

## اثرات تجویز نخاعی کپسایسین و تجویز صفاقی نالوکسان بر عملکرد ضددردی عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده گیاه ماده شاهدانه (*Cannabis sativa*)

### چکیده

دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۹ ویرایش: ۱۳۹۹/۰۳/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۲۱ آنلاین: ۱۳۹۹/۰۹/۰۱

بهرام فرهادی مقدم، مسعود فریدونی\*

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

**زمینه و هدف:** سیستم اندوکannabinویدی با سیستم‌های وانیلویدی و اپیویدی برهم‌کنش دارد. این تحقیق به بررسی اثر عصاره گل‌های حرارت‌دیده پایه ماده شاهدانه با کپسایسین در سطح نخاعی و نالوکسان در سطح سیستمیک بر شدت احساس دردهای شیمیایی و حرارتی می‌پردازد.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی در گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد، از فروردین تا اسفند ۱۳۹۳ بر روی موش‌های صحرایی نر بالغ ویستار (۲۰۰ تا ۲۵۰ g) در گروه‌های هفت‌تایی انجام گردید. افزون‌بر گروه‌های کنترل و شم، گروه‌هایی با تجویز صفاقی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی، دوز ۲ mg/kg نالوکسان و عصاره به همراه نالوکسان ارزیابی گردیدند. همچنین، گروه‌های تجویز نخاعی غلظت ۰/۱ mg/۱۰۰ μl عصاره، غلظت ۰/۰۰۲ mg/۱۰۰ μl کپسایسین و عصاره به همراه کپسایسین ارزیابی شدند. برای سنجش آستانه درد حرارتی از آزمون پرش دم و برای سنجش شدت درد شیمیایی از آزمون فرمالین استفاده شد و داده‌ها مورد بررسی آماری قرار گرفت.

**یافته‌ها:** تجویز نخاعی عصاره با کپسایسین موجب کاهش حس پردردی حرارتی ( $P < ۰/۰۰۱$ ) و شیمیایی ( $P < ۰/۰۰۱$ ) ناشی از کپسایسین گردید. از طرف دیگر تجویز صفاقی نالوکسان به همراه عصاره تأثیری بر تغییر در آستانه درد حرارتی ناشی از تجویز عصاره نداشت. در حالیکه تجویز نالوکسان شدت درد حاد شیمیایی را نسبت به گروه تیمار شده با عصاره به تنهایی افزایش داد ( $P < ۰/۰۰۱$ ).

**نتیجه‌گیری:** احتمالاً کannabinویدهای عصاره با فعال‌کردن گیرنده‌های کannabinویدی و غیرحساس نمودن گیرنده TRPV<sub>۱</sub> پردردی ناشی از کپسایسین را مهار کرده است. همچنین تجویز نالوکسان اثر ضددردی عصاره را در مرحله حاد درد شیمیایی تضعیف کرده است. گمان می‌رود عصاره بخشی از تأثیر ضددردی را از طریق گیرنده‌های اپیویدی اعمال نموده است.

**کلمات کلیدی:** آگونست‌های گیرنده کannabinویدی، شاهدانه، گیرنده اپیوید، درد، گیرنده وانیلویدی نوع ۱.

\* نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی.

تلفن: ۳۶۲۱۴۰۲۶-۰۵۱

E-mail: fereidoni@um.ac.ir

### مقدمه

به‌صورت وحشی در نواحی با آب و هوای معتدل یا گرمسیری رشد می‌کند.<sup>۱</sup> این گیاه مدت‌هاست که به‌عنوان گیاه موثر بر سیستم عصبی و حالات مربوط به استرس شناخته شده و از مشتقات آن برای هزاران سال به‌منظور اهداف دارویی نظیر ضداسپاسم، ضد‌ریشه و ضدالتهاب استفاده شده است.<sup>۲-۵</sup> ۴۸۳ ترکیب طبیعی از گیاه شاهدانه

شاهدانه (*Cannabis sativa*) گیاهی است پر برگ و گل، یک ساله و معمولاً دو پایه، به‌ندرت به‌صورت تک‌پایه یافت می‌شود، با برگ‌های پنجه‌ای شکل و دارای دسته‌هایی از گل‌های کوچک سبز که

به‌دست آمده است که ۶۶ ترکیب کانابینویدی (Cannabinoids) و بقیه غیرکانابینویدی هستند و شامل ترپنویدها (Terpenophenolic)، هیدروکربن‌ها، ترکیبات نیتروژن‌دار، کربوهیدرات‌ها، فلاونوئیدها، اسیدهای چرب، فنول‌های غیرکانابینویدی، الکل‌های ساده، آلدئیدها، کتون‌ها، اسیدها، استرها، لاکتون‌ها و سایر ترکیبات دیگر می‌باشند.<sup>۶</sup>

کانابینوئیدهای طبیعی گروهی از ترکیبات ترپنوفولیک غیرقطبی هستند که به میزان بسیار زیادی در گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه تولید می‌گردند و اصلی‌ترین آنها Tetrahydrocannabinolic acid, (THCA) و (Cannabidiolic acid, CBDA) می‌باشند.<sup>۷،۸</sup> این ترکیبات در اثر حرارت و با خروج گاز CO<sub>2</sub> دکرپوسیله شده و به فرم فعال خود یعنی (Tetrahydrocannabinol, THC) و (Cannabidiol, CBD) تبدیل می‌شوند.<sup>۸</sup>

سیستم درون‌زاد اوپیویدی شامل خانواده‌ای از پپتیدها و گیرنده‌های اوپیویدی است و گیرنده‌های این سیستم با سیستم کانابینویدی از نظر ساختار، محل و مکانیسم فعالیت مشابه یکدیگر هستند.<sup>۹</sup> به‌طوری‌که گیرنده‌های هر دو سیستم به جی پروتیین (G protein) جفت می‌شوند.<sup>۹</sup> و تحریک آنها فعالیت آنزیم آدنیل سیکلاز را مهار نموده و به‌دنبال آن میزان AMP حلقوی (cAMP) کاهش یافته، فعالیت مسیر Mitogen-activated protein kinase, (MAPK) را افزایش داده و منجر به افزایش نفوذپذیری کانال‌های پتاسیمی و کاهش ورود کلسیم به سلول می‌شود.<sup>۹</sup>

گیرنده کانابینویدی CB<sub>1</sub> و اوپیویدی  $\mu$  در نورون‌های پیش‌سیناپسی یکسانی در لامینای دو شاخ پشتی نخاع که در انتقال درد دخالت دارد حضور دارند و با فعالیت خود آزادسازی میانجی‌های درد همچون گلوتامات و استیل کولین را مهار می‌نمایند و موجب بروز اثرات ضددردی می‌گردند.<sup>۱۰،۱۱</sup>

به‌منظور بررسی فرضیه مشارکت احتمالی سیستم اوپیویدی درون‌زاد در بی‌دردی ناشی از تجویز نخاعی عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، از نالوکسان (Naloxone) به‌عنوان آنتاگونیست ممتاز گیرنده‌های اوپیویدی، استفاده گردید.<sup>۱۲</sup> در این مطالعه اثرات تجویزهای درون صفاقی دوز عصاره به تنهایی، نالوکسان به تنهایی و برهم‌کنش عصاره به همراه نالوکسان مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثرات تجویزهای نخاعی عصاره به تنهایی، محلول کپسایسین به تنهایی و برهم‌کنش عصاره به همراه کپسایسین بر درد حرارتی در آزمون پرش دم (Tail flick test) و مراحل مختلف درد شیمیایی، ناشی از تزریق فرمالین، مطالعه شد.

سیستم اندوکانبینویدی، سیستم سیگنالینگ تعدیل‌گر و درون‌زاد مشتق شده از لیپید است که در سیستم‌های عصبی مرکزی، محیطی و برخی از اندام‌ها حضور داشته و فعالیت دارد.<sup>۹-۱۱</sup> کانابینوئیدها اثرات خود را با اتصال به گیرنده‌های کانابینویدی (CB<sub>2</sub>, CB<sub>1</sub>) و غیرکانابینویدی (Transient receptor potential vanilloid1, TRPV<sub>1</sub>) هم به‌صورت مستقیم و هم در برهم‌کنش با سایر سیستم‌ها مثل سیستم‌های اوپیویدی و وانیلویدی اعمال می‌نماید.<sup>۱۲-۱۴</sup>

باتوجه به یافته‌های عنوان شده و نتایج پژوهش‌های پیشین محققین پژوهش پیش رو مشخص شد که تجویز درون صفاقی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده منجر به کاهش احساس دردهای شیمیایی، حرارتی و التهاب ناشی از تجویز کف‌پایی فرمالین در موش صحرائی با اعمال کمترین عوارض جانبی نسبت به سایر عصاره‌ها می‌گردد، این فرضیه مطرح می‌گردد که عصاره هیدروالکلی گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه، ممکن است به‌طور مرکزی و از طریق تأثیر بر نخاع موجب کاهش احساس دردهای حرارتی و شیمیایی گردد.<sup>۱۵،۱۶</sup>

از طرفی، مطالعات نشان می‌دهد، کپسایسین به‌عنوان آگونیست گیرنده‌کانال‌های کاتیونی دریچه‌دار TRPV<sub>1</sub> روی فیبرهای آوران A $\delta$  و C موجب افزایش ورود کاتیون‌های سدیم و کلسیم به درون نورون و افزایش حساسیت و تحریک‌پذیری فیبرهای عصبی می‌گردد که با آزادسازی مرکزی و محیطی میانجی‌های پپتیدی ماده P و

## روش بررسی

به منظور عصاره‌گیری، از گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه که توسط آزمایشگاه بیوسیتما تیک گیاهی تهیه و با کد هر بار یومی ۴۴۶۹۰ توسط پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی تأیید و نگهداری شده بود، استفاده گردید. ابتدا گل‌ها عاری از برگ و ساقه شده و به منظور خشک کردن در مکانی تاریک و خشک به مدت دو هفته نگهداری شدند و سپس برای هر بار عصاره‌گیری مقدار ۵۰ g از ماده خشک مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت دیده، ماده خشک به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۸۰ °C در (Oven, Razi Distribution Company, Iran) حرارت داده شد و سپس با استفاده از اتانول ۷۰٪ و روش ماسراسیون (خیساندن) (Maceration) عصاره‌گیری و سپس توسط کاغذ صافی، صاف گردید. پس از عصاره‌گیری حلال‌ها به‌طور کامل تبخیر شدند.<sup>۳۱،۳۲</sup>

جهت تجویز نخاعی، کانول‌گذاری در فضای تحت عنکبوتیه (Sub Arachnoid) براساس روشی انجام شد که Yaksh و همکاران وی در سال ۱۹۷۶ به‌کار گرفته بوده‌اند.<sup>۳۳</sup> در این روش ابتدا موش‌ها توسط تجویز درون‌صفافی کتامین (Ketamine) (۱۰۰ mg/kg) و زایلازین (Xylazine) (۲۰ mg/kg) (Alfasan-Weorden, Netherlands) بیهوش شدند. سپس موهای پشت سر حیوان تراشیده شد و سر در دستگاه استریوتاکس (Stereotax, Narishige Scientific Instrument Lab, Japan) ثابت گردید. آن‌گاه در فاصله بین گوش‌ها و به طرف پایین برشی به اندازه ۲ cm ایجاد گردید و عضلات به آرامی کنار زده شدند تا غشا اطلس اکسی‌پیتال نمایان شود. پس از سوراخ کردن این غشا، یک لوله پلی‌اتیلن ۱۰ (PE10, Becton Dickinson, Germany) به طول ۱۱ cm که در فاصله ۸ cm از یک طرف آن توسط پارافیلیم (Bemis, USA) برجستگی کوچکی ایجاد شده بود، به آرامی به فضای (Subarachnoid) وارد شد. به طوری‌که انتهای کانول بین قطعات کمربندی چهارم و پنجم قرار می‌گرفت. ۳ cm از لوله که خارج از نخاع بود جهت تجویزها استفاده گردید. پس از جراحی و کانول‌گذاری و گذشت دوره زمانی پنج تا هفت روزه به منظور بهبودی و اطمینان از سالم بودن حیوان و انجام فعالیت‌های طبیعی توسط اندام‌های حرکتی، سایر مراحل آزمایش‌ها انجام شد. به منظور تجویزها از لوله رابط و (Hamilton Syringe 50 µl, Hamilton, USA) استفاده گردید.<sup>۳۳</sup>

در این مطالعه تجربی، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (Wistar) با وزن تقریبی ۲۰۰ تا ۲۵۰ g که در حیوانخانه گروه زیست‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد در شرایط استاندارد با درجه حرارت ۲۱ °C، رطوبت ۵۰٪ و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و امکان دسترسی آزاد به آب و غذای کافی، نگهداری شدند، استفاده گردید. حیوانات به‌صورت تصادفی در دو دسته بزرگ الف: در بر دارنده پنج گروه هفت‌تایی شامل گروه کنترل (بدون تیمار)، گروه شم (دریافت کننده حلال شامل ترکیب اتانول (Ethanol, Simintak, Iran)، (Tween@ 80, Merck, Germany) و (Saline, Samenco, Iran) به ترتیب با نسبت‌های ۸:۱:۱، گروه دریافت‌کننده دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت دیده، گروه دریافت‌کننده دوز (Naloxane, 2mg/kg Caspianamin, Iran) و گروه دریافت‌کننده هم‌زمان عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و نالوکسان پس از گذشت ۲۰ دقیقه از تجویز عصاره.<sup>۳۴،۳۵</sup> تمامی تجویزها در این دسته بصورت درون‌صفافی انجام گرفت، و دسته ب: در بر دارنده پنج گروه هفت‌تایی شامل گروه کنترل (جراحی و کانول‌گذاری بدون تیمار)، گروه شم (همچون دسته الف)، گروه دریافت‌کننده غلظت ۱۰ µl / ۰/۰۱ mg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، گروه دریافت‌کننده غلظت ۱۰ µl / ۰/۰۰۲ mg محلول کیسایسین، گروه دریافت‌کننده هم‌زمان عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (۵ µl / ۰/۰۱ mg) و کیسایسین (۵ µl / ۰/۰۰۲ mg) پس از گذشت پنج دقیقه از تجویز عصاره.<sup>۳۸</sup> به‌منظور مشخص کردن غلظت تجویز نخاعی عصاره، ابتدا قطعه کمربندی نخاع که محدوده مشخص دارورسانی بود، پس از قربانی کردن حیوان، جداسازی و توزین شد (وزن تقریبی قطعه کمربندی نخاع معادل ۰/۲ g بوده است). سپس براساس وزن بخش قطعه کمربندی نخاع و دوز مؤثر تجویز صفافی (۵۰ mg/kg) که حاصل پژوهش‌های پیشین ما است، دوز قابل تجویز از طریق تناسب و معادل‌سازی تهیه شد. که بر همین اساس، تمامی تجویزهای نخاعی در حجم ۱۰ µl انجام شد و عصاره نیز در غلظت ۱۰ µl / ۰/۰۱ mg برای تجویز نخاعی مورد استفاده قرار گرفت. کلیه مراحل انجام آزمایش‌ها تحت مقررات بین‌المللی رعایت حقوق حیوانات آزمایشگاهی انجام گرفت.<sup>۳۹</sup>

(USA) و به‌دنبال آن مقایسه میانگین‌ها با آزمون Tukey و با حداقل سطح معناداری ( $P < 0/05$ ) برآورد شدند.

### یافته‌ها

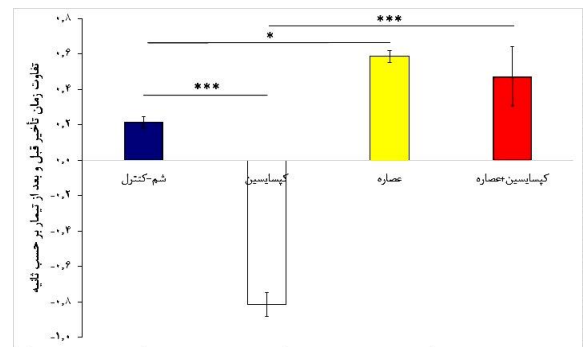
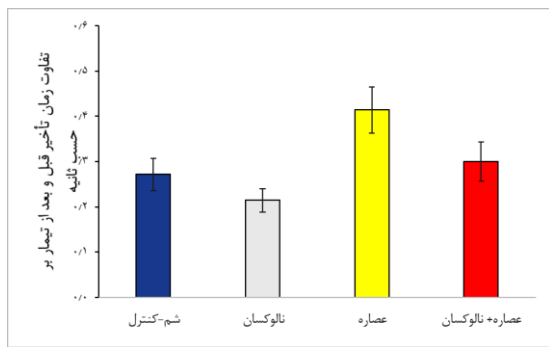
بررسی نتایج حاصل از آزمون پرش دم به‌منظور مقایسه سنجش آستانه درد حرارتی بین گروه‌های تجویز نخاعی محلول  $0/01 \text{ mg}/10 \mu\text{l}$  عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده و شم (تجویز نخاعی حلال) کنترل نشان می‌دهد که عصاره توانسته است به‌صورت معناداری ( $P < 0/05$ ) نسبت به گروه شم کنترل موجب افزایش تفاوت زمان تأخیر میان پیش و پس از تیمار در آزمون پرش دم گردد و آستانه درد حرارتی را افزایش دهد (نمودار ۱). تجویز نخاعی غلظت  $0/02 \text{ mg}/10 \mu\text{l}$  محلول کپسایسین در قیاس با گروه شم کنترل توانسته است تا به‌صورت معناداری ( $P < 0/01$ ) آستانه درد حرارتی را کاهش داده و موجب پردردی حرارتی گردد (نمودار ۱). بررسی نتایج حاصل از تجویز نخاعی عصاره ( $0/01 \text{ mg}/5 \mu\text{l}$ ) به همراه کپسایسین ( $0/02 \text{ mg}/5 \mu\text{l}$ ) مشخص می‌کند که زمان تأخیر در پرش دم نسبت به گروه کپسایسین افزایش چشمگیری ( $P < 0/01$ ) یافته است (نمودار ۱). نتایج به‌دست آمده از تحقیق پیش‌رو نشان می‌دهد که تجویز نخاعی محلول  $0/01 \text{ mg}/10 \mu\text{l}$  عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده در مقایسه با گروه شم کنترل موجب کاهش معنادار احساس درد در مراحل حاد (دقایق ۱۵-۰) ( $P < 0/01$ ) و التهابی (دقایق ۶۰-۱۵) ( $P < 0/001$ ) درد شیمیایی شده است (نمودار ۲). همچنین تجویز نخاعی غلظت  $0/02 \text{ mg}/10 \mu\text{l}$  محلول کپسایسین موجب افزایش معنادار احساس درد در مراحل حاد ( $P < 0/05$ ) و التهابی ( $P < 0/01$ ) نسبت به گروه شم کنترل شده است (نمودار ۲). تجویز نخاعی عصاره ( $0/01 \text{ mg}/5 \mu\text{l}$ ) به‌همراه کپسایسین ( $0/02 \text{ mg}/5 \mu\text{l}$ ) در مقایسه با گروه دریافت‌کننده کپسایسین توانسته است به‌صورت معناداری موجب کاهش شدت درد در مراحل حاد ( $P < 0/01$ ) و التهابی ( $P < 0/01$ ) ناشی از تجویز فرمالین گردد (نمودار ۲). سنجش آستانه درد حرارتی در گروه‌های دریافت‌کننده تجویز درون‌صفافی دوز  $50 \text{ mg}/\text{kg}$  عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده نشان می‌دهد که هر چند عصاره توانسته است آستانه درد حرارتی را در قیاس با گروه شم کنترل افزایش دهد اما این

آزمون پرش دم: برای سنجش آستانه درد حرارتی در موش صحرایی از (Tail flick test) استفاده گردید. این آزمون اولین بار توسط (Smith و D'Amour (1941) معرفی شد. در این آزمون حیوان در رستریز (Restrainer) (تیوب محدودکننده) قرار گرفت به‌صورتی که دم آن بیرون باشد. شدت نور دستگاه (Sparco, Iran) طوری تنظیم گردید که زمان متوسط پاسخدهی پایه بین چهار تا شش ثانیه باشد و زمان ۱۵ ثانیه نیز به‌عنوان زمان قطع تابش نور (Cut of time) به یک سوم میانی دم حیوان برای جلوگیری از هر گونه ایجاد آسیب بافتی، در نظر گرفته شد. زمان پاسخدهی پیش و ۳۰ دقیقه پس از تجویز درون‌صفافی عصاره‌ها اندازه‌گیری شد، این زمان حاصل میانگین سه بار اندازه‌گیری متوالی با فواصل یک دقیقه‌ای بود و این میانگین به‌عنوان آستانه درد (Tail flick latency) در نظر گرفته شد.<sup>۳۳</sup> آزمون فرمالین: مدلی معتبر برای سنجش شدت درد شیمیایی است که به رده‌های متنوعی از داروهای ضد درد حساس است.<sup>۲۰</sup> بدین صورت که پس از گذشت ۳۰ دقیقه از هر تجویز درون‌صفافی، محلول فرمالین ۲/۵٪ به میزان  $0/05 \text{ ml}$  به کف پای حیوان تزریق شد و رفتار حیوان به مدت ۶۰ دقیقه، هر ۱۵ ثانیه یک‌بار مورد بررسی و ثبت قرار گرفت.

پاسخ رفتاری در جوندگان طی آزمون فرمالین دو مرحله‌ای است. درد در مرحله اول (نوروژنیک یا درد حاد) وابسته به مکانیسم‌های نوروژنیک است و پاسخ درد در این مرحله ناشی از تحریک مستقیم فرمالین بر روی پایانه‌های عصبی محیطی می‌باشد که در صفر تا ۱۵ دقیقه اول تزریق رخ می‌دهد.<sup>۳۳،۳۴</sup> درحالی‌که مرحله دوم (دقایق ۱۵ تا ۶۰) پاسخ درد در نتیجه التهاب و آزاد شدن میانجی‌های التهابی بروز می‌کند (مرحله درد التهابی).<sup>۳۵،۳۶</sup>

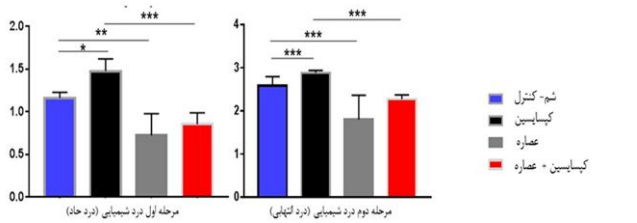
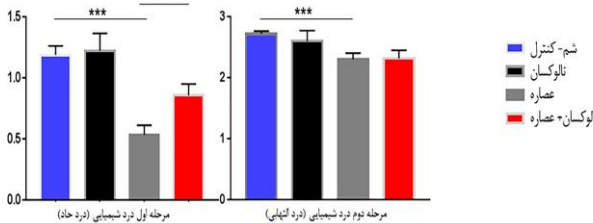
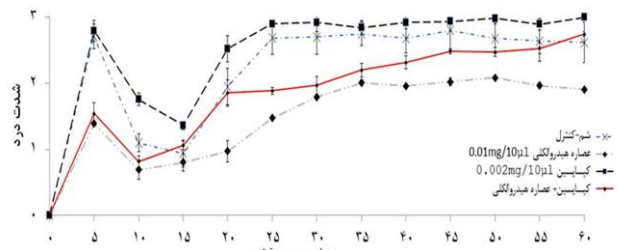
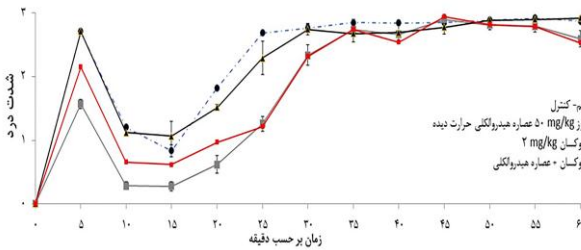
همچنین می‌توان شدت درد را در این آزمون به‌صورت کمیتی از صفر تا سه درجه‌بندی کرد، به‌طوری‌که عدد صفر زمانی است که حیوان هیچ دردی ندارد، در عدد یک حیوان در اثر درد می‌لنگد، در عدد دو حیوان پای مورد تزریق فرمالین را در تمام مدت بالا نگه می‌دارد و در عدد سه حیوان پا را به شدت تکان می‌دهد، گاز می‌گیرد یا لیس می‌زند.<sup>۳۶</sup>

نتایج به‌صورت  $\text{Mean} \pm \text{SEM}$  ارائه شدند. معناداری تفاوت بین میانگین‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و با استفاده از (GraphPad Prism, version 6, GraphPad Software, California)



نمودار ۳: مقایسه آستانه درد حرارتی بین گروه‌های شم کنترل، دریافت‌کننده صفافی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، دوز ۲ mg/kg نالوکسان و عصاره همراه با نالوکسان در آزمون پرش دم. تجویز صفافی نالوکسان آستانه درد حرارتی را کاهش داده است. تجویز صفافی عصاره توانسته است آستانه درد حرارتی را در قیاس با گروه شم کنترل افزایش دهد. تجویز عصاره همراه با نالوکسان در قیاس با گروه دریافت‌کننده عصاره موجب افزایش قابل توجهی در حساسیت نسبت به درد حرارتی نشده است. داده‌ها به صورت Mean±SEM ارایه شده و (n=۷) می‌باشد.

نمودار ۱: مقایسه آستانه درد حرارتی بین گروه‌های شم کنترل، دریافت‌کننده نخاعی غلظت معادل عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (۱۰ μl / ۰/۰۱ mg)، دریافت‌کننده نخاعی کپسایسین (۱۰ μl / ۰/۰۰۲ mg) و دریافت‌کننده نخاعی عصاره (۱۰ μl / ۰/۰۱ mg) به همراه کپسایسین (۵ μl / ۰/۰۰۲ mg) در آزمون پرش دم. تجویز نخاعی عصاره و عصاره همراه با کپسایسین موجب افزایش تفاوت زمان تأخیر پیش و پس از تیمار در مقایسه با گروه شم کنترل شده است. همچنین تجویز نخاعی کپسایسین در مقایسه با گروه شم کنترل، با کاهش قابل توجه آستانه درد حرارتی موجب پردردی شده است. سطح معناداری اختلاف در مقایسه با گروه کنترل به صورت (\*\*\* P<۰/۰۰۱) \* P<۰/۰۰۵ نشان داده شده است. داده‌ها به صورت Mean±SEM ارایه شده و (n=۷) می‌باشد.



نمودار ۴: مقایسه شدت احساس درد بین گروه‌های شم کنترل، دریافت‌کننده صفافی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده، دوز ۲ mg/kg نالوکسان و دریافت‌کننده صفافی عصاره به همراه نالوکسان در آزمون فرمالین. تفاوت معناداری میان گروه‌های شم کنترل و دریافت‌کننده نالوکسان به تنهایی وجود ندارد. اما تجویز عصاره در قیاس با گروه شم کنترل موجب کاهش شدت احساس درد در مراحل درد شیمیایی ناشی از تزریق کف پای فرمالین شد. تجویز عصاره همراه با نالوکسان موجب افزایش احساس درد در مرحله حاد در قیاس با گروه دریافت‌کننده عصاره شده است. اما تجویز عصاره همراه با نالوکسان در احساس شدت درد انتهایی تفاوت معناداری را در مقایسه با گروه دریافت‌کننده عصاره از خود نشان نمی‌دهد. سطح معناداری اختلاف در مقایسه با گروه کنترل به صورت (\*\*\* P<۰/۰۰۱) نشان داده شده است. داده‌ها به صورت Mean±SEM ارایه شده و (n=۷) می‌باشد.

نمودار ۲: مقایسه شدت احساس درد بین گروه‌های شم کنترل، دریافت‌کننده نخاعی غلظت معادل عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده (۱۰ μl / ۰/۰۱ mg)، دریافت‌کننده نخاعی کپسایسین (۱۰ μl / ۰/۰۰۲ mg) و دریافت‌کننده نخاعی عصاره و کپسایسین به همراه هم در آزمون فرمالین. تجویز نخاعی کپسایسین منجر به افزایش شدت دردهای حاد و انتهایی ناشی از تزریق کف پای فرمالین در قیاس با گروه شم کنترل شد. تجویز نخاعی عصاره به تنهایی شدت درد را در مراحل اولیه و ثانویه آزمون فرمالین در قیاس با گروه شم کنترل کاهش داده است. تجویز نخاعی عصاره همراه با کپسایسین منجر به کاهش شدت درد ناشی از تزریق کف پای فرمالین در تمامی مراحل درد نسبت به گروه دریافت‌کننده کپسایسین شد. سطح معناداری اختلاف در مقایسه با گروه کنترل به صورت (\*\*\* P<۰/۰۰۱) \*\* P<۰/۰۱) \* P<۰/۰۰۵) نشان داده شده است. داده‌ها به صورت Mean±SEM ارایه شده و (n=۷) می‌باشد.

می‌کند که تجویز نخاعی آگونیست‌های گیرنده‌های کانابینویدی حساسیت به مدل‌های درد مختلف را کاهش می‌دهد. به نحوی که استفاده از آنتاگونیست‌ها در مدلی از درد تأثیری را بر تجویز نخاعی کانابینویدها نگذاشته است.<sup>۳۹</sup> این احتمال نیز مطرح می‌شود که ممکن است عصاره در تجویز صفافی پس از جذب توسط عروق مزانتریک به کبد رسیده و در آنجا متابولیزه شده باشد و همین اتفاق می‌تواند بر اثربخشی عصاره تأثیر گذاشته باشد.<sup>۴۱</sup>

احتمال می‌رود کانابینویدهای دکربوکسیله موجود در عصاره به‌ویژه THC و CBD از راه‌های مختلف و متعددی موجب کاهش احساس دردهای حرارتی و شیمیایی شوند که مواردی بیان می‌گردد، کانابینویدهای دکربوکسیله با اتصال به گیرنده CB<sub>1</sub> در سطح مرکزی سیستم اندوکانابینویدی را فعال کرده موجب تسکین درد حاد می‌گردند.<sup>۴۲،۴۳</sup> به این صورت که فعال شدن این گیرنده باعث مهار آزادسازی گلوتامات می‌شود که در انتقال سیگنال‌های درد نقش کلیدی دارد.<sup>۴۳</sup>

کانابینویدهای دکربوکسیله به‌ویژه CBD می‌تواند به‌طور مستقیم با اتصال به گیرنده‌های TRPV<sub>1</sub> و Transient receptor potential (ankyrin 1, TRPA<sub>1</sub>) نوعی گیرنده کانال‌یونی که بر روی نورون‌های حسی قرار دارد و با محرک‌های حرارتی و شیمیایی فعال شده و در ادراک سرما و گرما شرکت دارد) فعالیت آنها را تغییر دهند.<sup>۴۴،۴۵</sup>

همچنین در مسیرهای درد و نواحی ماده خاکستری اطراف قنات مغزی و به‌ویژه بخش رسترا ل شکمی میانی بصل‌النخاع که به‌طور مستقیم با شاخ پستی نخاع در تماس است علاوه بر گیرنده‌های اپیویدی، گیرنده‌های CB<sub>1</sub> نیز حضور دارند که در برهم‌کنش با یکدیگر بر ره‌ایش گلوتامات تأثیر دارند.<sup>۴۶</sup> اتصال کانابینویدهایی چون THC به گیرنده‌های CB<sub>2</sub> می‌تواند منجر به کاهش حساسیت به تحریکات مکانیکی، حرارتی و دردهای التهابی گردد.<sup>۴۷،۴۸</sup> همچنین در ریشه پستی نخاع که منبع آوران‌های ورودی به نخاع است، گیرنده‌های CB<sub>1،2</sub> حضور دارند. مطالعات صورت گرفته بر روی اثر آنتاگونیست‌های این دو گیرنده نشان دهنده اثر گذاری غالب CB<sub>2</sub> بر سرکوب التهاب و درد التهابی است. ترکیباتی نظیر فرمالین به‌عنوان محرک درد و التهاب، منجر به تغییر آستانه درد و القای بیان فوری ژن پروتیین Fos در شاخ پستی ناحیه کمری نخاع می‌گردند.<sup>۴۹</sup> Fos پروتیینی است که می‌تواند منجر به پیشرفت درد و التهاب گردد و

افزایش معنادار نیست (نمودار ۳). تجویز صفافی دوز ۲ mg/kg نالوکسان نیز تأثیر قابل توجهی بر سطح آستانه درد حرارتی نسبت به گروه شم کنترل نگذاشته است (نمودار ۳). تجویز صفافی عصاره همراه با نالوکسان موجب افزایش قابل توجهی در آستانه درد حرارتی نسبت به گروه دریافت‌کننده عصاره نشده است (نمودار ۳). مقایسه نتایج حاصل از آزمون فرمالین پس از تجویز صفافی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده با گروه شم کنترل نشان داد که شدت درد شیمیایی در هر دو فاز نوروژنیک و التهابی کاهش معناداری ( $P < 0.001$ ) یافته است (نمودار ۴). از نظر تأثیر بر شدت مراحل متفاوت درد شیمیایی، تجویز صفافی دوز ۲ mg/kg نالوکسان در قیاس با گروه شم کنترل تفاوت معناداری را از خود بروز نداد (نمودار ۴). تجویز درون‌صفافی عصاره و نالوکسان به همراه هم توانسته است تا در مقایسه با گروه دریافت‌کننده عصاره موجب افزایش معنادار احساس شدت درد حاد ( $P < 0.01$ ) شود. اما تأثیر چشمگیری را بر شدت احساس درد التهابی ناشی از تجویز کف پای فرمالین در مقایسه با گروه دریافت‌کننده عصاره نگذاشته است (نمودار ۴).

## بحث

هر سه گروه کانابینویدهای درون‌زاد، گیاهی و صنعتی توسط سیستم اندوکانابینویدی در بدن شناسایی شده و این سیستم را تحت تأثیر قرار می‌دهند.<sup>۴۲،۴۳</sup> گیرنده CB<sub>1</sub> به‌طور غالب در سیستم عصبی مرکزی و CB<sub>2</sub> به‌عنوان گیرنده محیطی کانابینویدی در بافت‌هایی مثل بافت لنفویدی، سلول‌های خون‌ساز، سیستم ایمنی و در سیستم اعصاب مرکزی حضور دارند و در تعدیل آزادسازی سایتوکین‌های محرک نوسی سپتورها و پاسخ ایمنی به التهاب نقش دارد.<sup>۳۸</sup>

نتایج حاصل از تجویز نخاعی محلول ۱۰ μl/۰.۱ mg و صفافی دوز ۵۰ mg/kg عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده پایه ماده گیاه شاهدانه نشان داده است که این عصاره به تنهایی توانسته در مراحل مختلف درد شیمیایی اثرات ضددردی قابل توجهی از خود بروز دهد (نمودارهای ۲ و ۴). مقایسه نمودارهای ۱ و ۳ نشان می‌دهد که تجویز نخاعی عصاره نسبت به تجویز صفافی اثرات کاهشی معناداری را بر درد حرارتی ناشی از آزمون پرش دم نسبت به گروه شم کنترل از خود بروز داده است. نتایج سایر تحقیقات بیان

فعالیت کپسایسین به واسطه TRPV<sub>1</sub> را مختل می‌نماید ۲- با کاهش فسفریلاسیون کانال‌ها، خروج یون پتاسیم از سلول افزایش یافته و ورود یون کلسیم از انواع کانال‌های کلسیمی N, P, Q کاهش می‌یابد که منجر به کاهش تحریک‌پذیری و آگروسیتوز میانجی‌های مؤثر در درد و التهاب (گلوتامات، گابا، CGRP, P) از فیبرهای آوران درد در سطح نخاع می‌گردد.<sup>۱۸،۱۳</sup> به این ترتیب حضور گیرنده‌های CB<sub>1</sub> همراه با TRPV<sub>1</sub> در نورون‌های شاخ پشتی نخاع موجب می‌گردد تا در صورت فعال‌سازی گیرنده CB<sub>1</sub>، فعالیت گیرنده TRPV<sub>1</sub> تعدیل گردد.<sup>۱۳،۱۴،۱۵</sup> افزون‌ترین اثرات، کانابینوئیدها احتمالاً به‌طور مستقیم از طریق اتصال به گیرنده‌های TRPV<sub>1</sub>، این گیرنده‌ها را در سطح نخاع غیرحساس می‌نمایند.<sup>۱۶</sup> از این رو در یافته‌های این پژوهش می‌توان پیشنهاد کرد که احتمالاً کانابینوئیدهای گیاهی دکربوکسیله موجود در عصاره توانسته‌اند به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم فعالیت گیرنده‌های TRPV<sub>1</sub> را تعدیل و فعالیت نوسی سپتورهای فیبرهای C که ناشی از کپسایسین است، را کاهش داده و پردردی را مهار کنند. همچنین این گیرنده‌ها بر روی نورون‌های پرتابی (پروجکشن نورون‌ها) نیز حضور داشته و فعالیت می‌کنند.<sup>۱۵</sup>

تحقیقات انجام شده بیان می‌کند که اوپیوئیدهای درون‌زاد نظیر اندورفین و انکفالین و همچنین اوپیوئیدهای برون‌زاد نظیر مورفین مقدار قابل توجهی از اثرات ضددردی را به‌صورت مرکزی اعمال می‌کنند که نشان‌دهنده نقش سیستم اوپیوئیدی در تعدیل حساسیت به درد می‌باشد.<sup>۱۷،۱۸</sup> استرس‌های فیزیکی نظیر درد موجب افزایش سطح تولید و رهایش اوپیوئیدهای درون‌زادی نظیر انکفالین در سیستم عصبی مرکزی می‌شود که تعدیل حساسیت به درد را در پی دارد.<sup>۱۷</sup> از این رو تجویز نالوکسان می‌تواند با آنتاگونیسم کردن گیرنده‌های اوپیوئیدی ایجاد پردردی نماید.<sup>۱۹</sup> با این وجود، اینکه تجویز صفاقی دوز ۲ mg/kg نالوکسان به تنهایی بر آستانه احساس درد حرارتی و مراحل مختلف درد شیمیایی ناشی از تجویز کف پای فرمالین تأثیر معناداری را نداشته است (نمودارهای ۳ و ۴) این احتمال را مطرح می‌کند که اوپیوئیدهای درون‌زاد برای آزاد شدن نیازمند شرایط خاصی هستند که آزمون فرمالین ممکن است نتوانسته باشد شرایط و حساسیت لازم را ایجاد نماید. لازم به بیان است که سیستم اوپیوئیدی به‌طور معمول خاموش و در حالت آماده‌باش است. بنابراین مسدود کردن گیرنده‌های اوپیوئیدی با نالوکسان فقط زمانی می‌تواند مؤثر

به‌عنوان یک نشانگر در این فرآیندها شناخته می‌شود.<sup>۱۹</sup> احتمالاً کانابینوئیدهای دکربوکسیله با اتصال به گیرنده CB<sub>2</sub> و فعال‌سازی آن موجب مهار آنزیم آدنیل سیکلاز و به تبع مهار آزادسازی میانجی‌های التهابی محرک‌های نوسی سپتورها می‌گردد که به سرکوب بیان ژن پروتیین Fos و مهار تولید فاکتور رشد عصبی از ماست سل‌ها و تجمع نوتروفیل‌ها منتهی می‌شود.<sup>۱۸</sup> با توجه به سازوکارهای فوق احتمال درگیری سیستم‌های اوپیوئیدی و نیز گیرنده‌های TRPV<sub>1</sub> در بروز اثر ضددردی عصاره حرارت‌دیده گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه مشاهده شده و در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به نمودارهای ۱ و ۲ مشخص می‌شود که تجویز نخاعی کپسایسین در آزمون‌های درد شیمیایی و حرارتی ایجاد پردردی نموده است. کپسایسین با فعال کردن گیرنده‌های TRPV<sub>1</sub> روی آوران‌های نوسی سپتو فیبرهای Aδ و بدون میلین C موجب افزایش ورود یون کلسیم به سلول و آزادسازی گلوتامات و پپتیدهای عصبی CGRP و P می‌گردد که منجر به تحریک و افزایش حساسیت نورون‌های نخاع به محرک‌های درد حرارتی و ترکیبات شیمیایی می‌شود.<sup>۱۷،۱۹،۲۰</sup> آزادسازی گلوتامات با تحریک گیرنده‌های گلوتاماتی متابوتروپیکی در سطح شاخ پشتی نخاع همراه است که در ادراک درد مشارکت دارد.<sup>۲۰</sup> همچنین گلوتامات با فعال‌کردن گیرنده‌های خود موجب آزادسازی نوروپپتیدهای P و CGRP می‌شود که با تحریک گیرنده‌های نوروکینین همراه است.<sup>۲۱</sup> این گیرنده‌ها با افزایش جریان ورودی CA<sup>2+</sup> موجب کاهش آستانه شلیک و دپلاریزاسیون نورون‌های نوسی سپتو شاخ پشتی نخاع شده و بدین ترتیب نقش مهمی در انتقال درد و ایجاد التهاب ایفا می‌کنند که منجر به پردردی می‌شود.<sup>۱۷،۲۲</sup> افزون‌بر آن کپسایسین با فعال‌سازی cAMP، پروتیین کینازها را فعال کرده که با افزایش بیان آنزیم‌های COX2 و تولید پروستاگلاندین E در پیشرفت درد التهابی نقش دارد.<sup>۱۳</sup>

بررسی نتایج نشان می‌دهد که تجویز نخاعی عصاره به‌همراه کپسایسین در قیاس با تجویز نخاعی کپسایسین به تنهایی توانسته است به‌طور قابل توجهی پردردی حرارتی و شیمیایی ناشی از کپسایسین را خنثی نماید (نمودارهای ۱ و ۲). کانابینوئیدها با فعال‌نمودن گیرنده CB<sub>1</sub> احتمالاً می‌توانند به‌طور غیرمستقیم از راه‌های مختلفی پردردی ناشی از فعالیت گیرنده‌های TRPV<sub>1</sub> را کاهش دهند، ۱- احتمالاً با مهار آنزیم آدنیل سیکلاز و مهار تولید cAMP مسیر

وابسته به سیستم اوپیویدی بروز می‌دهد.<sup>۶۱،۶۲</sup> به‌همین دلیل است که نالوکسان می‌تواند به‌طور مؤثری اثرات ضددردی حاصل از کانابینوئیدها نظیر THC را تضعیف نماید.<sup>۶۱،۶۲</sup> اما نتایج حاصل از بررسی احساس درد التهابی در آزمون فرمالین (نمودار ۴) نشان می‌دهد که در مرحله درد التهابی احتمالاً فعال‌سازی گیرنده‌های CB<sub>2</sub> توسط کانابینوئیدهای موجود در عصاره موجب کاهش احساس درد شده است.<sup>۹</sup> با توجه به عدم تأثیرگذاری نالوکسان بر اثرات ضددردی عصاره در مرحله التهابی می‌توان بیان کرد که این اثرات مستقل از مکانیسم‌های ضددردی وابسته به اوپیوئیدها بوده و توسط گیرنده‌های کانابینوئیدی به‌ویژه CB<sub>2</sub> انجام شده است.<sup>۶۵،۶۹</sup> به‌این ترتیب این احتمال مطرح می‌گردد که کانابینوئیدهای دکربوکسیله شده موجود در عصاره گیاه حرارت‌دیده در این پژوهش هم افزون‌بر فعال‌کردن سیستم کانابینوئیدی به‌عنوان مسیر اصلی، سیستم اوپیویدی را نیز فعال کرده و برخی از اثرات ضددردی خود را از طریق این سیستم اعمال نموده‌اند. از این‌رو نالوکسان بخشی از اثرات ضددردی عصاره را تغییر داده است (نمودار ۴). در ادامه نتایج به‌دست آمده از این تحقیق و تأثیرات متفاوت دوزهای بسیار پایین (Ultra-low dose) برخی از ترکیبات ضددردی نظیر مورفین، می‌توان به بررسی دوزهای بسیار پایین عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده پایه ماده شاهدانه بر روند درد و التهاب پرداخت. همچنین پیشنهاد می‌شود با تجویز هم‌زمان عصاره و آنتاگونیست‌های اختصاصی گیرنده‌های TRPV<sub>1</sub>، نتایج حاصل بر آستانه احساس درد و التهاب بررسی شود تا درک بهتری از ارتباط میان عصاره و گیرنده‌های وایلوئیدی به‌دست آید. کانابینوئیدهای گیاهی دکربوکسیله شده موجود در عصاره هیدروالکلی گل‌های حرارت‌دیده در سطح نخاعی شاید با فعال‌نمودن گیرنده‌های کانابینوئیدی CB<sub>1</sub> و CB<sub>2</sub> و مهار فعالیت گیرنده‌های TRPV<sub>1</sub> موجب کاهش پردردی حرارتی و شیمیایی ناشی از تجویز نخاعی کپسایسین بشوند و در عین حال تجویز صفاقی نالوکسان می‌تواند موجب تضعیف اثرات ضددردی حاصل از تجویز صفاقی عصاره گردد که نشان‌دهنده برهم‌کنش سیستم‌های کانابینوئیدی دکربوکسیله شده و اوپیویدی در مسیر کنترل دردهای حرارتی و شیمیایی است. در مجموع تحقیقاتی از این قبیل می‌تواند به تولید داروهای ترکیبی درمان‌کننده درد منجر گردد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی تحت عنوان

باشد که سیستم پیش از آن توسط محرک‌های مناسب نظیر تحریکات الکتریکی ماده خاکستری اطراف قنات مغزی فعال شده باشد.<sup>۹۶</sup> احتمالاً در این آزمایش، درد و استرس تولید شده توسط تزریق فرمالین شرایط مناسبی را برای آزادسازی اوپیوئیدهای درون‌زاد ایجاد نکرده است.<sup>۵۸،۵۷</sup> به‌این ترتیب احتمال می‌رود که نالوکسان به تنهایی بر پاسخ‌های برخی از محرک‌های درد اثرگذار است نه بر همه آنها و یا این‌که سیستم اوپیویدی ممکن است به‌طور نسبی اثرات انتخابی بر روی مودالیت‌های حسی خاص اعمال نماید نیز احتمال دیگری است که نباید آن را از نظر دور داشت و تحقیقات بیشتری در این زمینه پیشنهاد می‌گردد. نتایج حاصل از این مطالعه مشخص می‌کند که تجویز صفاقی عصاره به همراه نالوکسان توانسته است در مقایسه با تجویز عصاره به تنهایی به‌طور قابل‌توجهی موجب افزایش شدت احساس درد شیمیایی در مرحله حاد آن گردد (نمودار ۴)، اما تأثیر چشمگیری را بر مرحله درد التهابی و آستانه درد حرارتی نسبت به گروه دریافت‌کننده صفاقی عصاره نگذاشته است (نمودارهای ۳ و ۴). مرحله حاد درد شیمیایی که به واسطه نفوذ سوزن به کف پا شروع می‌شود با فعال‌سازی فیبرهای C و Aδ همراه است اما مرحله التهابی به‌واسطه حضور فرمالین در بافت‌های محیطی است.<sup>۹۹</sup> با توجه به حضور گیرنده‌های کانابینوئیدی (CB<sub>2</sub>, CB<sub>1</sub>) و اوپیویدی (μ, κ, δ) در سیستم عصبی مرکزی (مسیرهای نخاعی و فوق نخاعی) و همچنین تمرکز گیرنده‌های کانابینوئیدی CB<sub>1</sub> و اوپیویدی در فیبرهای C و Aδ و با توجه به بررسی‌های گذشته می‌توان بیان نمود که با آنتاگونیزه کردن نوعی از گیرنده‌های اوپیویدی کاپا که گیرنده‌های کانابینوئیدی نیز با آن برهم‌کنش دارند، موجب کاهش اثرات ضددردی عصاره توسط نالوکسان در مرحله درد حاد شده است.<sup>۶۱-۶۴</sup> همچنین مطالعات دارویی نشان داده است که سیستم اوپیویدی درون‌زاد در پاسخ‌های بی‌دردی ناشی از کانابینوئیدها مشارکت دارد به‌نحوی که گیرنده‌های کاپا در سطح نخاعی موجب تقویت اثرات ضددردی مورفین توسط THC می‌گردد. این نتیجه حاصل آن است که تجویز کانابینوئیدهایی نظیر THC موجب افزایش تولید و آزادسازی پپتیدهای اوپیویدی درون‌زاد از جمله انکفالین و داینورفین در سطوح مختلف سیستم عصبی مرکزی به‌ویژه نخاع به‌عنوان ساختار اصلی کنترل پیام درد شده است و بخشی از اثرات ضددردی خود را نظیر مهار آزادسازی ماده P از طریق مکانیسم‌های



ویستار، مصوب دانشگاه فردوسی مشهد در سال ۱۳۹۳ به کد ۳۰۷۷۴ می‌باشد که با حمایت دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شده است.

"مطالعه‌ای بر اثر تجویز نخاعی عصاره گل‌های پایه ماده گیاه شاهدانه (Cannabis sativa) بر درد حرارتی و شیمیایی در موش صحرائی نژاد

## References

- Mander L, Liu H-W. Comprehensive natural products II: Chemistry and Biology; Elsevier; 2010.
- Svíženská I, Dubový P, Šulcová A. Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures a short review. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;90(4):501-11.
- Parolaro D, Realini N, Vigano D, Guidali C, Rubino T. The endocannabinoid system and psychiatric disorders. *Exp Neurol* 2010;224(1):3-14.
- Maldonado R, Valverde O. Participation of the opioid system in cannabinoid-induced antinociception and emotional-like responses. *Eur Neuropsychopharmacol* 2003;13(6):401-10.
- Comelli F, Giagnoni G, Bettoni I, Colleoni M, Costa B. Antihyperalgesic effect of a Cannabis sativa extract in a rat model of neuropathic pain: mechanisms involved. *Phytother Res* 2008;22(8):1017-24.
- Burns TL, Ineck JR. Cannabinoid analgesia as a potential new therapeutic option in the treatment of chronic pain. *Ann Pharmacother* 2006;40(2):251-60.
- Citti C, Linciano P, Russo F, Luongo L, Iannotta M, Maione S, et al. A novel phytocannabinoid isolated from Cannabis sativa L. with an in vivo cannabimimetic activity higher than Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol: Δ<sup>9</sup>-Tetrahydrocannabiphorol. *Sci Rep* 2019;9(1):1-13.
- 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.
- Cavuto P, Wittert GA. The role of the endocannabinoid system in the regulation of energy expenditure. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009;23(1):79-86.
- Haj-Dahmane S, Shen R-Y. Modulation of the serotonin system by endocannabinoid signaling. *Neuropharmacology* 2011;61(3):414-20.
- 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. *Mol Cell Endocrinol* 2012;353(1-2):29-36.
- Schoffelmeer A, Hogenboom F, Wardeh G, De Vries T. Interactions between CB<sub>1</sub> cannabinoid and μ opioid receptors mediating inhibition of neurotransmitter release in rat nucleus accumbens core. *Neuropharmacology* 2006;51(4):773-81.
- Oshita K, Inoue A, Tang H-B, Nakata Y, Kawamoto M, Yuge O. CB<sub>1</sub> 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 Pharm Sci* 2005;97(3):377-85.
- Izzo AA, Sharkey KA. Cannabinoids and the gut: new developments and emerging concepts. *Pharmacol Ther* 2010;126(1):21-38.
- Moghadam B, Fereidoni M, Asadollahi A. Effect of hexanic and hydroalcoholic extract of Cannabis sativa flowers on inflammatory paw edema in rats. *J Gorgan Univ Med Sci* 2016;17(4).
- Moghaddam F, Fereidoni M, Asadollahi, Ali. The effect of intraperitoneal administration of hydroalcoholic and hexane extracts of cannabis-based heated flowers on anxiety behavior, balance and locomotor activity in male rats. *J Yazd Shahid Sadoughi Univ Med Sci* 2016;23(10):932-42.
- 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.
- Ko M-C, Woods JH. Local administration of Δ<sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol attenuates capsaicin-induced thermal nociception in rhesus monkeys: a peripheral cannabinoid action. *Psychopharmacology* 1999;143(3):322-6.
- Rukwied R, Watkinson A, McGlone F, Dvorak M. Cannabinoid agonists attenuate capsaicin-induced responses in human skin. *Pain* 2003;102(3):283-8.
- Hunskar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987;30(1):103-14.
- Simone DA, Baumann TK, LaMotte RH. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain* 1989;38(1):99-107.
- Guo S-H, Lin J-P, Huang L-E, Yang Y, Chen C-Q, Li N-N, et al. Silencing of spinal TRPV<sub>1</sub> attenuates neuropathic pain in rats by inhibiting CAMKII expression and ERK2 phosphorylation. *Sci Rep* 2019;9(1):1-9.
- Uta D, Yoshimura M, Koga K. Chronic pain models amplify transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV<sub>1</sub>) receptor responses in adult rat spinal dorsal horn. *Neuropharmacology* 2019;160:107753.
- Schiavi S, Manduca A, Segatto M, Campolongo P, Pallottini V, Vanderschuren LJ, et al. Unidirectional opioid-cannabinoid cross-tolerance in the modulation of social play behavior in rats. *Psychopharmacology* 2019;236(9):2557-68.
- Sidhpura N, Parsons LH. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity and addiction-related behavior. *Neuropharmacology* 2011;61(7):1070-87.
- 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* 2015;232(3):590-4.
- Berntson GG, Walker JM. Effect of opiate receptor blockade on pain sensitivity in the rat. *Brain Res Bull* 1977;2(2):157-9.
- Trevisan G, Rossato MF, Hoffmeister C, Oliveira SM, Silva CR, Matheus FC, et al. Mechanisms involved in abdominal nociception induced by either TRPV<sub>1</sub> or TRPA1 stimulation of rat peritoneum. *Eur J Pharmacol* 2013;714(1-3):332-44.
- Zimmermann M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;554:221-33.
- Makkizadeh TM, Farhoudi R, Rabii M, Rastifar M. Evaluation allelopathic effect of Hemp (Cannabis sativa L.) on germination and growth of three kinds of weeds. 2011.
- Samsam Shariat S. Extraction of effective components of herbal medicine, determination and evaluation methods. Mani Press. Esfahan. Iran. pp; 1993.
- Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Behav Physiol* 1976;17(6):1031-6.
- D'amour FE, Smith DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941;72(1):74-9.
- Nalepa I, Vetulani J, Borghi V, Kowalska M, Przewłocka B, Roman A, et al. Changes induced by formalin pain in central α<sub>1</sub>-adrenoceptor density are modulated by adenosine receptor agonists. *J Neural Transm* 2010;117(5):549-58.
- Tavakoli Rod T. Morphine-induced analgesia subsequent to formalin injection in female Wistar rat. *J Basic and Clinical Pathophysiology* 2016;4(1):19-22.
- Tjølsen A, Berge O-G, Hunskar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51(1):5-17.

37. Fisar Z. Phytocannabinoids and endocannabinoids. *Curr Drug Abuse Rev* 2009;2(1):51-75.
38. Borgelt LM, Franson KL, Nussbaum AM, Wang GS. The Pharmacologic and Clinical Effects of Medical Cannabis. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 2013;33(2):195-209.
39. Romero-Sandoval A, Eisenach JC. Spinal cannabinoid receptor type 2 activation reduces hypersensitivity and spinal cord glial activation after paw incision. *Anesthesiology* 2007;106(4):787-94.
40. Lu Ce, Shi L, Sun B, Zhang Y, Hou B, Sun Ye, et al. A single intrathecal or intraperitoneal injection of CB<sub>2</sub> receptor agonist attenuates bone cancer pain and induces a time-dependent modification of GRK2. *Cell Mol Neurobiol* 2017;37(1):101-9.
41. Turner PV, Pekow C, Vasbinder MA, Brabb T. Administration of substances to laboratory animals: equipment considerations, vehicle selection, and solute preparation. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2011;50(5):614-27.
42. Cox ML, Haller VL, Welch SP. The antinociceptive effect of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in the arthritic rat involves the CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor. *Eur J Pharmacol* 2007;570(1-3):50-6.
43. Moghaddam F, Fereydoni M, Asadollahi, Ali. The effect of intraperitoneal administration of hydroalcoholic extracts of heated and unheated and hexanic extract of heated *Cannabis sativa* flowers on pain in rats. *Daneshvar Medicine* 2016;23(6):53-60.
44. Laursen WJ, Bagriantsev SN, Gracheva EO. TRPA1 channels: chemical and temperature sensitivity. *Current topics in membranes*. 74: Elsevier; 2014. p. 89-112.
45. Lowin T, Straub RH. Cannabinoid-based drugs targeting CB 1 and TRPV<sub>1</sub>, the sympathetic nervous system, and arthritis. *Arthritis Res Ther* 2015;17(1):1-13.
46. 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.
47. 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.
48. Nackley A, Makriyannis A, Hohmann A. Selective activation of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptors suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* 2003;119(3):747-57.
49. Briso EM, Guinea-Viniegra J, Bakiri L, Rogon Z, Petzelbauer P, Eils R, et al. Inflammation-mediated skin tumorigenesis induced by epidermal c-Fos. *Genes Dev* 2013;27(18):1959-73.
50. Soliman AC, Jonathan S, Coderre TJ. mGlu and NMDA receptor contributions to capsaicin-induced thermal and mechanical hypersensitivity. *Neuropharmacology* 2005;48(3):325-32.
51. Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150(3699):971-9.
52. 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.
53. Galdino G, Romero TR, Silva JFP, Aguiar DC, de Paula AM, Cruz JS, et al. The endocannabinoid system mediates aerobic exercise-induced antinociception in rats. *Neuropharmacology* 2014;77:313-24.
54. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Biochemistry Do, Jessell MBT, Siegelbaum S, et al. Principles of neural science: McGraw-hill New York; 2000.
55. Choi SI, Lim JY, Yoo S, Kim H, Hwang SW. Emerging Role of Spinal Cord TRPV<sub>1</sub> in Pain Exacerbation. *Neural Plast* 2016;2016:5954890.
56. North MA. Naloxone reversal of morphine analgesia but failure to alter reactivity to pain in the formalin test. *Life Sci* 1978;22(4):295-302.
57. Nikbakhty H, Fereidoni M, Asadollahi A. The Effect of Copper Chloride (CuCl<sub>2</sub>) on Pain and Inflammatory Paw Edema in Rats. *J Babol Univ Med Sci* 2016;18(12):64-70.
58. Tamaddonfard E, Erfanparast A, Taati M, Dabbaghi M, editors. Role of opioid system in verapamil-induced antinociception in a rat model of orofacial pain. *Veterinary Research Forum: an International Quarterly Journal*; 2014: Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
59. Yuill MB, Hale DE, Guindon J, Morgan DJ. Anti-nociceptive interactions between opioids and a cannabinoid receptor 2 agonist in inflammatory pain. *Mol Pain* 2017;13:1744806917728227.
60. Reche I, Fuentes JA, Ruiz-Gayo M. Potentiation of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol-induced analgesia by morphine in mice: involvement of  $\mu$ - and  $\kappa$ -opioid receptors. *Eur J Pharmacol* 1996;318(1):11-6.
61. Tulunay F, Ayhan I, Portoghese P, Takemori A. Antagonism by chlornaltrexamine of some effects of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol in rats. *Eur J Pharmacol* 1981;70(2):219-24.

## Effects of Intrathecal administration of capsaicin and intraperitoneal administration of naloxone on anti-nociceptive function of heated *Cannabis sativa* female flowers hydroalcoholic extract

Bahram Farhadi Moghadam  
M.Sc.  
Masoud Fereidoni Ph.D.\*

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

### Abstract

Received: 08 Jun. 2020 Revised: 15 Jun. 2020 Accepted: 11 Nov. 2020 Available online: 21 Nov. 2020

**Background:** The endocannabinoid system interacts with the vanilloid and opioid systems. The current study aims to investigate the effects of the extract obtained from the heated *Cannabis Sativa* female flower base either with capsaicin at the spinal cord level or naloxone at the systemic level on the intensity of chemical and thermal pain sensation.

**Methods:** This experimental study was performed in the Department of Biology at Ferdowsi University of Mashhad from April 2014 to March 2015 using adult male Wistar rats (200-250 g) categorized into groups of 7 animals. In addition to the control and sham (solvent of chemicals) groups, groups with intraperitoneal administration of 50 mg/kg of the hydroalcoholic extract, 2 mg/kg of naloxone alone and naloxone together with extract were investigated. Moreover, intrathecal administration groups including the concentration of 0.01 mg/ 10 µl of extract, the concentration of 0.002 mg/10 µl of capsaicin alone and the extract together with capsaicin were evaluated. To measure the thermal pain threshold, a tail-flick test was used and to measure the chemical pain intensity, the formalin test was utilized. The obtained data were analyzed statically.

**Results:** Intrathecal administration of the extract together with capsaicin led to a significant reduction of thermal hyperalgesia ( $P<0.001$ ) and chemical hyperalgesia ( $P<0.001$ ) induced by intrathecal administration of capsaicin. On the other hand, intraperitoneal administration of naloxone together with the extract did not effect on the thermal pain threshold. While the administration of naloxone increased the severity of chemical pain during the acute phase compared to the group treated with the extract alone ( $P<0.01$ ).

**Conclusion:** The phytocannabinoids of the flower extract may have inhibited capsaicin-induced hyperalgesia via cannabinoid receptors activation and the TRPV<sub>1</sub> receptor desensitization. Naloxone administration has also been able to attenuate the analgesic effect of hydroalcoholic flower extract during the acute phase of chemical pain. Probably the extract is thought to exert part of its effect on pain through opioid receptors.

**Keywords:** cannabinoid receptor agonists, *cannabis sativa*, opioid receptor, pain, transient receptor potential vanilloid 1.

\* Corresponding author: Department of  
Biology, Faculty of Sciences, Ferdowsi  
University of Mashhad, Mashhad, Iran.  
Tel: +98-51-36214026  
E-mail: fereidoni@um.ac.ir