Original Article

The effect of intrathecal administration of Genipin on rat paw inflammatory edema in the presence and absence of morphine

Abbasi Z, Fereidoni M*, Behnam-Rasouli M

Department of Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I. R. Iran.

Received September 23 10, 2013; Accepted May 4, 2014

Abstract:

Background: Uncoupling protein 2 (UCP2) is an intramembranous mitochondrial protein that the knocking down of its gene causes an induction of the pro-inflammatory responses. However, genipin, as a pharmacological inhibitor of UCP2, has anti-inflammatory effects. In this study the effect of genipin on rat paw inflammatory edema induced by formalin in the presence and absence of morphine was investigated.

Materials and Methods: In this research, male Wistar rats (200-250g) were assigned to seven groups: Saline(i.p)-Saline(i.t), Saline(i.p)-DMSO(i.t), Saline(i.p)-genipin(i.t), Morphine (10 mg/kg,i.p)-DMSO(i.t), Morphine (10mg/kg,i.p)-genipin(i.t), Morphine (1µg/kg, i.p)-DMSO (i.t) and Morphine (1µg/kg, i.p)-genipin(i.t). Inflammation was induced in the rat's hind paw by the injection of 50 µl of formalin 2.5% and paw volume was measured using plethysmometer method before and after the injection.

Results: Results revealed an anti-inflammatory effect for genipin against the formalin-induced paw edema (P<0.001). Genipin potentiated the anti-inflammatory effects of morphine, whereas it had no effect on pro-inflammatory effects of low dose of morphine; this dose of morphine reversed the anti-inflammatory effects of genipin.

Conclusion: Although genipin, a UCP2 inhibitor, was expected to increase the inflammatory edema, but probably its anti-inflammatory effects via the NF-κB inhibition is so robust that can cover its inhibitory effect on UCP2 and the subsequent inflammation. The anti-inflammatory effect of morphine was set in the range of anti-inflammatory effects of genipin. The finding that the anti-inflammatory effect of genipin is attenuated at the presence of ultra-low dose morphine may be due to their common mechanisms which suggest further research on K_{ATP} channels.

Keywords: UCP2, Genipin, Inflammation, Morphine

* **Corresponding Author.**
Email: fereidoni@um.ac.ir
Tel: 098 915 5242 015
Fax: 098 511 876 2227

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences October, 2014; Vol. 18, No 4, Pages 345-353

Please cite this article as: Abbasi Z, Fereidoni M, Behnam-Rassouli M. The effect of intrathecal administration of Genipin on rat paw inflammatory edema in the presence and absence of morphine. ***Feyz*** 2014; 18(4): 345-53.

Archive of SID

www.SID.ir

اثر تجویز نخاعی Genipin بر ادم التهابی پای موش صحرایی در حضور و عدم حضور مرفین

زهره عباسی [۱]، مسعود فریدونی [*۲]، مرتضی بهنام رسولی [۳]

خلاصه:

سابقه و هدف: UCP2 (Uncoupling Protein 2) پروتئینی در غشای داخلی میتوکندری است که ناکار کردن ژن آن باعث القای پاسخ‌های پیش‌برنده التهابی می‌شود، اما Genipin، مهار کننده فارماکولوژیک UCP2، دارای اثرات ضد التهابی است. در این مطالعه اثر Genipin بر ادم التهابی القاء شده توسط فرمالین در حضور و عدم حضور مرفین بررسی شده‌است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، موش‌های صحرایی نر ویستار (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) در ۷ گروه دریافت‌کننده سالین (i.p)-سالین (i.t)، سالین (i.p)-DMSO (i.t)، سالین (i.p)-Genipin (i.t)، مرفین (۱۰mg/kg، i.p)-DMSO (i.t)، مرفین (۱۰mg/kg، i.p)-Genipin (i.t)، مرفین (۱μg/kg، i.p)-DMSO (i.t) و مرفین (۱μg/kg، i.p)-Genipin (i.t) تقسیم‌بندی شدند. التهاب با تزریق ۵۰ μl محلول فرمالین ۲/۵ درصد به کف پای عقبی حیوانات القاء شد و حجم پا قبل و پس از تزریق، به‌روش پلتیسموتری به‌دست آمد.

نتایج: یافته‌ها نشان دهنده اثر ضد التهابی Genipin بر ادم القاء شده توسط فرمالین بود. Genipin اثرات ضد التهابی مرفین را تقویت کرد، در حالی‌که اثری بر پیش‌برندگی التهاب دوز بسیار ناچیز مرفین نداشت؛ این دوز مرفین اثرات ضد التهابی Genipin را معکوس کرد.

نتیجه‌گیری: اگرچه با مهار UCP2 توسط Genipin انتظار بر پیش‌برد ادم التهابی بود، اما احتمالا اثرات ضد التهابی Genipin از طریق مهار NF-κB به قدری قوی است که اثرات مهاری آن بر UCP2 و متعاقبا التهاب را پوشش می‌دهد، و اثرات ضد التهابی مرفین نیز در محدوده آن قرار دارد. ممکن است تقلیل اثر ضد التهابی Genipin در حضور دوز بسیار ناچیز مرفین به‌دلیل تشابه مکانیسم‌های عمل این دوز مرفین و Genipin باشد، که کانال‌های K_{ATP} پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: UCP2، Genipin، التهاب، مرفین

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۴، مهر و آبان ۱۳۹۳، صفحات ۳۵۳-۳۴۵

مقدمه

به از دست رفتن آهسته و پیش‌رونده نورون‌ها و آکسون‌های آن‌ها در سیستم عصبی مرکزی نورودژنراسیون اطلاق می‌شود. این فرآیند اولین ویژگی پاتولوژیک شرایط بسیاری از بیماری‌ها هم‌چون آلزایمر، پارکینسون، عفونت‌های ویروسی، سکته، آسیب ترومای مغزی، و مالتیپل اسکلروزیس می‌باشد. ویژگی مشترک این شرایط نورودژنراتیو فعال شدن سلول‌های گلیال مانند میکروگلیا (ماکروفاژهای قرار گرفته در سیستم عصبی مرکزی) و التهاب است [۱]. تحقیقات نشان داده‌اند که بیان میانجی‌های پیش-برنده التهاب در بیماری‌های نورودژنراتیو افزایش می‌یابد و بسیاری از این فاکتورهای التهابی خود مستقیما باعث آسیب به نورون‌ها می‌شوند [۲].

UCP2 عضوی از خانواده پروتئین‌های جدا کننده در غشای داخلی میتوکندری است که در بافت‌های مختلف از جمله پایانه‌های مرکزی آوران‌های اولیه درد در شاخ خلفی نخاع [۳] بیان‌شده و بسته به نوع بافت عملکردهای مختلفی دارد. یکی از عملکردهای این پروتئین کاهش تحریک‌پذیری سلول با تغییر وضعیت متابولیک سلول است. مطالعات نشان داده‌اند که این پروتئین در سلول‌های مختلف از جمله سلول‌های β در جزایر لانگرهانس لوزالمعده و نورون‌ها، با کاهش تولید ATP در میتوکندری، و باز کردن کانال پتاسیمی حساس به ATP (K_{ATP})، باعث هایپرپلاریزاسیون غشاء و در نتیجه کاهش تحریک پذیری سلول می‌شود [۶-۴]. این پروتئین در واکنش‌های ایمنی نیز نقش دارد. تحقیقات مختلف در راستای نقش این پروتئین در التهاب نشان داده‌اند که UCP2 دارای فعالیت ضد التهابی است [۹-۷]. Genipin یک مولکول فعال در عصاره میوه گیاه *Gardenia Jasminoides* (از خانواده روناس) است که به‌صورت اختصاصی فعالیت UCP2 را مهار می‌کند [۱۰]. به‌نظر می‌رسد Genipin با مهار این پروتئین و در نتیجه افزایش تحریک‌پذیری از طریق انسداد کانال‌های K_{ATP} باعث افزایش التهاب شود. اما بر

[۱] کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

[۲] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

*** نشانی نویسنده مسئول:**

مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۹۱۵ ۵۲۴۲۰۱۵ **دورنویس:** ۰۵۱۱ ۸۷۶۲۲۲۷

پست الکترونیک: fereidoni@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۳/۲/۱۴

Archive

www.SID.ir

خلاف انتظار، پژوهش حاضر و تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که این مولکول دارای اثرات ضد التهابی هم به‌صورت محیطی و هم به‌صورت مرکزی است [۱۳-۱۱]. آگونیست‌های گیرنده‌های اوپیوئیدی با فعال کردن G پروتئین‌ها باعث باز شدن کانال‌های پتاسیمی در نورون‌ها می‌شوند [۱۴]. فعالیت کانال‌های پتاسیمی باعث هایپرپلاریزاسیون غشای سلول شده و در بروز اثرات مهاری اوپیوئیدها نقش دارند [۱۵]. به علاوه، مرفین گیرنده‌های اوپیوئیدی پیش سیناپسی را نیز فعال می‌کند. هم‌چنین با مهار جریان‌های کلسیمی آزادسازی نوروترانسمیترها را کاهش می‌دهد [۱۶] و بدین طریق می‌توان اثرات مهاری اوپیوئیدها بر سلول‌های هدف را توضیح داد. با توجه به نقش UCP2 در پروجکشن‌های مرکزی آوران‌های اولیه درد، بر آن شدیم تا بررسی کنیم که آیا تجویز Genipin به‌صورت نخاعی با مهار فعالیت این پروتئین و تغییر وضعیت متابولیک سلول باعث پیش‌برد التهاب می‌شود یا با فعال کردن سلول‌های ایمنی در سیستم عصبی مرکزی (میکروگلیاها) باعث بروز اثرات ضد التهابی می‌شود. از طرف دیگر از آنجا که مرفین باعث کاهش تحریک‌پذیری آوران‌های اولیه و متعاقبا کاهش التهاب می‌شود، Genipin ممکن است با مهار UCP2 و اثر متضاد بر تحریک پذیری نورون‌ها و یا اثر بر سلول‌های میکروگلیا اثرات ضد التهابی مرفین را تحت تأثیر قرار دهد. به‌منظور بررسی این فرضیات از مدل ادم القاء شده توسط فرمالین در پای موش صحرایی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور انجام این مطالعه پژوهشی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در جعبه‌هایی از جنس پلکسی گلاس در محیطی با دمای ۲±۲۲ °C و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند، و دسترسی آزاد به غذا و آب شهری داشتند. یک کانول پلی اتیلن با طول ۱۱ cm بریده شد. حیوانات تحت جراحی قرار گرفته و ۸ cm از کانول وارد فضای تحت عنکبوتیه شد. با گذشت یک هفته بهبودی پس از جراحی، دارو/حلال به کمک کانول، تجویز شده و آزمایش‌های مربوط به بررسی میزان ادم، ضمن رعایت حقوق حیوانات [۱۷]، بر روی حیواناتی که هیچ گونه نقص حرکتی نداشتند، انجام شد. به‌منظور انجام این پژوهش از محلول‌های Genipin (Sigma-Aldrich) با غلظت ۱ mM [حامل دارو، حلال DMSO (۰/۵درصد، حجم/حجم) بود]، و مرفین (تماد) با دوزهای ۱۰ mg/kg و ۱ µg/kg استفاده شد. حیوانات جراحی شده به‌صورت تصادفی در هفت گروه حداقل هفت تایی قرار گرفتند. گروه بندی‌ها به این ترتیب بودند: حیوانات دریافت کننده سالین (i.p)- سالین (i.t)، سالین DMSO-(i.p) (i.t)، سالین Genipin-(i.p) (۱ mM ،i.t)، مرفین (۱۰ mg/kg ،i.p) DMSO-(i.t)، مرفین (۱۰ mg/kg ،i.p) Genipin-(۱ mM ،i.t)، مرفین (۱ µg/kg ،i.p) DMSO-(i.t)، و مرفین (۱ µg/kg ،i.p) Genipin-(۱ mM ،i.t). در تمام گروه‌ها تجویزهای داخل صفاقی (i.p) به حجم ۱ cc/kg، و ۲۵ دقیقه پس از آن تجویزهای نخاعی (i.t) به حجم ۱۰ µl به ازای هر تجویز صورت گرفت. به‌منظور اطمینان از عدم تأثیر جراحی بر پاسخ‌های حیوانات یک گروه از حیوانات بدون عمل جراحی نیز در نظر گرفته شد که فقط سالین را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کردند. کانول گذاری به‌منظور تجویز نخاعی توسط روش Yaksh و Rudy انجام گرفت [۱۸]. برای انجام جراحی حیوانات با تجویز داخل صفاقی مخلوطی از کتامین و زایلازین (به‌ترتیب ۱۰۰ و ۲۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بی‌هوش شدند. ابتدا موهای سر حیوان در محل مورد نظر برای جراحی تراشیده شده و سپس سر حیوان در دستگاه استرئوتاکس ثابت شد. در خط وسط از بین گوش‌ها برشی کوچک به طول تقریبا ۲ سانتی‌متر به‌طرف پایین ایجاد گردید. با برش عمقی در راستای این برش و کنار زدن عضلات گردنی از روی تیغه اکسی‌پیتال جمجمه، غشای اطلس ـ اکسی‌پیتال مشاهده شد. با استفاده از یک سوزن خراشیدگی کوچکی در سطح این غشاء ایجاد شد تا مایع مغزی - نخاعی خارج شود. با خروج این مایع، که نشانه دسترسی به فضای تحت عنکبوتیه است، با احتیاط و با استفاده از یک سوزن سرکج خراشیدگی گسترش داده شد. سپس ۸ سانتی‌متر از کانول پلی‌اتیلن (PE-10) در فضای تحت عنکبوتیه قرار گرفت و به آرامی به طرف قطعه کمری نخاع پیش برده شد. ۳ سانتی‌متر از کانول نیز برای تجویز دارو در خارج از نخاع باقی ماند. حیوانات قبل از انجام آزمایش‌ها یک دوره بهبودی تقریبا یک هفته‌ای را پشت سر گذاشتند. تیمارها با حجم ۱۰ میکرولیتر و با کمک سرنگ هامیلتون ۵۰ میکرولیتری تجویز گردید. برای اندازه‌گیری التهاب روش‌های مختلفی وجود دارند که وابسته به پارامترهای متغیر طی التهاب هستند. معمول‌ترین روش مورد استفاده تخمین حجم ادم ایجاد شده است. روش پلتیسموتری دیجیتالی برای اولین بار در سال ۲۰۰۰ توسط فریدونی و همکاران برای اندازه گیری حجم ادم ناشی از عوامل پاتولوژیک یا آزمایشگاهی ارائه شد [۱۹]. در مطالعه حاضر برای القای التهاب، مقدار ۵۰ µl از محلول فرمالین ۲/۵ درصد به‌صورت زیر جلدی به کف پای عقبی حیوان تزریق شد (مدل ادم

Archive of SID

www.SID.ir

القاء شده پا به وسیله فرمالین). برای تعیین حجم ادم، ابتدا قبل از القای التهاب طی تزریق فرمالین، پای حیوان تا علامت درج شده بر روی مچ در ستون جیوه واقع شده بر روی یک ترازوی دیجیتال فرو برده شد و عدد ترازو تقسیم بر جرم حجمی جیوه به‌عنوان حجم پا ثبت گردید. حجم پا یک ساعت پس از تزریق فرمالین مجددا اندازه‌گیری شد. اگر A معادل حجم پا قبل از تزریق فرمالین، B معادل حجم پا یک ساعت پس از تزریق فرمالین، و C معادل حجم ادم القاء شده باشد، آنگاه:

$$C=B-A$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌ها به‌صورت mean±SEM ارائه شده با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 5 و به روش آنالیز ANOVA یک طرفه ارزیابی شدند. سپس، میانگین داده‌ها بین گروه‌های مختلف با آزمون تعقیبی توکی مقایسه گردید. حداقل سطح معنی‌داری معادل $P<0/05$ در نظر گرفته شد. سرانجام نتایج به کمک نرم افزار Microsoft Excel 2007 بر روی نمودار نمایش داده شدند.

نتایج

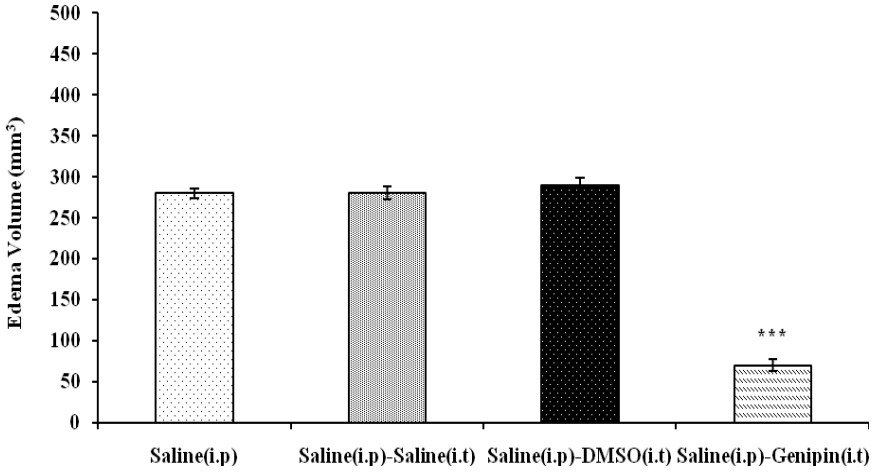
مقایسه میانگین‌ها نشان داد بین گروه‌های کنترل و گروه‌های تجربی از نظر آماری اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول شماره ۱). نتایج حاکی از آن بود که تجویز نخاعی DMSO پس از تجویز داخل صفاقی سالین در گروه سالین (i.p)- DMSO (i.t) منجر به تغییر معنی‌داری در میزان ادم التهابی در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین (i.p)- سالین (i.t) نگردید که نشان‌دهنده عدم تأثیر حلال بر ادامه روند آزمایش‌ها بود. علاوه بر آن، میزان ادم القاء شده در این دو گروه با گروهی که تحت عمل جراحی جهت کانول گذاری قرار نگرفته و فقط سالین را به‌صورت داخل صفاقی دریافت کرده بودند، نیز تفاوت معنی‌داری نداشت، که این نیز خود نشان‌دهنده عدم تأثیر جراحی بر میزان ادم القاء شده است. از طرفی نتایج حاصل از این پژوهش بیان‌گر آن بود که میزان ادم در گروه دریافت‌کننده سالین (i.p)- Genipin (i.t) کاهش چشم‌گیری در مقایسه با گروه دریافت‌کننده سالین (i.p)- DMSO (i.t) داشت ($P<0/001$)، (شکل شماره ۱)، که نشان می‌دهد تجویز مرکزی Genipin دارای اثرات ضد التهابی قابل توجه است. نتایج هم‌چنین نشان دادند که میزان ادم القاء شده توسط فرمالین در گروه دریافت کننده دوز معمول مرفین (۱۰ mg/kg، i.p)-DMSO (i.t) در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.p)- DMSO (i.t) کاهش معنی دار یافت ($P<0/001$) و هم‌چنین تجویز نخاعی Genipin ادم التهابی را پس از تجویز داخل صفاقی دوز معمول مرفین در گروه مرفین (۱۰ mg/kg، i.p)-Genipin (i.t) در مقایسه با گروه سالین (i.p)- DMSO (i.t) نیز کاهش داد ($P<0/001$)؛ میزان این کاهش به‌دلیل حضور Genipin، از حالتی که مرفین به تنهایی تجویز شده بود بیشتر بود ($P<0/001$)، (شکل شماره ۲). میزان ادم القاء شده توسط تزریق کف پایی فرمالین در گروه دریافت‌کننده دوز بسیار ناچیز مرفین (۱ µg/kg، i.p)-DMSO (i.t) در مقایسه با گروه دریافت-کننده سالین (i.p)- DMSO (i.t) افزایش یافت ($P<0/05$). هم‌چنین، تجویز نخاعی Genipin به‌همراه تجویز داخل صفاقی دوز بسیار ناچیز مرفین در گروه دریافت کننده مرفین (۱ µg/kg، i.p)-Genipin (i.t) در مقایسه با گروه سالین (i.p)- DMSO (i.t) منجر به افزایش معنی‌داری در میزان ادم التهابی شد ($P<0/01$). این نتایج نشان دهنده این است که Genipin قادر نیست بر اثر پیش برندگی التهاب توسط دوز بسیار ناچیز مرفین غلبه کند؛ به‌نحوی‌که حضور و عدم حضور Genipin تفاوت معنی‌داری در تشدید التهاب توسط دوز بسیار ناچیز مرفین نداشت (شکل شماره ۳).

جدول شماره ۱- میانگین حجم ادم القاء شده (میلی‌متر مکعب) توسط فرمالین در گروه‌های مختلف مورد مطالعه

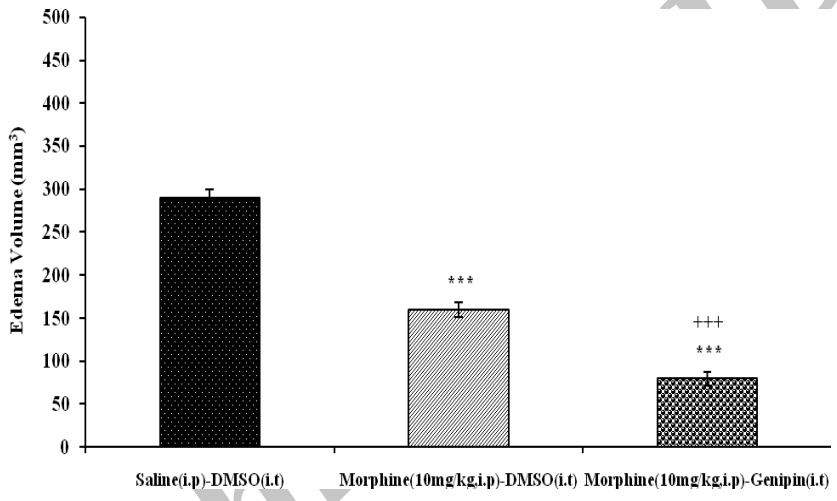
گروه‌های تیمار شده	$\overline{X} \pm SEM$
سالین (i.p)	۲۸۲±۱/۳۲
سالین (i.p) - سالین (i.t)	۲۸۰±۱/۱۲
سالین (i.p) - DMSO (i.t)	۲۹۰±۱/۲۴
سالین (i.p) – Genipin (i.p)	۷۴ ±۱/۲۷
مرفین (۱۰ mg/kg ،i.p) - DMSO (i.t)	۱۶۰±۱/۳۲
مرفین (۱۰ mg/kg ،i.p) - Genipin (i.p)	۸۲±۱/۲۹
مرفین (۱ µg/kg ،i.p) - DMSO (i.t)	۳۳۲±۱/۳۵
مرفین (۱ µg/kg ،i.p) - Genipin (i.p)	۳۶۳±۱/۲۶

Archive of SID

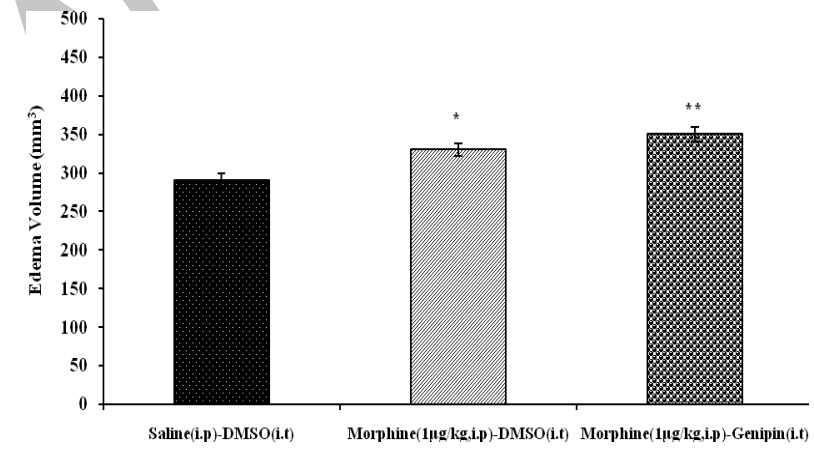
www.SID.ir



شکل شماره ۱- مقایسه میزان ادم القاء شده توسط تزریق کف پایی فرمالین در گروه‌های سالین (i.p)، سالین (i.p)-سالین (i.t)، سالین (i.p)-DMSO (i.t) و سالین (i.p)-Genipin (۱ mM، i.t). داده‌ها به‌صورت $\overline{X} \pm SEM$ ارائه شده‌اند، (n=۷) و (***$P<$ ۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه سالین (i.p)-DMSO (i.t)).

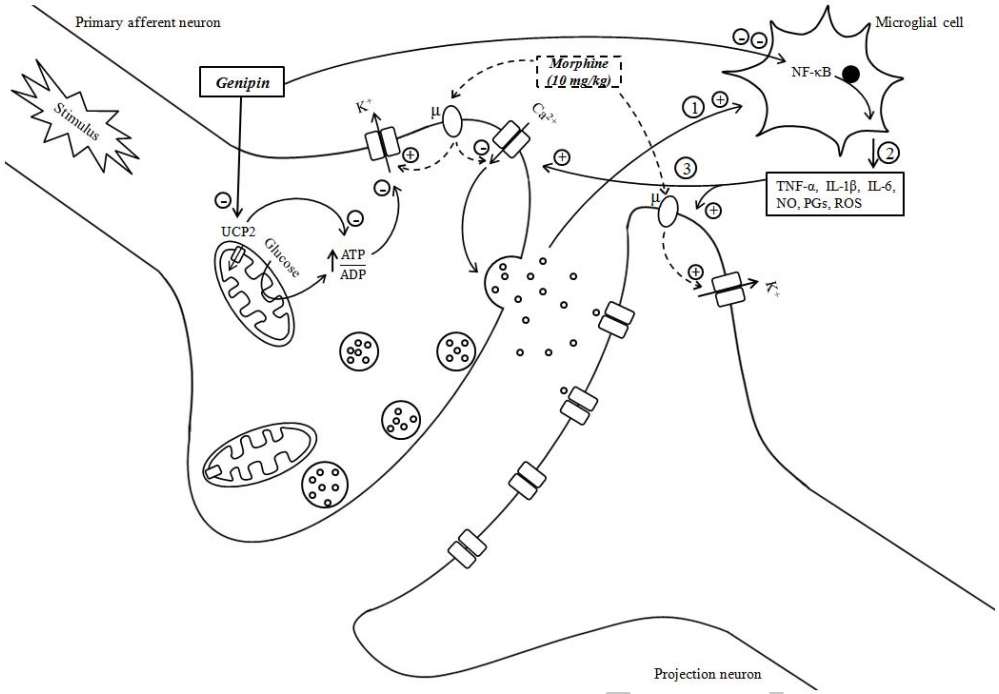


شکل شماره ۲- مقایسه میزان ادم القاء شده توسط تزریق کف پایی فرمالین در گروه‌های سالین (i.p)-DMSO (i.t)، مرفین (i.p-DMSO ،۱۰mg/kg) (i.t) و مرفین (i.p/Genipin ،۱۰mg/kg) (i.t ،۱ mM). داده‌ها به صورت $\overline{X} \pm SEM$ ارائه شده اند، (n=۷) و (***$P<$۰/۰۰۱) در مقایسه با گروه سالین (i.p)-DMSO (i.t) و +++$P<$۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه مرفین (i.p-DMSO ،۱۰mg/kg) (i.t)).



شکل شماره ۳- مقایسه میزان ادم القاء شده توسط تزریق کف پایی فرمالین در گروه‌های سالین (i.p)-DMSO (i.t)، مرفین (i.p-DMSO ،۱ µg/kg) (i.t) و مرفین (i.p-Genipin ،۱ µg/kg) (i.t ،۱ mM). داده‌ها به‌صورت $\overline{X} \pm SEM$ ارائه شده اند، (n=۷) و (**$P<$۰/۰۱ و *$P<$۰/۰۵ در مقایسه با گروه سالین (i.p)-DMSO (i.t)).

www.SID.ir



شکل شماره ۴- مدل پیشنهاد شده برای اثرات ضد التهابی Genipin. اگرچه با توجه به نقش مستقیم UCP2 در التهاب انتظار بر این بود که Genipin با مهار UCP2 هم به طور مستقیم، و هم به صورت غیر مستقیم احتمالا با مهار کانال‌های K_{ATP} و باز شدن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ، و بدین طریق افزایش آزاد سازی میانجی‌های عصبی از آوران‌های اولیه، فعال شدن سلول میکروگلیا و افزایش آزاد سازی میانجی‌های پیش التهابی (مراحل ۱ تا ۳)، باعث افزایش التهاب شود، اما ظاهراً اثرات ضد التهابی آن از طریق مهار مستقیم سلول‌های میکروگلیا و در نتیجه کاهش احتمالی فعالیت تحریکی آوران‌های اولیه و کاهش آزاد سازی میانجی‌های التهابی از پایانه‌های محیطی آن‌ها بسیار بیشتر از اثرات التهابی آن از طریق مهار UCP2 در این نورون‌هاست. مرفین در دوز ۱۰ mg/kg نیز با کاهش آزاد سازی میانجی‌ها باعث کاهش فعالیت سلول میکروگلیا و در نتیجه کاهش التهاب می‌شود (ترسیم توسط نگارنده).

بحث

نتایج به‌دست آمده از این مطالعه تجربی نشان داد که تجویز نخاعی Genipin باعث کاهش چشم‌گیر التهاب در مدل ادم القاء شده در پای موش صحرایی به‌وسیله تزریق فرمالین می‌شود. UCP2 پروتئینی در غشای داخلی میتوکندری است که در واکنش‌های التهابی وارد عمل می‌شود [۷]. تحقیقات نشان داده‌اند که موش‌های $Ucp2^{-/-}$ نسبت به عفونت‌های حاصل از میکروارگانیسم‌ها مقاومت بیشتری دارند و بهتر می‌توانند میکروب را از بین ببرند، چون فعالیت فاگوسیتی ماکروفاژها و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در این سلول‌ها در موش‌های $Ucp2^{-/-}$ بیشتر است. به‌علاوه، تولید NO و سیتوکاین‌های التهابی مثل IFN-γ و TNF-α نیز در این موش‌ها در هردو محیط برون-تنی و درون‌تنی بیشتر از موش‌های $Ucp2^{+/+}$ است. مراحل کلیدی در فعال‌سازی آبشار NF-κB، از جمله فعالیت IκB کیناز و جابجایی زیر واحدهای NF-κB به هسته، همگی در موش‌های $Ucp2^{-/-}$ افزایش چشم‌گیری نشان می‌دهند، که حتی در شرایط پایه نیز قابل توجه است [۸]. هم‌چنین، نشان داده شده است که UCP2 بسیاری از عملکردهای ماست‌سل‌ها هم‌چون تولید هیستامین، IL-6، و پروستاگلاندین D2، را به‌صورت معکوس تنظیم می‌کند. به‌علاوه، تزریق زیر پوستی ماده P، که فعال کننده ماست‌سل‌ها در پوست است، باعث القای شدید نفوذپذیری عروق در موش‌های $Ucp2^{-/-}$ می‌شود [۹]. پس در نگاه اول انتظار این است که Genipin با مهار عملکرد UCP2 تشدید کننده التهاب باشد. با این حال این نظر نمی‌تواند قطعی باشد؛ چرا که Genipin موجودیت UCP2 را از بین نمی‌برد و اثرات التهابی UCP2 ممکن است ارتباط چندانی با جنبه عملکرد متابولیکی آن نداشته باشد. تاکنون مطالعات مربوط به ادم ایجاد شده در پای موش صحرایی به‌وسیله کاراژینان، تشکیل air pouch توسط کاراژینان، اندازه‌گیری مقدار نیتریک‌اکساید (NO) در اگزودیت [۱۱]، و ادم القاء شده در گوش موش به‌وسیله روغن کروتون [۱۲] نشان داده‌اند که Genipin دارای خاصیت ضد التهابی است. نتایج این تحقیق نیز مؤید همین مطلب بود و نشان داد که Genipin در ادم القاء شده در پای موش صحرایی توسط فرمالین نیز دارای اثرات ضد التهابی است. نشان داده شده است که Genipin فعالیت ضد التهابی محیطی خود را از طریق مسیر IκB-β/NF-κB، مسیری

Archive of SID

www.SID.ir

که با فعالیت مهاری Genipin بر تولید NO نیز مرتبط است، اعمال می‌نماید و از تجزیه IκB-β جلوگیری می‌نماید. هم‌چنین، ثابت شده است که Genipin با مهار بیان iNOS، تولید نیتریک اکساید القاء شده به‌وسیله LPS و INF-γ را مهار می‌کند. مهار بیان iNOS توسط Genipin فعالیت ضد التهابی آن را حمایت می‌کند [۱۲]. از طرف دیگر چون فعال شدن NF-κB برای القای بیان COX-2 لازم است، اعتقاد بر این است که Genipin با بلوک بیان این آنزیم نیز التهاب حاد را مهار می‌کند [۱۱]. Genipin در بافت‌های عصبی هم دارای اثرات ضد التهابی است. در محیط کشت، Genipin فعالیت فاکتور NF-κB در سلول‌های میکروگلیا فعال شده در پاسخ به LPS را سرکوب کرده و آزاد سازی NO و دیگر سیتوکاین‌های پیش‌برنده التهاب مثل TNF-α، IL-1β، PGE2، و ROS از این سلول‌ها را مهار می‌کند [۱۳]. تزریق فرمالین به‌صورت زیر جلدی نیز باعث فعال شدن سلول‌های میکروگلیا می‌شود [۲۰]. چنین به‌نظر می‌رسد که Genipin سلول‌های میکروگلیای فعال شده پس از تزریق زیرجلدی فرمالین را نیز با مهار فعالیت فاکتور NF-κB مهار کرده و باعث بروز اثرات ضد التهابی چشم‌گیر شده است. بنابراین، ظاهرا خاصیت ضد التهابی Genipin از طریق مهار تولیدات میانجی‌های التهابی از سلول‌های میکروگلیا، و در نتیجه کاهش احتمالی فعالیت تحریکی آوران‌های اولیه و به‌دنبال آن کاهش آزاد سازی میانجی‌های التهابی از پایانه‌های محیطی آن‌ها، خیلی قوی‌تر از هرگونه اثر التهابی است که از طریق مهار UCP2 بتوان فرض نمود؛ و بدین طریق توانسته اثرات ممکن ناشی از مهار UCP2 را بر پیش‌برد التهاب و ادم پوشش دهد (شکل شماره ۴). آگونیست‌های گیرنده‌های اوپیوئیدی با فعال کردن G پروتئین‌ها باعث باز شدن کانال‌های پتاسیمی در نورون‌ها می‌شوند. و مهار کانال‌های K_{ATP} و کانال‌های GIRK باعث مهار اثرات بی‌دردی مرفین می‌شود [۱۴]. فعالیت این دو نوع کانال پتاسیمی باعث هایپرپلاریزاسیون غشای سلول شده و در بروز اثرات مهاری اوپیوئیدها نقش دارند [۱۵]. به علاوه، مرفین گیرنده‌های اوپیوئیدی پیش سیناپسی را نیز فعال می‌کند. هم‌چنین، با مهار جریان‌های کلسیمی آزاد سازی میانجی‌های عصبی را کاهش می‌دهد [۱۶]. از طرفی سلول‌های میکروگلیا در پاسخ به آزاد شدن میانجی‌های عصبی از پایانه‌های مرکزی آوران‌های اولیه فعال می‌شوند [۲۱]؛ بدین ترتیب می‌توان اثرات ضد التهابی اوپیوئیدها را توضیح داد. قابل توجه اینکه اثرات ضد التهابی دوز معمول مرفین تنها به همین طریق اعمال می‌شود، نه از طریق اثر بر سلول‌های میکروگلیا، چون نشان داده شده است که این سلول‌ها فاقد گیرنده‌های اوپیوئیدی μ هستند [۲۲]. روی هم رفته چنین می‌توان گفت که اثرات ضد التهابی مرفین از طریق کاهش آزاد سازی میانجی‌های عصبی و در نتیجه کاهش فعالیت سلول‌های میکروگلیا اعمال می‌شود، ولی اثر Genipin روی همین سلول‌ها به شدت فعالیت آن‌ها را کاهش می‌دهد، به‌نحوی که کاهش فعالیت سلول‌های میکروگلیا از طریق کاهش آزاد سازی میانجی‌های عصبی در مقابل کاهش مسیرهای سیگنال رسانی التهابی داخل سلولی ناشی از Genipin ناچیز به نظر می‌رسد، بنابراین اثرات مرفین در سایه اثرات Genipin قرار می‌گیرد. از طرف دیگر، دوز بسیار ناچیز مرفین (۱ μg/kg) پیش-برنده التهاب می‌باشد. بر خلاف دوز معمول مرفین، دوز بسیار ناچیز آن احتمالا از طریق فعال سازی Gs، افزایش فعالیت PKA، PKC و افزایش کلسیم [۲۳]، باعث پیش‌برد التهاب می‌شود. علاوه بر این، فعال شدن گلیکوزیل ترانسفراز وابسته به PKA و متعاقبا افزایش سنتز گانگلیوزید GM1 نیز باعث بروز اثرات تحریکی اوپیوئیدها می‌شود. افزایش GM1 باعث فعال شدن عملکردهای مرتبط با گیرنده‌های اوپیوئیدی جفت شده با Gs، افزایش تغییر گیرنده‌های اوپیوئیدی از وضعیت مهاری به وضعیت تحریکی جفت شده با Gs؛ و در نتیجه باعث افزایش راندمان جفت شدن گیرنده‌های اوپیوئیدی جفت شده با Gs به سیستم سیگنال رسانی PKA و متعاقبا حساس شدن فوق‌العاده گیرنده‌های اوپیوئیدی تحریکی می‌شود [۲۴]. در تجویز نخاعی Genipin پس از تجویز داخل صفاقی دوز بسیار ناچیز مرفین، حضور Genipin اثری بر پیش‌برندگی التهاب مرفین نداشت، ولی این دوز مرفین توانست خواص ضد التهابی Genipin را معکوس کند. اگرچه Genipin از طریق سرکوب فعالیت NF-κB در سلول‌ها میکروگلیا و کاهش آزاد سازی سیتوکاین‌های پیش التهابی دارای اثرات ضد التهابی است، اما ظاهرا حضور مرفین به‌عنوان عامل پیش برنده التهاب و اثرات تحریکی آن در افزایش آزاد سازی میانجی‌های عصبی و فعال کردن سلول‌های میکروگلیا آنقدر زیاد است که اثرات ضد التهابی Genipin را می‌پوشاند. بنابراین حضور مرفین با دوز پیش برنده التهاب در حضور Genipin می‌تواند التهاب‌زا هم باشد. شواهد در حال گسترشی وجود دارند که نشان می‌دهند کانال‌های K_{ATP} در نورون‌ها نه تنها به‌عنوان حس‌گرهای متابولیک عمل می‌کنند، بلکه می‌توانند به‌عنوان افکتورهایی در مسیرهای بیوشیمیایی و سیستم‌های پیامبر ثانویه، مثل G پروتئین‌ها، آبشارهای PIP، و فسفریلاسیون‌های وابسته به پروتئین کیناز نیز عمل کنند [۲۸-۲۵]. از آنجا که حضور Genipin باعث مهار کانال‌های K_{ATP} شده و دوز بسیار ناچیز ۱ μg/kg مرفین از طریق اثر بر G پروتئین‌های تحریکی، PIP2 و فسفریلاسیون وابسته به

Archive of SID

www.SID.ir

پروتئین کینازها مثل PKA و PKC باعث ایجاد هایپرآلژزیا می‌شود، لذا ممکن است بخشی از اثرات پردرد کنندگی و هم‌چنین تشدید التهاب دوز بسیار ناچیز مرفین تا حدی به‌واسطه کانال‌های K_{ATP} بروز نماید.

نتیجه‌گیری

روی هم رفته، نتایج این مطالعه بیان‌گر آن است که تجویز Genipin به‌صورت نخاعی ادم القاء شده توسط فرمالین را به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد، که احتمالا مربوط به مهار قوی فاکتور NF-κB در سلول‌های میکروگلیا است، که بر اثرات مهاری آن بر UCP2 و پیش‌برد التهاب از این طریق چیره می‌شود. ظاهراً این اثر مهاری آنقدر قوی بوده که اثرات ضد التهابی را اشباع نموده و اثرات ضد التهابی دوز معمول مرفین در سایه اثرات آن بوده است. Genipin با چنین ویژگی ضد التهابی قوی می‌تواند راه‌کاری جدید برای درمان یا جلوگیری از پیشرفت بیماری‌های نورودژنراتیو باشد. از طرفی Genipin می‌تواند با مهار UCP2 و متعاقب آن مهار کانال‌های K_{ATP} باعث افزایش تحریک‌پذیری و در نتیجه افزایش التهاب شود. از آنجا که دوز بسیار ناچیز مرفین توانسته است اثرات ضد التهابی Genipin را کاملا معکوس کند و نیز با در نظر گرفتن این نکته که اثرات Genipin می‌تواند به‌واسطه کانال‌های K_{ATP} بروز کند و این کانال‌ها می‌توانند به عنوان اهداف پایین دست پروتئین کینازها که واسطه عمل دوز بسیار ناچیز مرفین هستند باشند، ممکن است بخشی از اثرات دوز بسیار ناچیز مرفین در پیش‌برد التهاب به واسطه کانال‌های K_{ATP} بروز کند که خود نیازمند پژوهش‌های بیشتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه مصوب مقطع کارشناسی ارشد و تحت حمایت مالی دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد، بدین‌وسیله از همکاری این سازمان قدردانی می‌گردد.

References:

[1] Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. ***Immunology*** 2010; 129(2): 154-69.
[2] Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. ***Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*** 2003; 358(1438): 1669-77.
[3] Horvath B, Spies C, Warden CH, Diano S, Horvath TL. Uncoupling protein 2 in primary pain and temperature afferents of the spinal cord. ***Brain Res*** 2002; 955(1-2): 260-3.
[4] Chan CB, MacDonald PE, Saleh MC, Johns DC, Marbàn E, Wheeler MB. Overexpression of uncoupling protein 2 inhibits glucose-stimulated insulin secretion from rat islets. ***Diabetes*** 1999; 48(7): 1482-6.
[5] Kong D, Vong L, Parton LE, Ye C, Tong Q, Hu X, et al. Glucose stimulation of hypothalamic MCH neurons involves K_{ATP} channels, is modulated by UCP2, and regulates peripheral glucose homeostasis. ***Cell Metab*** 2010; 12(5): 545-52.
[6] Parton LE, Ye CP, Coppari R, Enriori PJ, Choi B, Zhang CY, et al. Glucose sensing by POMC neurons regulates glucose homeostasis and is impaired in obesity. ***Nature*** 2007; 449(7159): 228-32.
[7] Alves-Guerra MC, Rousset S, Pecqueur C, Mallat Z, Blanc J, Tedgui A, et al. Bone marrow transplantation reveals the in vivo expression of the mitochondrial uncoupling protein 2 in immune and nonimmune cells during inflammation. ***J Biol Chem*** 2003; 278(43): 42307-12.
[8] Bai Y, Onuma H, Bai X, Medvedev AV, Misukonis M, Weinberg JB, et al. Persistent nuclear factor-κB activation in $Ucp2^{-/-}$ mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production. ***J Biol Chem*** 2005; 280(19): 19062-9.
[9] Tagen M, Elorza A, Kempuraj D, Boucher W, Kepley CL, Shirihai OS, et al. Mitochondrial uncoupling protein 2 inhibits mast cell activation and reduces histamine content. ***J Immunol*** 2009; 183(10): 6313-9.
[10] Zhang CY, Parton LE, Ye CP, Krauss S, Shen R, Lin CT, et al. Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced β cell dysfunction in isolated pancreatic islets. ***Cell Metab*** 2006; 3(6): 417-27.
[11] Koo HJ, Lim KH, Jung HJ, Park EH. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. ***J Ethnopharmacol*** 2006; 103(3): 496-500.
[12] Koo HJ, Song YS, Kim HJ, Lee YH, Hong SM, Kim SJ, et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. ***Eur J Pharmacol*** 2004; 495(2-3): 201-8.
[13] Nam KN, Choi YS, Jung HJ, Park GH, Park JM, Moon SK, et al. Genipin inhibits the inflammatory response of rat brain microglial cells. ***Int Immunopharmacol*** 2010; 10(4): 493-9.
[14] Ocana M, Cendan CM, Cobos EJ, Entrena JM, Baeyens JM. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. ***Eur J Pharmacol*** 2004; 500(1-3): 203-19.
[15] Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K. Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. ***J Neurosci*** 2005; 25(14): 3551-9.

Archive of SID

www.SID.ir

[16] Seward E, Hammond C, Henderson G. Mu-opioid-receptor-mediated inhibition of the N-type calcium-channel current. ***Proc Biol Sci*** 1991; 244(1310): 129-35.
[17] Zimmermann M, Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. ***Acta Physiol Scand Suppl*** 1986; 128 Suppl 554: 221-33.
[18] Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. ***Physiol Behav*** 1976; 17(6): 1031-6.
[19] Fereidoni M, Ahmadiani A, Semnanian S, Javan M. An accurate and simple method for measurement of paw edema. ***J Pharmacol Toxicol Methods*** 2000; 43(1): 11-4.
[20] Fu KY, Light AR, Matsushima GK, Maixner W. Microglial reactions after subcutaneous formalin injection into the rat hind. ***Brain Res*** 1999; 825(1-2): 59-67.
[21] Zhuang ZY, Gerner P, Woolf CJ, Ji RR. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal nerve ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic pain model. ***Pain*** 2005; 114(1-2): 149-59.
[22] Kao SC, Zhao X, Lee CY, Atianjoh FE, Gauda EB, Yaster M, et al. absence of μ opioid receptor mRNA expression in astrocytes and microglia of rat spinal cord. ***Neuroreport*** 2012; 23(6): 378-84.
[23] Esmaeili-Mahani S, Shimokawa N, Javan M, Maghsoudi N, Motamedi F, Koibuchi N, et al. Low-dose morphine induces hyperalgesia through activation of G αs, protein kinase C, and L-type Ca^{2+} channels in rats. ***J Neurosci Res*** 2008; 86(2): 471-9.
[24] Mercadante S. Opioid-induced hyperalgesia. ***Pol Med Paliatywna*** 2006; 5(2): 76-81.
[25] Sánchez JA, Gonoi T, Inagaki N, Katada T, Seino S. Modulation of reconstituted ATP-sensitive K^+ channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. ***J Physiol*** 1998; 507 (Pt 2): 315-24.
[26] Wada Y, Yamashita T, Imai K, Miura R, Takao K, Nishi M, et al. A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K^+ channels by G-protein βγ-subunits. ***EMBO J*** 2000; 19(18): 4915-25.
[27] Baukrowitz T, Fakler B. K_{ATP} channels: linker between phospholipid metabolism and excitability. ***Biochem Pharmacol*** 2000; 60(6): 735-40.
[28] Lin YF, Jan YN, Jan LY. Regulation of ATP-sensitive potassium channel function by protein kinase A-mediated phosphorylation in transfected HEK293 cells. ***EMBO J*** 2000; 19(5): 942-55.

Archive of SID

www.SID.ir