

## اثر تجویز درون صفاقی عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده و عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده پایه ماده گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa*) بر درد در موش صحرایی

نویسندگان: بهرام فرهادی مقدم<sup>۱</sup>، مسعود فریدونی<sup>۲\*</sup>، علی اسداللهی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۲. دانشیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
۳. استادیار مرکز تحقیقات علوم اعصاب و رفتار رایان، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

E-mail: fereidoni@um.ac.ir

\* نویسنده مسئول: مسعود فریدونی

### چکیده

مقدمه و هدف: گیاه شاهدانه منبع کانابینوئیدهای گیاهی است و از مهم‌ترین این ترکیبات می‌توان به اندوکانابینوئیدی، اثراتی را بر اضطراب، صرع و تهوع دارند. این تحقیق به بررسی اثرات تجویز داخل صفاقی عصاره‌های هیدروالکلی و هگزانی پایه ماده شاهدانه که دارای حداکثر کانابینوئیدهاست، بر درد حرارتی و شیمیایی پرداخته است. علاوه بر این، تأثیر عامل حرارت نیز بر اثرات فیزیولوژیک این کانابینوئیدهای گیاهی بر درد مورد آزمایش قرار گرفته است.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (۲۵۰ تا ۲۰۰ گرم) در گروه‌های کنترل، شم، عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده با دوزهای ۵۰، ۱۰ و ۱، عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده با دوز ۵۰ mg/kg و عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده با دوز ۵۰ mg/kg دسته‌بندی شدند. برای سنجش شدت درد شیمیایی، از آزمون فرمالین و برای سنجش آستانه درد حرارتی، از آزمون Tail flick استفاده گردید.

**نتایج:** تجویز درون صفاقی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده در مقایسه با سایر عصاره‌ها، اثر کاهشی بسیار قابل توجهی بر فاز اول و دوم آزمون فرمالین و بر آستانه درد حرارتی داشت.

**نتیجه‌گیری:** احتمالاً کانابینوئیدهای دکربوکسیله که توسط هگزان به میزان بیشتری استخراج می‌گردند، تمایل انحصاری به گیرنده‌های CB1 و TRPV1 در مسیر درد دارند و به ترتیب، موجب مهار آزدسازی میانجی‌های مؤثر بر پردازش درد و غیرحساس نمودن گیرنده‌های مسیر درد می‌گردند، همچنین موجب مهار عوامل تجزیه‌گر کانابینوئیدهای درون‌زاد نیز می‌شوند.

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

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست‌وسوم-شماره ۲۱  
اسفند ۱۳۹۴

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

## مقدمه

اشاره کرد (۲۰۰۴). سومین بخش از سیستم اندوکannabinoidی، پروتئین‌های مسئول تولید، انتقال و تجزیه کannabinoidها، به‌عنوان مثال، دو آنزیم Fatty acid Monoacylglycerol و (FAAH) amide hydrolase که به ترتیب مسئول تجزیه AEA و 2-AG می‌باشد (۱۱). کannabinoidها، از نظر محل تولید به دو دسته درون‌زاد و برون‌زاد تقسیم‌بندی می‌شوند که کannabinoidهای گیاهی (طبیعی) از نوع برون‌زاد آن‌ها هستند و در گیاه شاهدانه به وفور یافت می‌شوند. دو ترکیب Tetrahydrocannabinol و Cannabidiol از اصلی‌ترین این کannabinoidها در گیاه شاهدانه هستند (۱۰ و ۱۲). از آنجاکه 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 (۱۴). باتوجه‌به مطالب مطرح شده، هدف از این تحقیق بررسی اثرات ناشی از فعال‌سازی سیستم اندوکannabinoidی توسط کannabinoidهای گیاهی بر آستانه درد حرارتی و شدت درد شیمیایی می‌باشد و بدین منظور، از گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه که دارای حداکثر میزان کannabinoidهای گیاهی است (۱۵) عصاره‌گیری و استفاده گردید. همچنین در فرایند عصاره‌گیری به‌منظور یافتن حلال مناسب برای استخراج بیشترین مقدار از کannabinoidها، باتوجه‌به ساختار مولکولی آن‌ها از دو نوع حلال هگزان و هیدروالکلی استفاده شد و باتوجه‌به تغییر ساختار کannabinoidهای گیاهی در اثر حرارت (۱۶)، تأثیر عامل حرارت نیز بر اثرات فیزیولوژیک کannabinoidها بر درد، مورد بررسی قرار گرفت.

سیستم اندوکannabinoidی، 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 (۲ و ۳). مفهوم این سیستم در سال ۱۹۹۵ پایه‌ریزی شد (۴). این سیستم شامل کannabinoidهای درون‌زاد می‌باشد که دو ترکیب مهم آن‌ها 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) و N-Arachidonyl ethanolamine (Anandamid, AEA) است که به‌صورت اتوکراین و پاراکراین هستند و بر گیرنده‌های کannabinoidی و غیرکannabinoidی غشاء تأثیر می‌گذارند (۵ و ۶). یکی دیگر از بخش‌های سیستم اندوکannabinoidی، گیرنده‌های کannabinoidی CB1 و CB2 متصل به G-پروتئین‌ها هستند و در اثر اتصال کannabinoidها، فعال شده و موجب مهار آنزیم آدنیل سیکلاز 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 در مجموع به کاهش تحریک‌پذیری سلول و آزادسازی میانجی‌های عصبی منتج می‌گردد (۷). از نظر نحوه پراکنش، گیرنده CB1 به‌طور غالب در سیستم عصبی مرکزی و CB2 به‌عنوان گیرنده محیطی کannabinoidی در بافت‌هایی همچون بافت لنفونیدی، سلول‌های خون‌ساز، سیستم ایمنی و در بعضی نورون‌ها حضور دارند (۸ و ۹) و در تعدیل آزادسازی سیتوکاین‌ها و پاسخ ایمنی به التهاب نقش دارند (۱۰ و ۱۱). لازم به ذکر است که گیرنده‌های غیرکannabinoidی نیز هستند که کannabinoidها می‌توانند با اتصال به آن‌ها، برخی از اثرات خود را بروز دهند (۱۰). این گیرنده‌ها شامل کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار (TRPV1) و گیرنده‌هایی که در واقع، فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌های گیرنده هسته‌ای هستند که از این گروه می‌توان به GPR55 و GPR119

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن در محدوده ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم که در حیوان‌خانه گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط استاندارد با درجه حرارت ۲۱°C، رطوبت ۵۰٪ و سیکل نوری ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی و با امکان دسترسی نامحدود به آب و غذا، نگهداری شدند، در گروه‌های ۷ تایی شامل گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه شم (دریافت‌کننده حلال شامل ترکیب اتانول، توئین ۸۰ و سالیین به ترتیب با نسبت‌های ۱:۱:۸)، گروه‌های دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده با دوزهای ۵۰ mg/kg و ۱۰ و ۱، گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده و گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ mg/kg عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده استفاده گردید. تمامی تجویزها به صورت درون‌صفافی بود و کلیه مراحل آزمایشها تحت مقررات بین‌المللی رعایت حقوق حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت (۱۷). در این مطالعه، ابتدا دوزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده تجویز شد و پس از مشخص شدن دوز ۵۰ mg/kg به عنوان مؤثرترین دوز، به منظور مقایسه اثر عصاره‌ها بر درد، در گروه‌های دیگر فقط دوز ۵۰ mg/kg عصاره‌ها تجویز شد.

## عصاره‌گیری

گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه که توسط آزمایشگاه بیوسیستماتیک گیاهی تهیه و با کد هر بار یومی ۴۴۶۹۰ توسط پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی تأیید و نگهداری شده بود، برای عصاره‌گیری استفاده گردید. ابتدا گل‌ها عاری از برگ و ساقه شده و جهت خشک کردن در مکانی تاریک و خشک به مدت دو هفته نگهداری شدند و سپس برای هر عصاره‌گیری مقدار ۵۰ گرم از ماده خشک مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده، ماده خشک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتی‌گراد در آون

حرارت داده شد و سپس با هگزان و روش ماسراسیون (خیساندن) (۱۸) عصاره‌گیری و سپس توسط کاغذ صافی، صاف گردید. برای تهیه عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، ماده خشک پس از حرارت دیدن، با استفاده از اتانول ۷۰٪ به روش خیساندن عصاره‌گیری شد و به منظور تهیه عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده، به جز حرارت دیدن، سایر موارد ذکر شده انجام گرفت. پس از عصاره‌گیری، حلال‌ها به طور کامل تبخیر شدند.

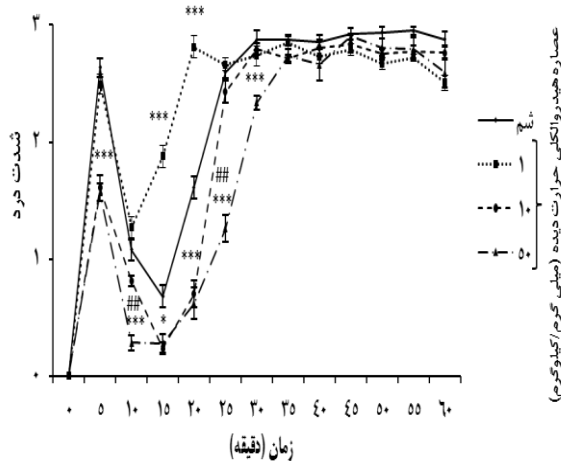
## آزمون فرمالین

به منظور سنجش شدت درد شیمیایی از آزمون فرمالین استفاده گردید. بدین صورت که پس از گذشت ۳۰ دقیقه از هر تجویز درون‌صفافی، محلول فرمالین ۲/۵٪ به میزان ۰/۰۵ سی‌سی به کف پای حیوان تزریق شد و رفتار حیوان به مدت ۶۰ دقیقه، هر ۱۵ ثانیه یک بار مورد بررسی و ثبت قرار گرفت. پاسخ رفتاری در جواندگان طی آزمون فرمالین، دومرحله‌ای است. درد در مرحله اول (فاز نوروزنیک) وابسته به مکانیسم‌های نوروزنیک است و پاسخ درد در این مرحله، ناشی از تحریک مستقیم فرمالین بر روی پایانه‌های عصبی محیطی می‌باشد که در ۵ تا ۱۰ دقیقه اول تزریق رخ می‌دهد؛ درحالی‌که در مرحله دوم، پاسخ درد در نتیجه التهاب و آزاد شدن میانجی‌های التهابی بروز می‌کند (فاز التهابی) که تقریباً از دقیقه ۲۰ شروع شده و گاهی تا ۶۰ دقیقه به طول می‌انجامد. همچنین می‌توان شدت درد را در این آزمون به صورت کمیتی از صفر تا ۳ درجه بندی کرد، به طوری که 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 به شدت تکان می‌دهد، گاز می‌گیرد یا لیس می‌زند (۱۹).

## آزمون Tail flick

برای سنجش آستانه درد حرارتی در موش صحرایی

گروه شم ( $p < 0.001$ ) و سایر گروه‌ها ( $p < 0.01$ ) کاهش معنی‌داری یافت (نمودار ۱).



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

نتایج به صورت  $mean \pm SEM$  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 ( $n = 7$ ).

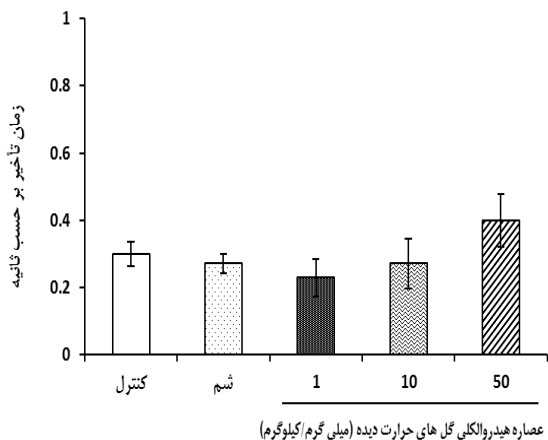
همچنین مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین پس از تجویز درون صفاقی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده و عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده و گروه شم، حاکی از آن بود که عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده نیز همچون عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده باعث کاهش شدت درد شیمیایی در هر دو فاز آزمون فرمالین شد ( $p < 0.05$ )، اما عصاره 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).

از آزمون Tail flick استفاده گردید. این آزمون، اولین بار توسط Smith و D'Amour (۱۹۴۱) معرفی شد. در این آزمون، حیوان در رستریز (تیوب محدودکننده) قرار گرفت، به صورتی که دم آن بیرون باشد. شدت نور دستگاه Tail flick (Sparco، ایران) طوری تنظیم گردید که زمان متوسط پاسخ‌دهی پایه، بین ۶ تا ۸ ثانیه باشد و زمان ۱۵ ثانیه نیز به عنوان زمان قطع تابش نور به یک سوم میانی دم حیوان (Cut of time) برای جلوگیری از هرگونه ایجاد آسیب بافتی، در نظر گرفته شد. زمان پاسخ‌دهی، قبل و ۳۰ دقیقه پس از تجویز درون صفاقی عصاره‌ها اندازه‌گیری شد، این زمان حاصل میانگین سه بار اندازه‌گیری متوالی با فواصل یک دقیقه‌ای بود و این میانگین به عنوان آستانه درد (Tail flick latency) در نظر گرفته شد (۲۰).

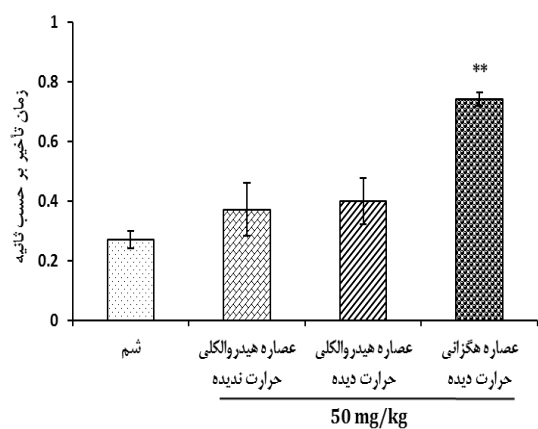
داده‌ها به صورت  $mean \pm SEM$  ارائه شدند. معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism 6 و به دنبال آن مقایسه میانگین‌ها با آزمون T-Student-Neumann-keuls و با حداقل سطح معنی‌داری  $p < 0.05$  برآورد شدند.

## نتایج

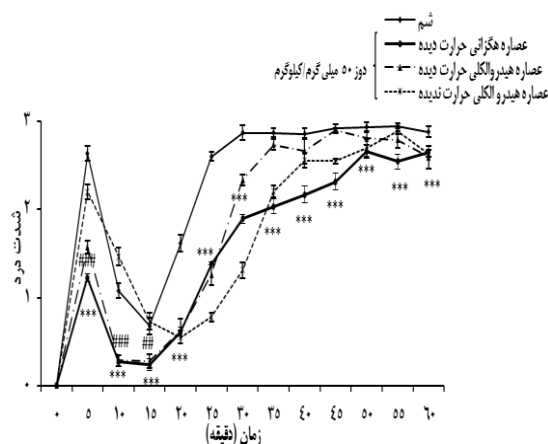
مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه کنترل و شم حاکی از عدم تأثیرگذاری تجویز حلال در هر دو فاز آزمون فرمالین بود. از طرفی مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین پس از تجویز درون صفاقی دوزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده با گروه شم نشان داد که تجویز دوز ۱ mg/kg منجر به افزایش قابل توجه شدت درد شیمیایی در دقایق اولیه فاز انتهایی آزمون فرمالین گردید ( $p < 0.001$ ). تجویز دوز ۱۰ mg/kg موجب کاهش قابل توجه شدت درد شیمیایی در فاز نوروژنیک و ابتدای فاز انتهایی آزمون فرمالین شد ( $p < 0.001$ ). به دنبال تجویز دوز ۵۰ mg/kg شدت درد شیمیایی در هر دو فاز نوروژنیک و انتهایی آزمون فرمالین در مقایسه با



نمودار ۳. مقایسه آستانه درد حرارتی در گروه کنترل، شم و گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۱، ۱۰ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده طی آزمون Tail flick. نتایج به صورت  $mean \pm SEM$  ارائه شده‌اند و ( $n = 7$ ).



نمودار ۴. مقایسه آستانه درد حرارتی در گروه شم و گروه‌های دریافت‌کننده دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت ندیده و عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده طی آزمون Tail flick. نتایج به صورت  $mean \pm SEM$  ارائه شده‌اند، در مقایسه با گروه شم و عصاره‌های هیدروالکلی و ( $p < 0.01$ ) و ( $n = 7$ ).



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

نتایج به صورت  $mean \pm SEM$  ارائه شده‌اند، در مقایسه با گروه شم و  $p < 0.001$  \*\*\* و در مقایسه با عصاره‌های هیدروالکلی و  $p < 0.001$  ### و ( $n = 7$ ).

از طرفی، بررسی نتایج حاصل از آزمون Tail flick به منظور سنجش آستانه درد حرارتی، نشان داد که تفاوت معنی‌داری در آستانه درد حرارتی بین گروه کنترل، شم و سایر گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای ۱ و ۱۰ میلی‌گرم/کیلوگرم عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده وجود نداشت (نمودار ۳). اما مقایسه نتایج حاصل از تجویز درون‌صفافی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده و عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده بر آستانه درد حرارتی، حاکی از آن بود که عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده، برخلاف دو عصاره دیگر، توانست اثر کاهشی قابل توجهی را بر آستانه درد حرارتی طی آزمون Tail flick اعمال نماید (نمودار ۴).

## بحث

CB2 می‌باشد، این نتیجه می‌تواند زمینه‌ای را برای بررسی بیشتر اثر دوزهای بسیار پایین عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده گیاه شاهدانه بر درد، ایجاد نماید.

از طرف دیگر، اگر به تفاوت اثر دوز 50mg/kg دو عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده گیاه شاهدانه بر فاز اول و دوم درد شیمیایی توجه شود، مشخص می‌گردد که عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، بیشترین اثر کاهشی خود را در فاز اول (نوروزنیک) آزمون فرمالین اعمال نموده، این درحالی است که عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده، اثر کاهشی بیشتری را بر فاز دوم (التهابی) آزمون فرمالین اعمال می‌کند. احتمالاً علت این اثر عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده را می‌توان در ساختار کانابینوئیدهای طبیعی جست‌وجو نمود. نتایج تحقیقاتی که به بررسی تأثیر کانابینوئیدهای کربوکسیله و دکربوکسیله بر آنزیم‌های COX پرداخته‌اند، حاکی از آن بودند که کانابینوئیدهای کربوکسیله، به‌ویژه ترکیب CBDA در دوزهای زیاد اثر مهاري قدرتمندی را بر آنزیم‌های COX1 و 2 اعمال می‌کنند (۲۳ و ۲۲). داروهایی نظیر آسپرین که جزء مشتقات سالیسیلات داروهای غیراستروئیدی ضدالتهابی هستند نیز به‌واسطه 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 مهاري بر آنزیم‌های سیکلواکسیژناز می‌گردد (۲۲). در این میان، CBDA در مقایسه با THCA و سایر ترکیبات کانابینوئیدی به‌صورت قدرتمندی آنزیم‌های سیکلواکسیژناز را مهار می‌کند (۲۳). احتمالاً علت این اثر مهاري مربوط به کل ساختار CBDA و حضور عامل Resorcinol در آن است (۲۲). از طرفی، احتمالاً عصاره

یافته‌های حاصل از این مطالعه حاکی از آن بود که تجویز درون‌صفافی دوز 50mg/kg عصاره هگزانی گل‌های حرارت‌دیده گیاه شاهدانه در مقایسه با عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و حرارت‌ندیده آن، منجر به کاهش شدت درد در فاز اول و دوم آزمون فرمالین و کاهش آستانه درد حرارتی طی آزمون Tail flick گردید.

از آنجا که انواع مختلف درد توسط فیبرهای عصبی حاضر در گانگلیون ریشه 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 اندوکانبینوئیدی را در تسکین درد نشان می‌دهند (۶ و ۲۱). علاوه بر این، تحقیقات زیادی، نشان از حضور گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و غیرکانابینوئیدی TRPV1 در نواحی مختلفی شامل ماده خاکستری اطراف قنات سیلویوس و گانگلیون ریشه 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؛ به‌عنوان مثال، می‌توان به THCA و CBDA اشاره کرد که در اثر حرارت به ترتیب به THC و CBD تبدیل می‌گردند (۲۲).

مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین بین گروه‌های دریافت‌کننده دوزهای مختلف عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده گیاه شاهدانه نشان داد که دوز 1mg/kg منجر به افزایش شدت درد شیمیایی در آغاز فاز التهابی آزمون فرمالین گردید، این یافته احتمالاً ناشی از اثر مهاري دوزهای کم عصاره و کانابینوئیدها بر گیرنده

کانابینوئیدهای کربوکسیله با اتصال به گیرنده CB1 موجب تسکین درد حاد می‌گردند (۲۵)، از طرفی، اتصال کانابینوئیدهایی همچون THC به گیرنده‌های CB2 می‌تواند منجر به کاهش دردهای التهابی گردد (۲۶). همچنین کانابینوئیدها با اتصال به گیرنده‌های TRPV1 قادرند آن‌ها را غیرحساس کنند (۲۴). علاوه بر موارد ذکر شده، تحقیقات دیگر نشان دادند که کانابینوئیدهایی همچون CBD می‌توانند با مهار بازجذب و آنزیم‌های تجزیه‌کننده 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).

در مجموع، یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که تغییر ساختار کانابینوئیدها در اثر حرارت می‌تواند منجر به تغییر تمایل اتصال آن‌ها به گیرنده‌ها و در نهایت تغییر اثرات فیزیولوژیکی آن‌ها بر درد گردد. همچنین مشخص شد که با توجه به غیرقطبی بودن کانابینوئیدهای کربوکسیله، حلال هگزانی می‌تواند مقادیر بیشتری از کانابینوئیدها را از گیاه شاهدانه استخراج نماید و عصاره‌هایی که از این روش تهیه می‌گردد، اثربخشی بیشتری در کاهش درد دارند.

#### تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه فردوسی مشهد به‌منظور پشتیبانی از پروژه 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.

هیدروالکلی گل‌های حرارت‌ندیده حاوی کانابینوئیدهای کربوکسیله نیز از طریق 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 حرارت‌دیده گیاه شاهدانه دارای کانابینوئیدهای دکربوکسیله می‌باشند؛ اما با توجه به اثر قابل توجه عصاره هگزانی بر فاز اول و دوم درد شیمیایی و آستانه درد حرارتی، می‌توان بیان نمود که هگزان از طرفی توانسته است به‌عنوان یک حلال غیرقطبی، مؤثرتر و بهتر از حلال هیدروالکلی عمل نموده و مقادیر بیشتری از کانابینوئیدهای دکربوکسیله غیرقطبی را از گیاه استخراج نماید و از طرف دیگر، ترکیبات دیگری از قبیل کلروفیل را از گیاه استخراج نمی‌کند (۱۸).

از آنجا که نواحی ماده خاکستری اطراف قنات مغزی و به‌ویژه بخش رسترا ل شکمی - میانی بصل النخاع که به‌طور مستقیم با شاخ پشتی نخاع در تماس است، با آزادسازی میانجی‌های گلوتامات و گاما آمینوبوتیریک اسید در پردازش حس درد نقش کلیدی دارند. همچنین در مسیرهای درد و نواحی یادشده، علاوه بر گیرنده‌های اپیوئیدی، گیرنده‌های CB1 و TRPV1 نیز حضور و با یکدیگر برهم‌کنش دارند (۲۴). احتمالاً کانابینوئیدهای دکربوکسیله و در رأس آن‌ها THC و CBD در قیاس با کانابینوئیدهای کربوکسیله، تمایل اتصال بیشتری را به گیرنده‌های کانابینوئیدی و غیرکانابینوئیدی موجود در مسیرها و مراکز درد از خود نشان داده و اثرات ضد دردی خود را از راه‌های مختلفی اعمال می‌نمایند. از این میان، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

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-arachidonylethanolamide, 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, Hunnskaar 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  $\Delta(9)$ -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.



## 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<sup>1</sup>, Masoud Fereidoni<sup>2\*</sup>, Ali Asadollahi<sup>3</sup>

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