

Original Article

Involvement of Vanilloid Receptors in the Anti-inflammatory Effect of Hydroalcoholic Extract of Heated Female Cannabis sativa Flowers in Rat

Masoud Fereidoni^{1*}, Bahram Farhadi Moghaddam², Keyhan Farhadi Moghaddam³

¹Department of Biology,
Faculty of Science, Ferdowsi
University of Mashhad,
Mashhad, Iran.

²Faculty of Medicine,
Zahedan University of
Medical Sciences; Zahedan,
Iran.

***Corresponding Author:**
Masoud Fereidoni,
Department of Biology,
Faculty of Sciences,
Ferdowsi University of
Mashhad, Mashhad, Iran.

Email:
fereidoni@um.ac.ir

Received: 16 Apr, 2015

Accepted: 9 Sep, 2015

Abstract

Background and Objectives: Decarboxylated phytocannabinoids activate endocannabinoid system in the central nervous system and peripheral tissues via activation of cannabinoid receptors. In this investigation, the effect of interaction between decarboxylated phytocannabinoids and capsaicin at the central level and naloxone at the systemic level, was investigated on inflammatory rat paw edema induced by sub-plantar injection.

Methods: In this experimental study, male Wistar rats (200-250g) were used. To study the effect of interaction with opioid system, intraperitoneal administration of hydroalcoholic extract (dose, 50mg/kg), naloxone (dose, 2mg/kg) and co-administration of the extract and naloxone were performed. To investigate the effect of interaction with vanilloid system, intrathecal administration of extract (0.01mg/10µl), capsaicin (0.002mg/10µl) and co-administration of extract and capsaicin were performed. Paw volume was measured before and one hour after sub-plantar administration of formalin using plethysmometer method in order to assess inflammatory edema.

Results: Intraperitoneal administration of extract alone or in combination with naloxone reduced the inflammatory rat paw edema volume ($p < 0.001$). On the other hand, capsaicin increased rat paw edema volume ($p < 0.01$), but intrathecal administration of extract alone and in combination with capsaicin decreased the inflammatory rat paw edema volume ($p < 0.01$).

Conclusion: The results of this study showed that decarboxylated cannabinoids in hydroalcoholic extract decrease the capsaicin-induced inflammatory rat paw edema through activation of CB1 and CB2 receptors and desensitization of TRPV1 receptor. On the contrary, administration of naloxone has not antagonized the reduction effect of extract on inflammatory paw edema, and it is likely that the effect of the extract has not exerted through opioid receptors.

Keywords: *Cannabis sativa*; Receptors, Cannabinoid; Naloxone; Capsaicin.

درگیری گیرنده‌های وانیلوئیدی در خاصیت ضدالتهابی عصاره هیدروالکلی گل‌های
حرارت‌دیده پایه ماده گیاه شاهدانه در موش صحراییمسعود فریدونی^{۱*}، بهرام فرهادی‌مقدم^۲، کیهان فرهادی‌مقدم^۲

چکیده

زمینه و هدف: کانابینوئیدهای گیاهی دکربوکسیله با فعال‌سازی گیرنده‌های سیستم اندوکانابینوئیدی در سطح سیستم عصبی مرکزی و بافت‌های محیطی، این سیستم را فعال می‌کنند. در این تحقیق اثر برهمکنش کانابینوئیدهای گیاهی دکربوکسیله با کپسایسین در سطح مرکزی و نالوکسان در سطح سیستمیک بر حجم ادم التهابی پا ناشی از تزریق کف پای فرمالین بررسی شد. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر بالغ نژاد ویستار (۲۵۰-۲۰۰ گرم) استفاده گردید. برای بررسی اثر برهمکنش با سیستم اویوئیدی، عصاره هیدروالکلی گیاه (دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم)، نالوکسان (دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم) و همزمان عصاره و نالوکسان به صورت درون صفاقی تجویز شدند، برای بررسی اثر برهمکنش با سیستم وانیلوئیدی، عصاره (دوز ۰/۰۱ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر)، کپسایسین (دوز ۰/۰۰۲ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر) و همزمان عصاره و کپسایسین به صورت نخاعی تجویز شدند. حجم پا قبل از تجویز و یک ساعت پس از تزریق کف پای فرمالین، به روش پلتیسومتری برای سنجش میزان ادم التهابی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: تجویز درون صفاقی عصاره به تنهایی و همراه با نالوکسان، حجم ادم التهابی پا را کاهش داد ($p < 0/001$). از طرفی، کپسایسین منجر به افزایش حجم ادم التهابی شد ($p < 0/01$)، اما تجویز نخاعی عصاره به تنهایی و همراه با کپسایسین، حجم ادم التهابی پا را کاهش داد ($p < 0/01$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد کانابینوئیدهای دکربوکسیله موجود در عصاره هیدروالکلی با فعال کردن گیرنده‌های CB1 و CB2 و غیرحساس نمودن گیرنده TRPV1، افزایش ادم التهابی ناشی از کپسایسین را کاهش می‌دهند. در مقابل، تجویز نالوکسان اثر کاهشی عصاره را بر ادم التهابی پا آنتاگونیست نکرده، و این احتمال وجود دارد که تأثیر عصاره، از مسیر گیرنده‌های اپیوئیدی اعمال نشده باشد.

کلیدواژه‌ها: شاهدانه؛ گیرنده‌های کانابینوئیدی؛ نالوکسان؛ کپسایسین.

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم،
دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

^۲دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم
پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

مسعود فریدونی، گروه زیست‌شناسی،
دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد،
مشهد، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

fereidoni@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۸

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Fereidoni M, Farhadi Moghaddam B, Farhadi Moghaddam K. Involvement of vanilloid receptors in the Anti-inflammatory effect of hydroalcoholic extract of heated female *Cannabis sativa* flowers in rat. Qom Univ Med Sci J 2016;10(3):10-18.[Full Text in Persian]

کانابینوئیدهای گیاهی، گروهی از کانابینوئیدها هستند که به میزان زیادی در گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه تولید می‌شوند و اصلی‌ترین آنها THCA (Tetrahydrocannabinolic Acid) و CBDA (Cannabidiolic Acid) می‌باشد (۱). این ترکیبات غیرقطبی در گیاه به فرم کربوکسیلیک اسید تولید می‌شوند (۲). کانابینوئیدها اثرات خود را با فعال کردن سیستم اندوکانابینوئیدی از طریق اتصال به گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2، همچنین اتصال به گیرنده‌های غیرکانابینوئیدی TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1) و PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) GPR119, GPR55 (Orphan G Protein Coupled Receptor) اعمال می‌کنند (۳،۴). یافته‌های حاصل از تحقیقات پیشین، بیانگر حضور و فعالیت سیستم اندوکانابینوئیدی در سطح سیستم عصبی مرکزی (۴،۵) و اعمال اثرات فیزیولوژیکی این سیستم، هم به‌صورت مستقیم و هم در برهمکنش با سایر سیستم‌ها از قبیل سیستم‌های اپیوئیدی (۶)، وانیلوئیدی (۷)، سروتونینی (۸) و دوپامینی (۹) می‌باشد. با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر و نتایج پژوهش پیشین در مورد اثر تجویز درون صفاقی عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و گل‌های حرارت‌ندیده پایه ماده گیاه شاهدانه بر ادم التهابی پا ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین، این فرضیه مطرح است که تجویز نخاعی عصاره هیدروالکلی گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه ممکن است موجب کاهش حجم ادم التهابی پا، ناشی از تزریق فرمالین گردد. از طرفی، مطالعات نشان می‌دهد کپسایسین به‌عنوان آگونیست کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار TRPV1، به‌واسطه اثراتی که در سطح شاخ پستی نخاع اعمال می‌کند منجر به بروز پاسخ‌های التهابی می‌شود (۱۰).

این ماده با فعال کردن گیرنده‌های TRPV1 روی فیبرهای آوران Aδ و C موجب افزایش ورود کاتیون‌های سدیم و کلسیم به درون نورو و افزایش حساسیت و تحریک‌پذیری فیبرهای عصبی می‌گردد که منجر به آزادسازی میانجی‌های پپتیدی التهابی همچون ماده P و CGRP (Calcitonin Gene Related Peptide) می‌شود (۱۱).

به‌همین منظور برای یافتن مکانیسم اثر عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده پایه ماده گیاه شاهدانه بر ادم التهابی از طریق گیرنده‌های TRPV1 در سطح مرکزی، از کپسایسین استفاده شد. همچنین به‌منظور بررسی برهمکنش احتمالی اثر عصاره و سیستم اپیوئیدی بر ادم التهابی، از نالوکسان (Naloxone) به‌عنوان آنتاگونیست گیرنده‌های اپیوئیدی (۶) استفاده گردید. در این مطالعه اثرات برهمکنشی تجویز درون صفاقی این عصاره (با دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به همراه نالوکسان، همچنین اثر تجویز نخاعی عصاره با غلظت معادل دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به تنهایی و به همراه کپسایسین بر ادم التهابی پا، ناشی از تزریق فرمالین مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این پژوهش تجربی، از ۷۰ رأس موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در حیوانخانه گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط استاندارد (با درجه حرارت ۲۱ درجه سانتیگراد، رطوبت ۵۰٪ و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و امکان دسترسی آزاد به آب و غذای کافی)، نگهداری شدند. موش‌ها به‌صورت تصادفی در دو دسته بزرگ به شرح زیر قرار گرفتند:

۱- دربردارنده ۵ گروه ۷ تایی شامل: گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه شم (دریافت‌کننده حلال شامل: ترکیب اتانول، توئین ۸۰ و سالین به ترتیب با نسبت‌های ۸:۱:۱)، گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (دوز ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، گروه دریافت‌کننده نالوکسان (دوز ۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم) (۱۲) و گروه دریافت‌کننده همزمان عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و نالوکسان که پس از گذشت ۲۰ دقیقه، عصاره به‌آنها تجویز شد. تمامی تجویزها در این دسته به‌صورت درون صفاقی انجام گرفت.

۲- دربردارنده ۵ گروه ۷ تایی شامل: گروه کنترل (جراحی و کانول‌گذاری بدون تیمار)، گروه شم (همچون دسته ۱)، گروه دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر ۱۰ میکرولیتر، که این غلظت با توجه به وزن تقریبی قطعه کمری نخاع معادل ۰/۲ گرم برای دوز ۵۰ میلی‌گرم

بر کیلوگرم عصاره، معادل‌سازی شد)، گروه دریافت‌کننده محلول کپسایسین (غلظت ۰/۰۰۲ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر) (۱۳)، گروه دریافت‌کننده همزمان عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (دوز ۰/۰۱ میلی گرم بر ۵ میکرولیتر) و کپسایسین (دوز ۰/۰۰۲ میلی گرم بر ۵ میکرولیتر) که پس از گذشت ۵ دقیقه عصاره به آنها تجویز شد. تمامی تجویزها در این دسته به صورت نخاعی و به حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد. تمامی مراحل انجام آزمایشها تحت مقررات بین‌المللی رعایت حقوق حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفت (۱۴).

به منظور عصاره‌گیری، از گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه که توسط آزمایشگاه بیوسیستماتیک گیاهی تهیه و با کد هرباریومی ۴۴۶۹۰ توسط پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی تأیید و نگهداری شده بود، استفاده گردید. ابتدا گل‌ها عاری از برگ و ساقه شده و جهت خشک شدن در مکانی تاریک و خشک به مدت ۲ هفته نگهداری شدند، سپس برای هر بار عصاره‌گیری، از ماده خشک به میزان ۵۰ گرم استفاده شد. جهت تهیه عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، ماده خشک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ درجه سانتیگراد در آون حرارت داده شد و در ادامه، با استفاده از اتانول ۷۰٪ و روش ماسراسیون (خیساندن) (۱۵)، عصاره‌گیری شد و سپس توسط کاغذ صافی صاف گردید. پس از عصاره‌گیری، حلال‌ها به طور کامل تبخیر شدند.

جهت تجویز نخاعی، کانول‌گذاری در فضای تحت عنکبوتیه براساس روش Rudy و Yaksh انجام گرفت. در این روش ابتدا موش‌ها با تجویز درون‌صفافی کتامین (۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و زایلازین (۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. سپس موهای پشت سر حیوان تراشیده شد و سر در دستگاه استرئوتا‌کس ثابت گردید. آنگاه در فاصله بین گوش‌ها و به طرف پایین، برشی به اندازه ۲ سانتی‌متر ایجاد و عضلات به آرامی کنار زده شدند تا غشای اطلس - اکسی‌پیتال نمایان شود. پس از سوراخ کردن این غشا، یک لوله پلی‌اتیلن ۱۰ (PE10) به طول ۱۱ سانتی‌متر که در فاصله ۸ سانتی‌متری یک طرف آن به وسیله پارافیلیم، برجستگی کوچکی ایجاد شده بود، به آرامی به فضای تحت عنکبوتیه وارد شد؛ به طوری که انتهای کانول، بین قطعات کمری ۴ و ۵ قرار می‌گرفت. ۳ سانتی‌متر از لوله که خارج از نخاع بود جهت

تجویزها استفاده گردید. (شایان ذکر است در هیچ‌یک از حیوانات بعد از کانول‌گذاری نباید نقص حرکتی دیده شود). پس از جراحی و کانول‌گذاری و گذشت دوره زمانی ۷-۵ روزه، به منظور بهبودی و اطمینان از سالم بودن حیوان، سایر مراحل آزمایشها انجام شد. برای تجویز، از لوله رابط و سرنگ هاملتون ۵۰ میکرولیتر استفاده گردید (۱۶). جهت سنجش میزان التهاب، حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین سنجش شد. بدین ترتیب ابتدا حجم اولیه پای حیوان به روش پلتیسومتری دیجیتالی (Plethysmometry) اندازه‌گیری شد. در این روش پای حیوان تا ناحیه مچ، که به وسیله ماژیک علامت‌گذاری شده بود، به درون ستون جیوه که روی ترازوی دیجیتالی قرار داشت، فرو برده شد و عدد نشان داده شده ثبت گردید. پس از گذشت مدت زمان ۳۰ دقیقه از تجویزهای درون‌صفافی و ۵ دقیقه از تجویزهای نخاعی، برای القای ادم التهابی، میزان ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول فرمالین ۲/۵٪ به صورت زیرجلدی به کف پای حیوان تزریق شد. از آنجایی که پس از گذشت ۶۰ دقیقه از تزریق کف پای فرمالین، میزان ادم التهابی ایجاد شده به حداکثر می‌رسد، حجم ثانویه پا پس از گذشت یک ساعت مجدداً به روش پلتیسومتری اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از فرمول محاسباتی زیر، حجم ادم القاشده توسط فرمالین محاسبه گردید (۱۷).

حجم اولیه پا - حجم ثانویه پا

حجم ادم التهابی ایجاد شده =

۱۳/۶ (جرم حجمی جیوه)

نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه گردید. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری GraphPad Prism نسخه ۶ و آزمون یک‌طرفه (جهت تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها) و آزمون تی نیومن - کلز استودنت (T-Student-Neumann-keuls) (جهت مقایسه میانگین‌ها) با حداقل سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ تحلیل شدند.

یافته‌ها

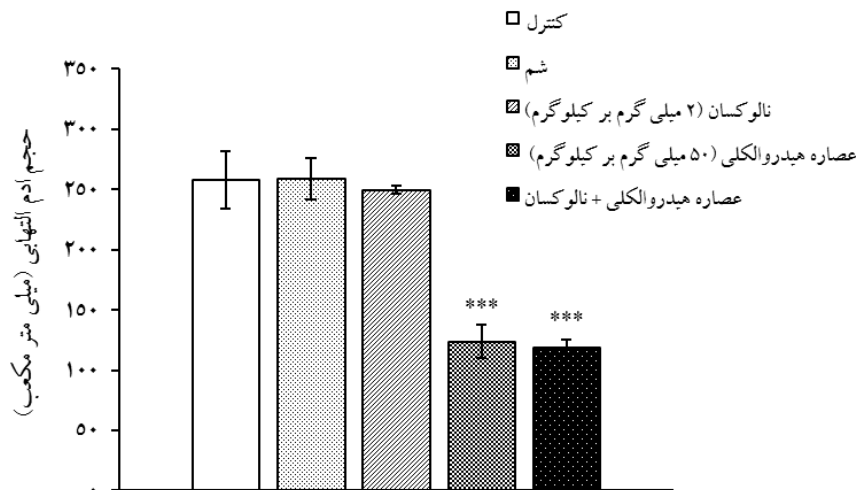
طبق نتایج حاصل از اندازه‌گیری حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین در دسته اول حیوانات، اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های کنترل، شم و دریافت‌کننده نالوکسان، به تنهایی وجود نداشت.

یافت ($p < 0/001$). مقایسه نتایج میان گروه دریافت‌کننده عصاره به تنهایی و گروه دریافت‌کننده عصاره و نالوکسان، اختلاف معنی‌داری را در حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین نشان نداد (جدول و نمودار شماره ۱).

از طرفی، تجویز درون صفاقی عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل منجر به کاهش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین شد ($p < 0/001$)، همچنین حجم ادم التهابی در گروه دریافت‌کننده عصاره و نالوکسان در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنی‌داری

جدول شماره ۱: تغییرات حجم ادم التهابی پا ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین بین گروه‌های آزمایش‌شده

گروه‌ها	کنترل	شم	نالوکسان (۲ میلی گرم بر کیلوگرم)	عصاره هیدروالکلی گیاه (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم)	عصاره هیدروالکلی + نالوکسان
میانگین $\pm$ انحراف از معیار	۲۵۷/۶ $\pm$ ۲۴	۲۵۸/۹ $\pm$ ۱۷/۱	۲۵۰ $\pm$ ۳/۲	۱۲۳/۹ $\pm$ ۱۳/۸	۱۱۹ $\pm$ ۶/۲



نمودار شماره ۱: مقایسه تغییرات حجم ادم التهابی پا ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین میان گروه‌های کنترل و شم، گروه دریافت‌کننده نالوکسان (۲ میلی گرم بر کیلوگرم)، دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم) و دریافت‌کننده عصاره و نالوکسان. تجویز درون صفاقی عصاره به تنهایی و به همراه نالوکسان منجر به کاهش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین شده است. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند. ($n=7$) و ($p < 0/001$ *** در مقایسه با گروه کنترل).

حجم ادم التهابی القا شده به وسیله تزریق کف‌پایی فرمالین در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0/001$). همچنین تجویز نخاعی عصاره (۰/۰۱ میلی گرم بر ۵ میکرولیتر) به همراه کپسایسین (۰/۰۰۲ میلی گرم بر ۵ میکرولیتر) سبب کاهش معنی‌داری در حجم ادم التهابی القا شده به وسیله تزریق کف‌پایی فرمالین در مقایسه با گروه کنترل ($p < 0/001$) و گروه دریافت‌کننده کپسایسین به تنهایی گردید ($p < 0/001$)، (جدول و نمودار شماره ۲).

براساس نتایج حاصل از آزمون پلتیسومتری در دسته دوم حیوانات، حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین در گروه کنترل و شم، تفاوت معنی‌داری نداشت، اما تجویز نخاعی کپسایسین به تنهایی (۰/۰۰۲ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر)، منجر به افزایش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p < 0/001$). از طرفی، تجویز نخاعی غلظت معادل عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده به تنهایی (۰/۰۱ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر) منجر به کاهش معنی‌داری در

جدول شماره ۲: تغییرات حجم ادم التهابی پا ناشی از تزریق کف‌پایی فرمالین بین گروه‌های آزمایش‌شده

گروه‌ها	کنترل	شم	کپسایسین (۰/۰۰۲ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر)	عصاره هیدروالکلی گیاه (۰/۰۱ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر)	عصاره هیدروالکلی + کپسایسین
میانگین $\pm$ انحراف از معیار	۲۱۰ $\pm$ ۵	۲۰۷/۷ $\pm$ ۴/۸	۳۰۶/۳ $\pm$ ۳/۸	۸۸/۲ $\pm$ ۱/۳	۱۰۸/۳ $\pm$ ۶/۴



نمودار شماره ۲: مقایسه تغییرات حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین میان گروه‌های کنترل، شم، گروه دریافت‌کننده کپسایسین (۰/۰۲ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر)، دریافت‌کننده غلظت معادل عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (۰/۰۱ میلی گرم بر ۱۰ میکرولیتر) و دریافت‌کننده عصاره و کپسایسین. تجویز نخاعی کپسایسین منجر به افزایش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین شده است، درحالی‌که تجویز نخاعی عصاره به التهابی و به همراه کپسایسین منجر به کاهش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین شده است. داده‌ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده‌اند. $(n=7)$ و $(p < 0.01)$ در مقایسه با گروه کنترل و $p < 0.001$ در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کپسایسین به تنهایی).

بحث

مطالعات پیشین حاکی از آن است که فعال شدن گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 متصل به G پروتئین، در اثر اتصال کانابینوئیدها در پایانه پیش‌سیناپسی، فعالیت آنزیم آدنیلیل سیکلاز را مهار می‌کند و در پی آن، میزان AMP حلقوی (cAMP) کاهش و PKA نیز مهار می‌شود. در نتیجه، این وقایع منجر به کاهش فسفریلاسیون کانال‌های پتاسیمی نوع A و باز شدن این کانال‌ها به همراه کانال‌های پتاسیمی GIRK (کانال‌های پتاسیمی یک‌سویه که به G پروتئین جفت شده‌اند) می‌گردد، همچنین با مهار کانال‌های دریچه‌دار وابسته به ولتاژ کلسیمی L, P/Q, N، خروج پتاسیم را زیاد و ورود کلسیم را کاهش می‌دهد که از این طریق می‌تواند بر آزادسازی میانجی‌هایی همچون گلوتامات، استیل‌کولین و نورآدرنالین اثرگذار بوده و آنها را کاهش دهد (۴،۵). یافته‌های پیشین نشان داده است کانابینوئیدهای گیاهی در اثر حرارت دیدن، دکربوکسیله شده و تغییر ساختار می‌دهند، به‌عنوان مثال می‌توان به THCA و CBDA اشاره کرد که در اثر حرارت به ترتیب به THC (Tetrahydrocannabinol) و CBD (Cannabidiol) تبدیل می‌شوند. معمولاً فرم دکربوکسیله، فرم فعال کانابینوئیدهای گیاهی محسوب می‌شود (۲). عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده پایه ماده گیاه شاهدانه حاوی

کانابینوئیدهای دکربوکسیله می‌باشد که احتمالاً از طریق همین کانابینوئیدها و مکانیسم‌های وابسته به آنها می‌تواند اثرات خود را بر فرآیند التهاب اعمال کند. در ریشه پستی نخاع که منبع آوران‌های ورودی به نخاع است، هر دو نوع گیرنده CB1 و CB2 حضور دارند. فرمالین می‌تواند با تحریک گیرنده‌های محیطی فیبرهای عصبی C و Aδ در ریشه پستی نخاع موجب آزادسازی میانجی‌های التهابی ماده P و CGRP همراه با گلوتامات گردد. این ترکیبات پس از آزاد شدن، نورون‌های پس‌سیناپسی خود را در شاخ پستی نخاع تحریک می‌کنند (۱۸). همچنین یافته‌های دیگر مطالعات نشان می‌دهد در زمان بروز التهاب و با افزایش عوامل پیش‌برنده التهاب، نظیر سیتوکاین‌ها و برخی از ایتترفرون‌ها، بیان گیرنده CB2 حاضر بر سطح سلول‌های ایمنی B، T، ماستوسیت‌ها، ماکروفاژها و میکروگلیای نخاع افزایش می‌یابد که با اتصال کانابینوئیدهای دکربوکسیله، این گیرنده‌ها فعال و با مهار تولید گروهی از عوامل التهابی، پاسخ‌های التهابی را مهار می‌کنند (۱۹). علاوه بر این، ترکیباتی نظیر فرمالین باعث القای بیان ژن پروتئین Fos در شاخ پستی ناحیه کمری نخاع می‌گردند، Fos پروتئینی است که می‌تواند منجر به پیشرفت التهاب گردد و به‌عنوان یک مارکر در فرآیند التهاب نیز شناخته می‌شود. احتمالاً کانابینوئیدهای دکربوکسیله با فعال نمودن گیرنده CB2 موجب

مهار آزادسازی میانجی‌های التهابی، سرکوب بیان ژن پروتئین Fos، همچنین مهار تولید فاکتور رشد عصبی از ماست سل‌ها و تجمع نوتروفیل‌ها در محل التهاب می‌شود (۲۰). در پایانه فیبرهای عصبی C و Aδ در شاخ پشتی نخاع، گیرنده‌های CB1 و TRPV1 حضور دارند که فعال‌سازی CB1 فعالیت TPRV1 را تعدیل می‌کنند (۷). کپسایسین با فعال کردن گیرنده‌های TRPV1 موجب افزایش ورود یون‌های کلسیم و سدیم، افزایش تحریک‌پذیری و حساس نمودن فیبرهای آوران می‌شود که نتیجه آن افزایش آزادسازی گلوتامات است. گلوتامات با فعال کردن گیرنده‌های خود موجب آزادسازی پپتیدهای التهابی P و CGRP شده که با فعال‌سازی گیرنده‌های نوروکیکین، به‌ویژه نوروکیکین ۲ همراه است، همچنین سلول‌های اندوتلیال و ایمنی را فعال و منجر به اتساع عروق و التهاب می‌گردد (۲۱، ۱۰). از طرفی، گلوتامات با فعال کردن گیرنده‌های خود بر روی اینترنورون‌های گابا‌ارژیک در سطح نخاع منجر به افزایش آزادسازی میانجی گاما- آمینوبوتریک اسید (GABA) و فعال‌سازی گیرنده GABA_A می‌شود. این افزایش فعالیت گیرنده‌های گابا باعث ایجاد فرآیندی در سطح نخاع کمری به نام رفلکس ریشه پشتی (Dorsal Root Reflex, DRR) شده که در آن به‌واسطه خروج یون کلر از گیرنده GABA_A فعال‌شده، دیلاریزاسیون شدیدی در فیبرهای آوران صورت گرفته و در پی آن آزادسازی پپتیدهای التهابی انجام می‌شود (۱۰). کپسایسین با فعال‌سازی cAMP، پروتئین کینازها را فعال کرده که منجر به افزایش بیان آنزیم‌های COX2 و تولید پروستاگلاندین E می‌شود (۷)، همچنین فسفریلاسیون کانال‌های کلسیمی موجب افزایش ورود یون کلسیم به سلول می‌گردد. یون کلسیم نیز آگروستوز میانجی‌های التهابی را افزایش می‌دهد (۱۰). بنابراین، تجویز نخاعی کپسایسین از مسیرهای یادشده می‌تواند منجر به ایجاد پاسخ‌های التهابی شدید گردد که نتایج این پژوهش نیز آن را تأیید می‌کند.

کانابینوئیدها با فعال نمودن گیرنده CB1، از راه‌های مختلفی می‌توانند التهاب ناشی از فعالیت گیرنده‌های TRPV1 را کاهش دهند: اولاً با مهار تولید cAMP، مسیر فعالیت کپسایسین به‌واسطه TRPV1 را مختل می‌کنند (۷)، و ثانیاً با کاهش فسفریلاسیون

کانال‌ها، خروج یون پتاسیم از سلول افزایش یافته و ورود یون کلسیم از کانال‌های کلسیمی کاهش می‌یابد که منجر به کاهش تحریک‌پذیری و آگروستوز میانجی‌های مؤثر در التهاب (گلوتامات، گابا، CGRP، P) از فیبرهای آوران در سطح نخاع می‌گردد (۷). علاوه بر این اثرات، کانابینوئیدها به‌طور مستقیم با اتصال به گیرنده‌های TRPV1، این گیرنده‌ها را در سطح نخاع، غیرحساس می‌کنند (۲۲). بدین ترتیب احتمالاً کانابینوئیدهای دکربوکسیله موجود در عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده می‌توانند در سطح نخاع با فعال نمودن گیرنده‌های CB2، ادم التهابی پا را کاهش دهند، و با اثر مستقیم و غیرمستقیم بر گیرنده‌های TRPV1، افزایش ادم التهابی پا در اثر کپسایسین را مهار کنند.

با توجه به اینکه کانابینوئیدها و اپیوئیدها اثرات مشابهی را بر فرآیندهایی از قبیل درد اعمال می‌کنند (۲۳)، در برخی از تحقیقات نیز برهمکنش دو سیستم کانابینوئیدی و اپیوئیدی در سطح گیرنده‌های CB1 و μ اپیوئیدی گزارش شده است (۶). در این تحقیق به بررسی اثر این دو سیستم بر ادم التهابی پرداخته شد که با توجه به یافته‌های حاصل می‌توان بیان کرد اثرات کانابینوئیدهای موجود در عصاره به‌وسیله نالوکسان (آنتاگونیست اپیوئیدی)، آنتاگونیست نشده است. پس احتمالاً کانابینوئیدهای عصاره از طریق سیستم اپیوئیدی بر کاهش حجم پای ناشی از تزریق کف پای فرمالین اثرگذار نبوده‌اند. لازم به ذکر است که برخی از تحقیقات نیز به این عدم تأثیر اشاره داشته‌اند (۱۱).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد کانابینوئیدهای گیاهی دکربوکسیله‌شده موجود در عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده در سطح نخاعی و سیستمیک، با فعال کردن گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 و CB2 و مهار فعالیت گیرنده‌های TRPV1 موجب کاهش حجم ادم التهابی ناشی از تزریق کف پای فرمالین شده است که بیانگر برهمکنش دو سیستم اندوکانابینوئیدی و وانیلوئیدی در مسیر التهاب است. در مقابل، این احتمال مطرح است که اثر کانابینوئیدها بر التهاب به‌واسطه سیستم اپیوئیدی نمی‌باشد.

References:

1. Robson PJ. Therapeutic potential of cannabinoid medicines. *Drug Test Anal* 2014;6(1-2):24-30.
2. Takeda S, Misawa K, Yamamoto I, Watanabe K. Cannabidiolic acid as a selective cyclooxygenase-2 inhibitory component in cannabis. *Drug Metab Dispos* 2008;36(9):1917-21.
3. Haj-Dahmane S, Shen RY. Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology* 2011;61(3):414-20.
4. 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. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;90(4):501-11.
5. Sidhpura N, Parsons LH. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior. *Neuropharmacology* 2011;61(7):1070-87.
6. Schoffeleers AN, Hogenboom F, Wardeh G, De Vries TJ. Interactions between CB1 cannabinoid and mu opioid receptors mediating inhibition of neurotransmitter release in rat nucleus accumbens core. *Neuropharmacology* 2006;51(4):773-81.
7. Oshita K, Inoue A, Tang HB, Nakata Y, Kawamoto M, Yuge O. CB(1) cannabinoid receptor stimulation modulates transient receptor potential vanilloid receptor 1 activities in calcium influx and substance P release in cultured rat dorsal root ganglion cells. *J Pharmacol Sci* 2005;97(3):377-85.
8. Egashira N, Matsuda T, Koushi E, Mishima K, Iwasaki K, Shoyama Y, et al. Involvement of 5-hydroxytryptamine1A receptors in Delta9-tetrahydrocannabinol-induced catalepsy-like immobilization in mice. *Eur J Pharmacol* 2006;550(1-3):117-22.
9. Roser P, Gallinat J, Weinberg G, Juckel G, Gorynia I, Stadelmann AM. Psychomotor performance in relation to acute oral administration of Delta9-tetrahydrocannabinol and standardized cannabis extract in healthy human subjects. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2009;259(5):284-92.
10. Lin Q, Wu J, Willis WD. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurophysiol* 1999;82(5):2602-11.
11. Ko MC, Woods JH. Local administration of delta9-tetrahydrocannabinol attenuates capsaicin-induced thermal nociception in rhesus monkeys: A peripheral cannabinoid action. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;143(3):322-6.
12. Zamani N, Hassanian-Moghaddam H, Bayat AH, Haghparast A, Shadnia S, Rahimi M, et al. Reversal of opioid overdose syndrome in morphine-dependent rats using buprenorphine. *Toxicol Lett* 2014;232(3):590-4.
13. Trevisan G, Rossato MF, Hoffmeister C, Oliveira SM, Silva CR, Matheus FC, et al. Mechanisms involved in abdominal nociception induced by either TRPV1 or TRPA1 stimulation of rat peritoneum. *Eur J Pharmacol* 2013;714(1-3):332-44.
14. Zimmermann M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;554:221-33.
15. Makkizadeh Tafti M, Farhoudi R, Rabii M, Rastifar M. Evaluation allelopathic effect of Hemp (*Cannabis sativa* L.) on germination and growth of three kinds of weeds. *Crop Physiol* 2011;3(11):77-89. [Full Text in Persian]
16. Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976;17(6):1031-6.
17. Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnani S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000;43(1):11-4.
18. Lever IJ, Malcangio M. CB(1) receptor antagonist SR141716A increases capsaicin-evoked release of Substance P from the adult mouse spinal cord. *Br J Pharmacol* 2002;135(1):21-4.

19. Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 2005;95(2):437-45.
20. Nackley AG, Makriyannis A, Hohmann AG. Selective activation of cannabinoid CB(2) receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 2003;119(3):747-57.
21. Beirith A, Santos AR, Calixto JB. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Res* 2003;969(1-2):110-6.
22. 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. *Br J Pharmacol* 2011;162(3):584-96.
23. Cichewicz DL, McCarthy EA. Antinociceptive synergy between delta (9)-tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304(3):1010-5.