مجله علمی پژوهشی دانشگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره ۱۴، شماره ۵۷، زمستان ۱۳۸۵، صفحات ۹ تا ۱۴

بررسی اثر ضددرد تزریق درون بطن مغزی و محیطی JWH133 در موش سوری

دکتر محمدرضا جعفری*، سمیه گل محمّدی**، فرشته غیاثوند**

نویسنده‌ی مسئول: زنجان، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان jafarimrj@yahoo.com

دریافت: ۸۵/۷/۲۴ پذیرش:۸۵/۱۰/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: *کانابینوییدها اثر بی‌دردی وابسته به دوز درحیوانات و انسان دارند که این اثر از طریق گیرنده‌های کانابینوییدی (CB2، CB1) انجام می‌گیرد. بعضی مطالعات نشان داده‌اند که گیرنده‌های CB2 درسیستم عصبی‌مرکزی (CNS) وجود ندارند ولی برخی محققین به حضور تعداد کم (اما با اهمیت) از این نوع گیرنده در سیستم اعصاب مرکزی اعتقاد دارند. تا به امروز مطالعه‌ای در مورد تزریق مرکزی یک آگونیست گیرنده‌ی CB2 و بررسی تأثیر بی‌دردی آن انجام نشده است. در مطالعه‌ی حاضر اثر بی‌دردی تزریق مرکزی و محیطی JWH133 به عنوان یک آگونیست گیرنده‌ی CB2 مورد بررسی قرار گرفته است.*

روش بررسی: *در این تحقیق از موش‌های سوری نر استفاده شده است. جهت بررسی اثر مرکزی دارو، ابتدا موش‌ها استریوتاکس شده و یک کانول از جنس فولاد ضدزنگ در بطن چپ مغزی حیوان قرار داده شد. پس از یک هفته، JWH133 به طور مستقیم داخل بطن مغز تزریق گردید. برای بررسی اثر محیطی، داروی JWH133 به صورت صفاقی تزریق گردید. ارزیابی درد با استفاده از روش فرمالین در موش‌ها انجام شد.*

یافته‌ها: *تزریق داخل مغزی داروی JWH133 فاقد اثر بی‌دردی بوده ولی تزریق داخل صفاقی این ماده اثر بی‌دردی نشان داده است.*

نتیجه‌گیری: *با توجه به بی‌اثر بودن تزریق مرکزی آگونیست گیرنده‌ی CB2 ، شاید بتوان پیش‌بینی کرد که در مغز موش، گیرنده‌ی CB2 مؤثر بر بی‌دردی وجود نداشته باشد.*

واژگان‌کلیدی: بی‌دردی، JWH133 ، CB2، تست فرمالین

مقدمه

تاکنون دو نوع گیرنده‌ی کانابینوییدی شامل گیرنده‌های CB1 و CB2 شناخته شده‌اند. گیرنده‌ی CB2 ده تا صد برابر گیرنده‌ی CB1 در بافت‌های مرتبط با سیستم ایمنی بدن یافت می‌شود و در لوزه و طحال به فراوانی حضور دارد. در بین سلول‌های خونی، به ترتیب لنفوسیت‌های B ، سلول‌های کشنده طبیعی (Natural Killer cell [NK]) و مونوسیت‌ها بیشترین میزان گیرنده‌های CB2 را دارا هستند(۱). تحریک

*دکترای تخصصی فارماکولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی زنجان
**دانشجوی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان

Archive of SID
www.SID.ir

گیرنده‌های CB2 موجب مهار خروج پلاسما، ادم و التهاب می‌گردد(۲). به نظر می‌رسد فعالیت ضدالتهابی آگونیست‌های CB2 در بدن، به دلیل تأثیر آن‌ها بر ماکروفاژها باشد. تتراهیدروکانابینول (THC) به عنوان یک آگونیست CB2 می‌تواند موجب مهار فعال‌سازی سلول‌های T کمکی (Th) توسط ماکروفاژها شود(۳). کانابینوییدها اثر بی‌دردی وابسته به دوز در حیوان (۴) و انسان (۵) دارند؛ این اثر از طریق هر دو گیرنده‌ی کانابینوییدی اعمال می‌شود(۲). گیرنده‌ی CB2 در حدود ۴۴ درصد اشتراک ساختاری با گیرنده‌ی CB1 دارد ولی به نظر می‌رسد که برخلاف CB1 در سیستم اعصاب مرکزی (CNS) یافت نشود(۶). برخی محققین به حضور تعداد کم (اما با اهمیت) از این نوع گیرنده در مغز اعتقاد دارند(۷). داروی JWH133 (یک آنالوگ آناندامايد) به عنوان یک آگونیست مؤثر برگیرنده‌ی CB2 شناخته شده است(۸). آزمون فرمالین به عنوان یک روش قابل قبول و استاندارد برای ارزیابی درد درحیوانات معرفی شده است(۹). پالمیتیل‌اتانول‌آمید (PEA) که یک آگونیست درون‌زاد CB2 می‌باشد، هر دو مرحله‌ی اولیه و تأخیری درد ناشی از فرمالین را مهار می‌نماید. هم‌چنین HU308 به عنوان آگونیست انتخابی CB2 درد محیطی ناشی از تزریق فرمالین را در مرحله‌ی دیررس کاهش می‌دهد(۱۰). گیرنده‌ی CB2 به وفور در بافت‌های محیطی وجود دارد و تحریک آن با عوارض جانبی- مرکزی همراه نمی‌باشد. بنابراین آگونیست CB2 قدرت بالقوه‌ای برای درمان مؤثر و بی‌عارضه‌ی اختلالات التهابی‌مزمن دارد(۱۱). از طرف دیگر گزارش‌هایی مبنی بر وجود گیرنده‌های شبه CB2 در پایانه‌ی اعصاب محیطی وجود دارد(۱۲). در مطالعه‌ی حاضر هدف ما ارزیابی تأثیر مرکزی و محیطی تزریق داروی JWH133 بر درد حاصل از تزریق فرمالین به کف پای موش سوری می‌باشد. تاکنون اثر بی‌دردی حاصل از تزریق مرکزی JWH133 مشخص نشده است. به این منظور داروی JWH133 به صورت مرکزی (تزریق داخل بطن مغزی(i.c.v)) و محیطی(داخل صفاقی(i.p)) به موش‌های سوری تزریق گردیده است.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی، از موش‌های سوری نرآلبینو نژاد (Naval Medical Research Institute [NMRI])با وزن بین ۲۰ تا ۳۰ گرم استفاده شده‌است. موش‌ها در گروه‌های ۷ تایی در قفس‌های(lexiglass) در سیکل ۱۲ ساعت روشنایی و تاریکی و دمای متوسط ۲±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شده و خوراک استاندارد دریافت می‌کرده‌اند. از هرحیوان یک بار در آزمایش استفاده شد و تمام آزمایشات بر اساس روش‌های راهنمای پیشنهادی مؤسسه‌ی مراقبت و نگهداری حیوانات انجام گردید.

داروها: داروهای مورد استفاده در این مطالعه شامل JWH133 و فرمالین بوده است. درگروه‌های شاهد سالین یا حامل JWH133 [روغن سویا ۱۰ درصد + دی‌متیل‌سولفوکساید (DMSO) یک درصد] و درگروه‌های درمانی JWH133 به صورت داخل صفاقی یا داخل بطن مغزی تزریق شده‌اند.

روش کانال‌گذاری و تزریق داخل بطن‌مغزی: موش‌ها با تزریق داخل صفاقی (Intraperitoneal [i.p]) مخلوط کتامین و زایلازین(۱۰۰/۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) بی‌هوش شدند و کانال استریل (سرسرنگ شماره‌ی ۲۳)، طی جراحی مغزی به روش استریوتاکس در بطن چپ مغز موش‌ها قرار داده شد. برای پیدا کردن محل بطن جانبی از راهنمای استریوتاکس با مختصات ۰/۹ میلی‌متر پشت نقطه‌ی برگما، ۱/۴ میلی‌متر به طرف چپ از خط وسط و ۲ میلی‌متر پایین‌تر از سطح جمجمه درحالی‌که جمجمه در

Archive of SID

www.SID.ir

حالت مسطح بود، استفاده شد. کانال‌ها به وسیله‌ی سیمان دندان‌پزشکی بر روی جمجمه جای‌گذاری و محکم شدند. موش‌ها حداقل برای یک هفته، جهت بازگشت به حالت اولیه و رفع تأثیر عمل و داروی جراحی نگهداری شدند. دارو توسط سرنگ هامیلتون همراه با لوله‌ی منعطف پلی‌اتیلنی و یک کانال تزریق از جنس استیل زنگ نزن (سرسرنگ دندان‌پزشکی شماره‌ی ۳۰)، که در زمان تزریق به میزان یک میلی‌متر پایین‌تر از کانال راهنما قرار می‌گرفت، تزریق می‌شد.

درمان دارویی: در هرگروه آزمایشی هفت حیوان مورد استفاده قرارگرفت. به گروه‌های شاهد سالین یا حامل JWH133 تزریق شد. به بقیه‌ی گروه‌ها JWH133 به صورت داخل بطن مغزی (۱و ۲/۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش) ۱۰ دقیقه قبل از تست فرمالین یا داخل صفاقی (۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن موش) ۲۵ دقیقه قبل از تست فرمالین تزریق شد. در کل، ۱۰ گروه مورد بررسی قرارگرفت که در ۴ گروه دارو به صورت داخل بطن مغزی و در۶ گروه دارو به صورت داخل صفاقی تزریق گردید، از این رو در این مطالعه، در مجموع ۷۰ حیوان مورد مطالعه قرار گرفته است.

ثبت اثر بی‌دردی: حیوانات برای مأنوس شدن با محیط آزمایشگاه، حداقل ۳۰ دقیقه قبل از تزریق در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند. ۲۵ میکرولیتر فرمالین ۲/۵ درصد با سرنگ انسولین (سرسوزن شماره‌ی ۲۶) به صورت زیر پوستی در کف پای راست موش‌ها تزریق گردید. بلافاصله بعد از تزریق فرمالین، حیوانات تک تک در محفظه‌های استوانه‌ای از جنس پلاستیک (به قطر۲۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر) روی سطح شیشه‌ای تخت قرارگرفتند، در زیر شیشه‌ی ذکر شده، آینه‌ای با زاویه‌ی ۴۵ درجه برای مشاهده‌ی واضح پاسخ به درد حیوان، قرار گرفته بود.

پاسخ به درد بلافاصله پس از تزریق فرمالین، برای مدت ۵۰ دقیقه ثبت گردید. لیسیدن یا جویدن پا نشانه‌ی پاسخ به درد درحیوان در نظر گرفته می‌شد. بررسی پاسخ به درد در دو زمان، ۵ دقیقه‌ی اول بعد تزریق(مرحله یک یا اولیه) و فاصله‌ی بین ۱۵ دقیقه تا ۵۰ دقیقه بعد از تزریق (مرحله دو یا تأخیری) فرمالین ثبت می‌گردید.

آزمون‌های آماری: برای بررسی اثر بی‌دردی از آنالیز واریانس یک طرفه، آنوا (ANOVA) و تست (Student-Newman-Keuls [SNK]) استفاده گردید. P< ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظرگرفته شد.

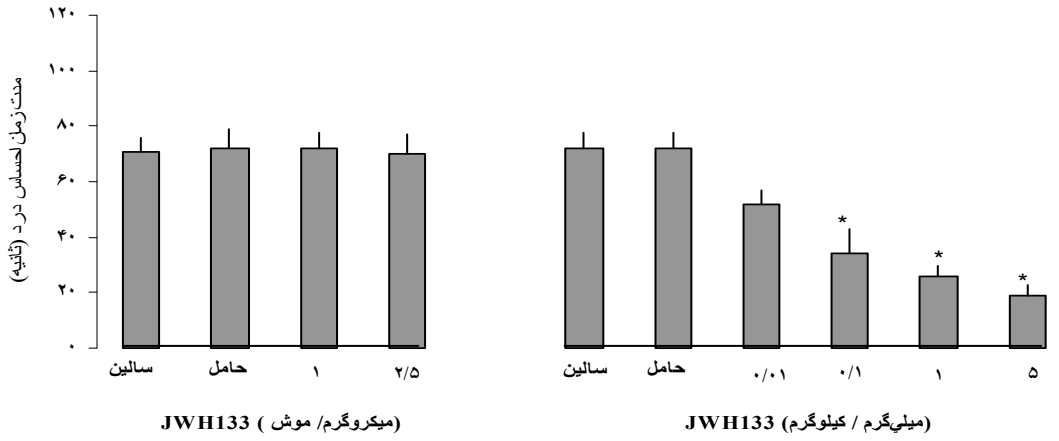
یافته‌ها

اثر تزریق مرکزی آگونیست CB2 بر تست فرمالین: آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق داخل بطن مغزی حامل JWH133 یا JWH133 (۱ و ۲/۵ میکروگرم برهرکیلوگرم وزن موش) هیچ‌گونه تأثیر بی‌دردی در مرحله‌های اول و دوم در تست فرمالین نشان نداده است (P> ۰/۰۵) (شکل۲،۱).

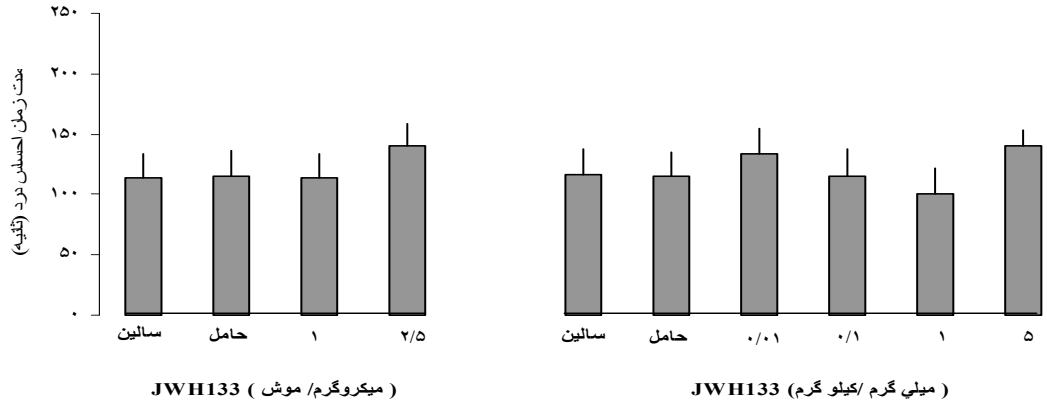
اثر تزریق محیطی آگونیست CB2 بر تست فرمالین: آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق داخل صفاقی JWH-133 (۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) اثر بی‌دردی وابسته به دوز در مرحله اول ($F(5, 36) = 13/2, P<0/0001$) تست فرمالین نشان داده است (تست نیومن کلز(P <۰/۰۵) برای دوزهای ۰/۱، ۱ و ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم) اما در مرحله تأخیری اثر بی‌دردی نشان نداد(P> ۰/۰۵) (شکل۲).

Archive of SID

www.SID.ir



نمودار۱ *: تأثیر تزریق درون بطن مغزی و داخل صفاقی JWH133 در مرحله‌ی۱ (۵ دقیقه‌ی اول پس از تزریق فرمالین به کف پای موش) ثبت بی‌دردی. هرستون بیان‌گر میانگین و خطای استاندارد حاصل از داده‌های ۷ حیوان در هر گروه می‌باشد* (P<۰/۰۵) * *در مقایسه با گروه‌های کنترل.*



نمودار۲ *: تأثیر تزریق درون بطن مغزی و داخل صفاقی JWH133 در مرحله‌ی۲ (از دقیقه ۱۵ تا ۵۰ پس از تزریق فرمالین به کف پای موش) ثبت بی‌دردی. هر ستون بیان‌گر میانگین و خطای استاندارد حاصل از داده‌های ۷ حیوان در هر گروه می باشد.*

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که تزریق داخل بطن مغزی JWH133 هیچ‌گونه اثر بی‌دردی نداشته است ولی تزریق محیطی (داخل صفاقی) دارو اثر بی‌دردی وابسته به دوزی از خود بروز می‌دهد(شکل۱،۲). داروی JWH133 به عنوان یک آگونیست اختصاصی گیرنده‌های CB2 به حساب می‌آید(۸). کانابینوییدها اثرات فارماکولوژیکی و بیوشیمیایی خود را از طریق واکنش متقابل با گیرنده‌های CB1 و CB2 اعمال می‌کنند. از جمله کاربردهای درمانی آگونیست‌های کانابینوییدی درمان

www.SID.ir

اضطراب، اسکیزوفرنی و دیس‌تونی اسپاستیک را می‌توان نام برد(۱۳). امروزه آگونیست‌های گیرنده‌ی اختصاصی CB2 چندین اثر درمانی از خود نشان داده‌اند که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به تأثیر ضددرد و اثر ضدالتهاب آن‌ها اشاره نمود(۲،۱۰، ۱۱). گیرنده‌های CB2 جزء گیرنده‌های متصل به پروتئین G می‌باشند که فعال شدن آن‌ها موجب مهار آدنیلات سیکلاز و فعال شدن پروتئین‌کینازها می‌گردد. گیرنده‌های CB2 بیشتر در سلول‌های سیستم ایمنی بروز می‌یابند(۱) ولی داده‌های حاصل از مطالعات پیشین حاکی از وجود این گیرنده‌ها بر روی نورون‌های آوران اولیه‌ی محیطی نیز می‌باشد(۱۲). مطالعات قبلی نشان داده‌اند که تزریق محیطی آگونیست‌های گیرنده CB2 می‌توانند در درمان درد مزمن نقش داشته باشد(۱۴). نتایج مطالعه‌ی اخیر نیز نشان‌دهنده‌ی اثر بی‌دردی تزریق محیطی JWH133 به عنوان یک آگونیست CB2 می‌باشد. از طرف دیگر تحریک گیرنده‌ی CB2 (به دنبال تزریق محیطی دارو) سبب مهار دردهای حاد و التهابی در یک الگوی درد نوروپاتیک شده است(۲). تصور بر این است که محل اثر گیرنده‌های CB2 در خارج از CNS و بر روی پایانه‌های محیطی نورون‌های حسی باشد(۱۵) هم‌چنین تحریک گیرنده‌های CB2 (به دنبال تزریق محیطی دارو) موجب مهار ادم و خروج پلاسما به دنبال التهاب می‌گردد(۲). مطالعات قبلی نشان می‌دهند که GW405833 به عنوان یک آگونیست انتخابی گیرنده‌های CB2، موجب مهار درد و التهاب حاد در موش شده است(۱۴). بر اساس نتایج مطالعات انجام شده، به نظر می‌رسد گیرنده‌های CB2 در مغز وجود نداشته باشند و فقط در بافت‌های محیطی بیان شوند. بنابراین می‌توان با تحریک این گیرنده‌ها یک بی‌دردی محیطی بدون آثار مرکزی ایجاد نمود. نتایج مطالعات حاضر نیز بیان‌گر تأثیرات بی‌دردی محیطی JWH133 و عدم تأثیر تزریق مرکزی این ماده می‌باشد که با نتایج مطالعات قبلی همسوست. بنابراین احتمالا علت عدم تأثیر مرکزی JWH133 با فقدان گیرنده‌ی CB2 مؤثر بر درد در مغز مرتبط باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه‌ی ما نشان می‌دهد که فقط تزریق محیطی JWH133 اثر بی‌دردی داشته و تزریق مرکزی این ماده هیچ‌گونه اثر بی‌دردی نشان نداده است که این نتایج نیز تأیید کننده‌ی عدم حضور گیرنده‌های CB2 مؤثر بر درد در مغز می‌باشند.

تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر بخشی از پایان نامه‌ی دانشجویان پزشکی می‌باشد که هزینه‌ی آن توسط معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان تأمین گردیده است. در پایان لازم می‌دانیم مراتب قدردانی خود را از آن معاونت به جهت فراهم آوردن شرایط لازم برای انجام این پژوهش اعلام داریم.

منابع

1- Galiegue S, Mary S, Marchand J, et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. ***Eur J Biochem.*** 1995; 232: 54-61.

2- Malan PT, Monhab M, Vanderah TW, Makriyanis A, Porreca F. Inhibition of pain responses by activation of CB2 Cannabiniod receptors. ***Chem Phys lipids.*** 2002; 121: 191-200.

Archive of SID
www.SID.ir

3- Griffin G, Fernando SR, Ross RA, et al. Evidence for the presence of CB2-like cannabinoid receptors on peripheral nerve terminals. ***Eur J Pharmacol.*** 1997; 339: 53-61.

4- Buxbaum DM. Analgesaic activity of 9-tetrahydrocannabinol in the rat and mouse. ***Psychopharmacologia.*** 1972; 25: 275-80.

5- Holdcroft A, Maze M, Dore C, Tebbs S, Thompson S A. Multicenter dose-escalation study of the analgesic and adverse effects of an oral cannabis extract (Cannador) for postoperative pain management. ***Anesthesiology.*** 2006; 104: 1040- 6.

6- Hough LB, Nalwalk J W, Stadel R, et al. Inhibition of improgan antinociception by the cannabinoid (CB)(1) antagonist N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H pyrazole-3-carboxamide (SR141716A): lack of obligatory role for endocannabinoids acting at CB(1) receptors. ***J Pharmacol Exp Ther.*** 2002; 303: 314- 2.

7- Hillard CJ, Manna S, Greenberg MJ, et al. Synthesis and characterization of potent and selective agonists of the neuronal cannabinoid receptor(CB1).***J Pharmacol Exp Ther.*** 1999; 289: 1427-33.

8- Ibrahim MM, Deng H, et al. Activation of CB2 cannabinoid receptors by AM1241inhibits experimental neuropathic pain: Pain inhibition by receptors not present in the CNS. ***Proc Natl Acad Sci U S A.*** 2003; 100: 10529–33.

9- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. ***Pain.*** 1977; 4: 161-74.

10- Rinaldi-Carmona M, Barth F, Millan J, et al. The first potent and selective antagonist of the CB2 cannabinoid receptor. ***J Pharmacol Exp Ther.*** 1998; 284:644-50.

11- Clyton N, Marshal FH, Bountra C, O Shaughnessy CT. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are implicated in inflammatory pain. ***Pain.*** 2002; 96: 253-60.

12- Pertwee RG. Evidence for the presence of CB1 cannabinoid receptors on peripheral neurones and for the existence of neuronal non-CB1 cannabinoid receptors. ***Life Sci.*** 1999; 65: 597-605.

13- Palmer SL, Thkar AG, Makriannis. Review cannabinergic ligands. ***Chem Phys lipids.*** 2002; 121: 3-19.

14- Valenzano KJ, Tafesse L, Lee G, et al. Pharmacological and Pharmacokinetic Characterization of the Cannabinoid Receptor 2 Agonist, GW405833, Utilizing Rodent Models of Acute and Chronic Pain, Anxiety, Ataxia and catalepsy. ***Neuropharmacology.*** 2005; 48: 658-72.

Archive of SID

www.SID.ir