg) و (n =۷).

همچنین مقایسهٔ نتایج حاصل از آزمون فرمالین پس از تجویز درون‌صفاقی دوز ۵۰mg/kg عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده و عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده و گروه شم، حاکی از آن بود که عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده نیز همچون عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده باعث کاهش شدت درد شیمیایی در هر دو فاز آزمون فرمالین شد ($p<0.05$)، اما عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده توانست شدت درد شیمیایی را در هر دو فاز آزمون فرمالین در مقایسه با گروه شم و سایر گروه‌ها کاهش دهد (نمودار ۲).

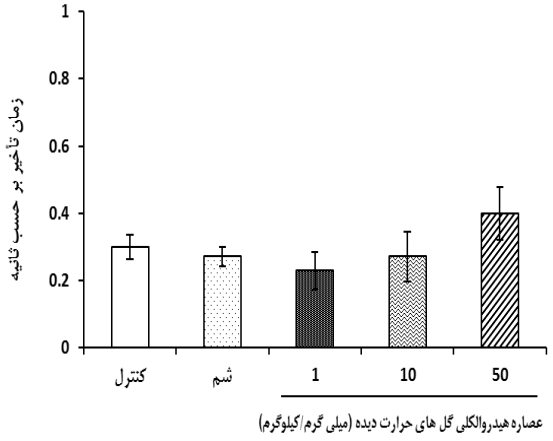
Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017



نمودار ۲. مقایسهٔ شدت احساس درد در گروه شم و گروه‌های دریافت‌کنندهٔ دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده و عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده طی آزمون فرمالین.

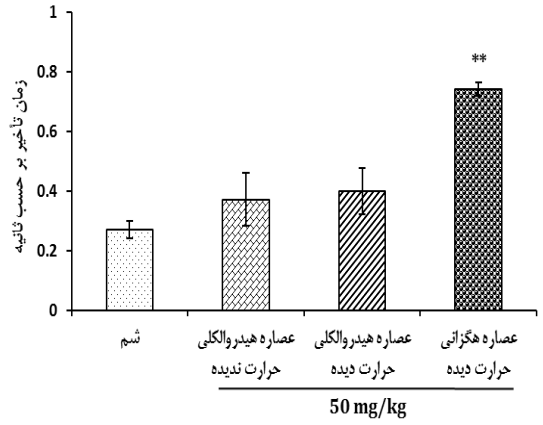
نتایج به‌صورت mean±SEM ارائه شده‌اند، (*p<0.001 در مقایسه با گروه شم و ##p<0.01 و ###p<0.001 در مقایسه با عصاره‌های هیدروالکلی) و (n =۷).**

ازطرفی، بررسی نتایج حاصل از آزمون Tail flick به‌منظور سنجش آستانهٔ درد حرارتی، نشان داد که تفاوت معنی‌داری در آستانهٔ درد حرارتی بین گروه کنترل، شم و سایر گروه‌های دریافت‌کنندهٔ دوزهای ۱ و ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده وجود نداشت (نمودار ۳). اما مقایسهٔ نتایج حاصل از تجویز درون‌صفاقی دوز ۵۰mg/kg عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده و عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده بر آستانهٔ درد حرارتی، حاکی از آن بود که عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده، برخلاف دو عصارهٔ دیگر، توانست اثر کاهشی قابل‌توجهی را بر آستانهٔ درد حرارتی طی آزمون Tail flick اعمال نماید (نمودار ٤).



نمودار ۳. مقایسهٔ آستانهٔ درد حرارتی در گروه کنترل، شم و گروه‌های دریافت‌کنندهٔ دوزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده طی آزمون Tail flick.

نتایج به‌صورت mean±SEM ارائه شده‌اند و (n =۷).



نمودار ٤. مقایسهٔ آستانهٔ درد حرارتی در گروه شم و گروه‌های دریافت‌کنندهٔ دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت ندیده و عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیده طی آزمون Tail flick.

نتایج به‌صورت mean±SEM ارائه شده‌اند، (p<0.01 در مقایسه با گروه شم و عصاره‌های هیدروالکلی) و (n =۷).**

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017

بحث

یافته‌های حاصل از این مطالعه حاکی از آن بود که تجویز درون‌صفاقی دوز ۵۰mg/kg عصارهٔ هگزانی گل‌های حرارت‌دیدهٔ گیاه شاهدانه در مقایسه با عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده آن، منجر به کاهش شدت درد در فاز اول و دوم آزمون فرمالین و کاهش آستانهٔ درد حرارتی طی آزمون Tail flick گردید.

ازآنجاکه انواع مختلف درد توسط فیبرهای عصبی حاضر در گانگلیون ریشهٔ پشتی نخاع حس شده و به سیستم عصبی مرکزی منتقل می‌شود، فیبرهای Aδ (حامل اطلاعات مربوط به گیرنده‌های درد حرارتی و مکانیکی) و فیبرهای C (حامل اطلاعات محرک‌های شدید مکانیکی و شیمیایی و یا حرارتی) اصلی‌ترین مسیرهای انتقال درد می‌باشند (۱۳). مطالعات زیادی نقش سیستم اندوکانابینوئیدی را در تسکین درد نشان می‌دهند (۲۱و٦). علاوه‌براین، تحقیقات زیادی، نشان از حضور گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و غیرکانابینوئیدی TRPV1 در نواحی مختلفی شامل مادهٔ خاکستری اطراف قنات سیلویوس و گانگلیون ریشهٔ پشتی نخاع از سیستم عصبی مرکزی و محیطی دارد که در کنترل درد مشارکت دارند (۲۱). کانابینوئیدهای طبیعی دارای گروه کربوکسیلیکی چون سالیسیلیک اسید می‌باشند که در اثر حرارت و با خروج گاز دی‌اکسیدکربن دکربوکسیله می‌گردند و معمولاً فرم دکربوکسیله را به‌عنوان فرم فعال آن می‌دانند؛ به‌عنوان‌مثال، می‌توان به THCA و CBDA اشاره کرد که در اثر حرارت به‌ترتیب به THC و CBD تبدیل می‌گردند (۲۲).

مقایسهٔ نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه‌های دریافت‌کنندهٔ دوزهای مختلف عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیدهٔ گیاه شاهدانه نشان داد که دوز ۱mg/kg منجر به افزایش شدت درد شیمیایی در آغاز فاز التهابی آزمون فرمالین گردید، این یافته احتمالاً ناشی از اثر مهاری دوزهای کم‌عصاره و کانابینوئیدها بر گیرندهٔ CB2 می‌باشد، این نتیجه می‌تواند زمینه‌ای را برای بررسی بیشتر اثر دوزهای بسیار پایین عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیدهٔ گیاه شاهدانه بر درد، ایجاد نماید.

ازطرف دیگر، اگر به تفاوت اثر دوز ۵۰mg/kg دو عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیدهٔ گیاه شاهدانه بر فاز اول و دوم درد شیمیایی توجه شود، مشخص می‌گردد که عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، بیشترین اثر کاهشی خود را در فاز اول (نوروژنیک) آزمون فرمالین اعمال نموده، این درحالی است که عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده، اثر کاهشی بیشتری را بر فاز دوم (التهابی) آزمون فرمالین اعمال می‌کند. احتمالاً علت این اثرِ عصارهٔ هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده را می‌توان در ساختار کانابینوئیدهای طبیعی جست‌وجو نمود. نتایج تحقیقاتی که به‌بررسی تأثیر کانابینوئیدهای کربوکسیله و دکربوکسیله بر آنزیم‌های COX پرداخته‌اند، حاکی از آن بودند که کانابینوئیدهای کربوکسیله، به‌ویژه ترکیب CBDA در دوزهای زیاد اثر مهاری قدرتمندی را بر آنزیم‌های COX1 و 2 اعمال می‌کنند (۲۳و۲۲). داروهایی نظیر آسپرین که جزء مشتقات سالیسیلات داروهای غیراستروئیدی ضدالتهابی هستند نیز به‌واسطهٔ داشتن گروه کربوکسیلیک اسیدی همچون سالیسیلیک اسید، هر دو آنزیم COX را مهار می‌نمایند. این احتمال نیز وجود دارد که حضور گروه سالیسیلیک اسید در ساختمان THCA و CBDA موجب ایجاد شباهت ساختاری این ترکیبات با NSAIDs شده که منجر به اعمال اثر مهاری بر آنزیم‌های سیکلواکسیژناز می‌گردد (۲۲). دراین میان، CBDA در مقایسه با THCA و سایر ترکیبات کانابینوئیدی به‌صورت قدرتمندی آنزیم‌های سیکلواکسیژناز را مهار می‌کند (۲۳). احتمالاً علت این اثر مهاری مربوط به کل ساختار CBDA و حضور عامل Resorcinol در آن است (۲۲). ازطرفی، احتمالاً عصارهٔ

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017

هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده حاوی کانابینوئیدهای کربوکسیله نیز ازطریق سرکوب عوامل التهابی مؤثر بر گیرنده‌ها و مسیر درد، توانسته است فاز التهابی درد را طی آزمون فرمالین کاهش دهد؛ پس نمی‌توان کانابینوئیدهای کربوکسیله را کاملاً غیرفعال دانست.

عصاره‌های هیدروالکلی و هگزانی گل‌های حرارت‌دیدهٔ گیاه شاهدانه دارای کانابینوئیدهای دکربوکسیله می‌باشند؛ اما باتوجه‌به اثر قابل‌توجه عصارهٔ هگزانی بر فاز اول و دوم درد شیمیایی و آستانهٔ درد حرارتی، می‌توان بیان نمود که هگزان ازطرفی توانسته است به‌عنوان یک حلال غیرقطبی، مؤثرتر و بهتر از حلال هیدروالکلی عمل نموده و مقادیر بیشتری از کانابینوئیدهای دکربوکسیلهٔ غیرقطبی را از گیاه استخراج نماید و ازطرف دیگر، ترکیبات دیگری از قبیل کلروفیل را از گیاه استخراج نمی‌کند (۱۸).

ازآنجاکه نواحی مادهٔ خاکستری اطراف قنات مغزی و به‌ویژه بخش رسترال شکمی- میانی بصل‌النخاع که به‌طور مستقیم با شاخ پشتی نخاع در تماس است، با آزادسازی میانجی‌های گلوتامات و گاماآمینوبوتیریک اسید در پردازش حس درد نقش کلیدی دارند. همچنین در مسیرهای درد و نواحی یادشده، علاوه‌بر گیرنده‌های اپیوئیدی، گیرنده‌های CB1 و TRPV1 نیز حضور و با یکدیگر برهم‌کنش دارند (۲٤). احتمالاً کانابینوئیدهای دکربوکسیله و در رأس آن‌ها THC و CBD در قیاس با کانابینوئیدهای کربوکسیله، تمایل اتصالی بیشتری را به گیرنده‌های کانابینوئیدی و غیرکانابینوئیدی موجود در مسیرها و مراکز درد از خود نشان داده و اثرات ضد دردیِ خود را از راه‌های مختلفی اعمال می‌نمایند. ازاین‌میان، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: کانابینوئیدهای کربوکسیله با اتصال به گیرندهٔ CB1 موجب تسکین درد حاد می‌گردند (۲۵)، ازطرفی، اتصال کانابینوئیدهایی همچون THC به گیرنده‌های CB2 می‌تواند منجر به کاهش دردهای التهابی گردد (۲٦)، همچنین کانابینوئیدها با اتصال به گیرنده‌های TRPV1 قادرند آن‌ها را غیرحساس کنند (۲٤). علاوه‌بر موارد ذکرشده، تحقیقات دیگر نشان دادند که کانابینوئیدهایی همچون CBD می‌توانند با مهار بازجذب و آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ کانابینوئیدهای درون‌زاد، سطح آن‌ها به‌ویژه AEA را در بدن افزایش داده و از این طریق نیز سیستم اندوکانابینوئیدی را در جهت سرکوب درد فعال نمایند (۲۵).

درمجموع، یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تغییر ساختار کانابینوئیدها در اثر حرارت می‌تواند منجر به تغییر تمایل اتصال آن‌ها به گیرنده‌ها و درنهایت تغییر اثرات فیزیولوژیکی آن‌ها بر درد گردد. همچنین مشخص شد که باتوجه‌به غیرقطبی‌بودن کانابینوئیدهای کربوکسیله، حلال هگزانی می‌تواند مقادیر بیشتری از کانابینوئیدها را از گیاه شاهدانه استخراج نماید و عصاره‌هایی که ازاین‌روش تهیه می‌گردد، اثربخشی بیشتری در کاهش درد دارند.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از دانشگاه فردوسی مشهد به‌منظور پشتیبانی از پروژهٔ مرتبط با این مقاله، تقدیر و تشکر به‌عمل می‌آید. همچنین از جناب آقای دکتر علی شیری عضو هیئت علمی گروه شیمی دانشگاه فردوسی مشهد جهت راهنمایی در بخش عصاره‌گیری، تقدیر می‌گردد.

منابع

1. Cavuoto P, Wittert GA. The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy expenditure. Best practice & research, Clinical endocrinology & metabolism 2009;23(1):79-86.
2. Haj-Dahmane S, Shen RY. Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling. Neuropharmacology 2011;61(3):414-20.
3. Gyombolai P, Pap D, Turu G, Catt KJ, Bagdy G, Hunyady L. Regulation of endocannabinoid release by G proteins: a paracrine mechanism of G protein-coupled receptor action. Molecular and cellular endocrinology 2012;353(1-2):29-36.
4. Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. Pharmacology & therapeutics 2010;126(1):21-38.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017

5. Parolaro D, Realini N, Vigano D, Guidali C, Rubino T. The endocannabinoid system and psychiatric disorders. Experimental neurology 2010;224(1):3-14.
6. Nicolussi S, Viveros-Paredes JM, Gachet MS, Rau M, Flores-Soto ME, Blunder M, et al. Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. Pharmacological research 2014;80:52-65.
7. Sharkey KA, Darmani NA, Parker LA. Regulation of nausea and vomiting by cannabinoids and the endocannabinoid system. European journal of Pharmacology 2014;722:134-46.
8. Horváth B, Mukhopadhyay P, Haskó G, Pacher P. The endocannabinoid system and plant-derived cannabinoids in diabetes and diabetic complications. The American journal of pathology 2012;180(2):432-42.
9. Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The pharmacologic and clinical effects of medical cannabis. Pharmacotherapy 2013;33(2):195-209.
10. Svízenská I, Dubový P, Sulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. Pharmacology, biochemistry, and behavior 2008;90(4):501-11.
11. Nithipatikom K, Isbell MA, Endsley MP, Woodliff JE, Campbell WB. Anti-proliferative effect of a putative endocannabinoid, 2-arachidonylglyceryl ether in prostate carcinoma cells. Prostaglandins & other lipid mediators 2011;94(1-2):34-43.
12. Sidhpura N, Parsons LH. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior. Neuropharmacology 2011;61(7):1070-87.
13. Bussone G, Grazzi L, Panerai AE. Pain, emotion, headache. Headache 2012;52(Suppl 2):98-101.
14. Brower V. New pain drugs in pipeline, but challenges to usage remain. Journal of the National Cancer Institute 2012;104(7):503-5.
15. Hornby AP, Sharma M, Stegman B. Standardized natural product cannabis in pain management and observations at a Canadian compassion society: a case report. Cases journal 2009;2:7487.
16. Mander L, Liu HW. Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology. Elsevier. 2010; 1033–1084.
17. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain 1983;16(2):109-10.
18. Samsam shariat SH. Extraction of effective components of herbal medicine, determination and evaluation methods, Mani Press. Esfahan. Iran. 1371; p. 12-13. [Persian]
19. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. Pain 1992;51(1):5-17.
20. D'Amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 1941;72:74–8.
21. Galdino G, Romero TR, Silva JF, Aguiar DC, de Paula AM, Cruz JS, et al. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. Neuropharmacology 2014;77:313-24.
22. Takeda S, Misawa K, Yamamoto I, Watanabe K. Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis. Drug metabolism and disposition 2008;36(9):1917-21.
23. Ruhaak LR, Felth J, Karlsson PC, Rafter JJ, Verpoorte R, Bohlin L. Evaluation of the cyclooxygenase inhibiting effects of six major cannabinoids isolated from Cannabis sativa. Biological & pharmaceutical bulletin 2011;34(5):774-8.
24. Maione S, Piscitelli F, Gatta L, Vita D, De Petrocellis L, Palazzo E, et al. Non-psychoactive cannabinoids modulate the descending pathway of antinociception in anaesthetized rats through several mechanisms of action. British journal of pharmacology 2011;162(3):584-96.
25. Cox ML, Haller VL, Welch SP. The antinociceptive effect of Delta9-tetrahydrocannabinol in the arthritic rat involves the CB (2) cannabinoid receptor. European journal of pharmacology 2007;570(1-3):50-6.
26. Craft RM, Kandasamy R, Davis SM. Sex differences in anti-allodynic, anti-hyperalgesic and anti-edema effects of Δ(9)-tetrahydrocannabinol in the rat. Pain 2013;154(9):1709-17.
27. Bisogno T, Hanus L, De Petrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, et al. Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. British journal of pharmacology 2001;134(4):845-52.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 7:37 IRST on Tuesday September 26th 2017

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
23th Year, No.121
February-March 2016

Received: 20/01/2016
Last revised: 22/02/2016
Accepted: 02/03/2016

The effect of intraperitoneal administration of hydroalcoholic extracts of heated and unheated and hexanic extract of heated *Cannabis sativa* flowers on pain in rats

Bahram Farhadi Moghadam[1], Masoud Fereidoni[2*], Ali Asadollahi[3]

1. M.Sc Student in Biology (Animal Physiology), Rayan Center for Neuroscience and Behavior, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Associate Professor, Rayan Center for Neuroscience and Behavior, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Assistant Professor, Rayan Center for Neuroscience and Behavior, Department of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

***Corresponding Author e-mail: fereidoni@um.ac.ir**

Abstract

Background and Objective: *Cannabis sativa* can produce phytocannabinoids such as tetrahydrocannabinolic acid and cannabidiolic acid, they are of the most important of these compounds that affect the endocannabinoid system and result in nervousness, epilepsy and nausea. This research was to investigate effects of hexanic and hydroalcoholic extracts of female *Cannabis sativa* flowers which have the maximum amount of cannabinoids, on thermal and chemical pains. In addition, the effect of heat on physiological effects of phytocannabinoids on pain was examined.

Materials and Methods: In this experimental study, male Wistar rats (200-250g) were categorized into control, sham, hydro-alcoholic extract of heated flowers in 1, 10 and 50 mg/kg doses, hydro-alcoholic extract of unheated flowers in 50 mg/kg dose and hexanic extract of heated flower in 50 mg/kg dose groups. In order to evaluate the chemical pain, formalin test was used and to investigate thermal pain, tail flick test was performed.

Results: Intraperitoneal injection of 50 mg/kg hexanic extract of heated flowers respect to other extracts exerted a significant reduction on first and second phases of formalin test and threshold of thermal pain.

Conclusion Decarboxylated cannabinoids, which are extracted in more amounts by hexane, probably have more affinities to CB1 and TRPV1 receptors of pain pathway and respectively cause release of mediators involved in process of pain and making pain receptors non-sensitive. They also inhibit factors involved in severance of endocannabinoids.

Keywords: *Cannabis sativa*, Endocannabinoid system, Pain, Formalin test, Tail flick

Daneshvar(medicine) shahed University/ 23th year/2016 /NO.121