

Original Article

Evaluating the effect of HU-210 on cytokines profile and the clinical signs in the experimental model of multiple sclerosis

Aarabi MH¹, Shahaboddin ME^{1*}, Parastouei K¹, Motallebi M², Jafarnejad A¹, Mirhashemi SM¹, Hamidi Gh³, Alvani Sh⁴

1- Research Center for Biochemistry and Nutrition in Metabolic Diseases, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

2- Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

3- Physiology Research Center, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

4- Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, Kashan University of Medical Sciences, Kashan, I. R. Iran.

Received January 2, 2011; Accepted June 18, 2012

Abstract:

Background: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the CNS. Recent studies have described the anti-inflammatory and immunomodulatory properties of cannabinoids. One of the synthetic components that activate cannabinoid receptors is HU-210. This study aimed to examine the effect of HU-210 on cytokines profile and the clinical signs of the disease in the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

Materials and Methods: In this experimental study, 48 male C57BL/6 mice were immunized with 250 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide (MOG35–55). Different doses of HU-210 (3, 10, 30 mg/kg, i.p.) were administered for 17 days (every other day) in the 3 groups of mice, respectively. The clinical status of mice during the study was evaluated using the clinical score tests. The animals were sacrificed at the 17th day of treatment and then the serum TNFα, IL-12 and IL-4 levels were measured using the ELISA method.

Results: Results showed that the HU-210-treated mice, especially with a dose of 30 mg/kg, had significantly less clinical score of EAE than the non-treated EAE-induced mice. The administration of HU-210 (30 mg/kg) in the EAE-induced mice significantly decreased the serum TNFα and IL-12 levels. Moreover, the serum IL-4 level was increased significantly in the mice treated with three doses of HU-210 (3, 10, 30 mg/kg) compared to those treated with phosphate.

Conclusion: HU-210, which triggers the stages of an immunological cascade, has a beneficial effect in the EAE. This drug can be used for the acute phase of MS.

Keywords: Multiple sclerosis, HU-210, Cytokines, Cannabinoids

* Corresponding Author.

Email: shahabdin@kaums.ac.ir

Tel: 0098 361 555 0021

Fax: 0098 361 555 1112

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences March, 2013; Vol. 17, No 1, Pages 1-7

Please cite this article as: Aarabi MH, Shahaboddin ME, Parastouei K, Motallebi M, Jafarnejad A, Mirhashemi SM, et al. Evaluating the effect of HU-210 on cytokines profile and the clinical signs in the experimental model of multiple sclerosis. Feyz 2013; 17(1): 1-7.

بررسی اثر HU-210 بر پروفایل سایتوکاین‌ها و عالیم بالینی در مدل تجربی مولتیپل اسکلروزیس

محمدحسین اعرابی^۱، محمداسماعیل شهاب الدین^۲، کریم پرستویی^۳، میترا مطلبی^۴، اکبر جعفرنژاد^۵، سیدمهדי میرهاشمی^۶، غلامعلی حمیدی^۷، شکوفه الوانی^۸

خلاصه:

سابقه و هدف: مولتیپل اسکلروزیس یک بیماری التهابی مزمن می‌باشد که با دمیله شدن سیستم عصبی مرکزی همراه است. مطالعات اخیر خواص مفید ضد التهابی و تعديل کننده این سیستم اینمی کانابیوتئیدها را گزارش کرده‌اند. یکی از ترکیبات دست‌ساز فعال کننده گیرنده‌های کانابیوتئیدها HU-210 است. مطالعه حاضر برای ارزیابی اثر بخشی درمان با HU-210 بر پروفایل سایتوکاین‌ها و عالیم بالینی بیماری در مدل انسفالومیلت اتوایمیون تجربی (EAE) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ۴۸ سر موش نر نژاد C57BL/6 استفاده شد. برای القاء EAE، مقدار ۲۵۰ میکروگرم پیتید MOG35-55 به هر موش تزریق گردید. در ۳ گروه موش‌های مبتلا به EAE بدترتب با دوزهای ۳۰، ۱۰، ۳ mg/kg به مدت ۱۷ روز به صورت یکروز در میان با HU-210 داخل صفاقی تیمار شدند. وضعیت بالینی موش‌ها در طول مطالعه با آزمون امیازات بالینی ارزیابی شد. موش‌ها در روز هفدهم تیمار کشته شده و سطح TNFα، IL-12 و IL-4 سرمی آنها با روش الیزا اندازه‌گیری شد.

نتایج: تجویز HU-210 به موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش شدت بیماری از نظر تست امیاز بالینی بالاخص در دوز ۳۰ میلی‌گرم می‌شود. آنالیز داده‌ها در مورد فاکتورهای ایمونولوژیک نشان داد که تیمار با دوز ۳۰ mg/kg در موش‌های مبتلا باعث کاهش معنی‌دار TNFα و IL-12 سرمی شود. هم‌چنین، هر سه دوز تیمار موجب افزایش معنی‌دار IL-4 در موش‌های مبتلا در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE دریافت کننده بافرسفات می‌شوند.

نتیجه‌گیری: HU-210 با اثرگذاری بر آبشار ایمونولوژیک تاثیر مفیدی را در مدل EAE ایجاد می‌کند و پیشنهاد می‌شود که از پتانسیل این دارو برای درمان فاز حاد مولتیپل اسکلروزیس استفاده شود.

واژگان کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، HU-210، سایتوکاین‌ها، کانابیوتئیدها

دو ماهنامه علمی- پژوهشی فیض، دوره هفدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۲، صفحات ۱-۷

در برخی مطالعات نشان داده شده است که کانابیوتئیدها موجب کاهش تحلیل عصبی پیش رونده می‌شوند [۳]. تحقیقات اولیه مرتبط با کانابیوتئید با استفاده از ماده فعال ماری جوانا (ترا هیدرو کانابینول، THC) انجام پذیرفت. مطالعات بر روی ساختار WIN55,212-2 و CP55,940 و HU-210 توان به ۳-[1,1-dimethylheptyl] شیمیایی-(-)-[11-hydroxy-delta8-tetrahydrocannabinol] (متصل به گروه کانابیوتئیدهای کلاسیک است که در ساختار آن بنزوپیران سه حلقه‌ای وجود دارد [۶,۴]. خاصیت چربی دوستی قابل توجه HU-210 به آن اجازه می‌دهد که از سد مغزی خونی عبور کند. امروزه دو نوع گیرنده مختلف کانابیوتئید از بافت‌های پستانداران شناسایی و کلون شده است. گیرنده CB1 که به طور عمده در سیستم عصبی مرکزی و بیضه‌ها یافت می‌شود [۷] و گیرنده CB2 که محیطی است و در سیستم اینمی یافت می‌شود [۸]. کلون کردن

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خود اینمی پیش-رونده و مزمن سیستم اعصاب مرکزی بوده و با از بین رفتن غلاف میلین سلول‌های عصبی همراه است که متعاقب آن هدایت ایمپالس‌ها در این اعصاب دچار نقص می‌شود. بیمارانی که مبتلا به این بیماری هستند دچار اسپاسم‌های عضلانی در دنک، عدم تعادل در راه رفتن، ضعف یا فلج، بیوست و از دست دادن کترنل مثانه می‌شوند [۱, ۲].

دانشیار مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان^۱، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان^۲، کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان^۳، دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان^۴، کارشناس ارشد سم شناسی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان^۵

***لشانی نیمسنده معلمولیه:** کاشان، کیلومتر ۵ بلوار قطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک^۶، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک^۷، دورنویس، ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲، shahaboddin@kaums.ac.ir

تلفن: ۰۳۶۱ ۵۵۵۰۰۲۱

تاریخ پذیرش نهایی: ۰۹/۰۳/۲۹

تاریخ دیافت: ۱۰/۰۱/۸۹

شاهد دار تصادفی شده بود که بر روی ۴۸ سر موش نر نژاد C57BL/6 با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته و وزن ۱۶-۲۲ گرم انجام شد که از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی انسیتو پاستور خریداری شده بودند. غذای استاندارد موش آزمایشگاهی و آب شهری در ظروف مخصوص در دسترس آنها قرار گرفت و کلیه ملاحظات اخلاقی برطبق آین نامه کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کاشان در مورد تحقیق برروی حیوانات در نظر گرفته شد.

جهت تعیین اثر HU-210 بر روند بیماری EAE، ۴۸ سر موش هفت روز قبل از شروع مطالعه، به طور تصادفی به ۸ گروه ۶ تایی با شرایط سنی و وزنی یکسان به صورت زیر تقسیم شدند: گروه‌های ۱ و ۲ و ۳- شامل موش‌هایی که پس از ایجاد EAE به مدت ۱۷ روز به صورت یکروز در میان بهتریب مقادیر ۳ و ۱۰ و ۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن HU-210 دریافت کردند. گروه ۴- میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) دریافت کردند. گروه ۵- کنترل: موش‌های سالمی که هیچ گونه تزریقی در آنها صورت نگرفت. گروه‌های ۶ و ۷- گروه کنترل: موش‌های سالمی که به مدت ۱۷ روز به صورت یک روز در میان بهتریب مقادیر ۳ و ۱۰ و ۳۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن HU-210 را همراه با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) دریافت کردند.

گروه ۸- گروه کنترل: شامل موش‌هایی که پس از ایجاد EAE به مدت ۱۷ روز به صورت یک روز در میان مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) دریافت کردند. به منظور ارزیابی علائم بالینی در موش‌ها تست clinical score انجام پذیرفت. القاء EAE: به منظور القاء EAE، مقدار ۲۵۰ میکرو گرم پپتید Myelin (Oligodendrocyte Glycoprotein) MOG35-55 NH2-MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-توالی- (OH) خریداری شده از شرکت ALEXIS را در ۱۵۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۱۵۰ میکرولیتر ادجوانات کامل فروند (شرکت Sigma) مخلوط کرده و به صورت زیر جلدی به هر موش تزریق گردید. پپتید مذکور خاصیت آنسفالیتوژنیک داشته و باعث تحریک پاسخ ایمنی بر علیه پروتئین‌های دارای سکانس مشابه در مغز می- گردد. مقدار ۴۰۰ نانو گرم Pertusis toxin در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات حل شده و در زمان صفر و ۴۸ ساعت بعد از ایمونیزاسیون به صورت داخل صفاقی تزریق شد. این سم باعث افزایش نفوذپذیری سد خونی مغزی می‌شود [۲۱]. روند بیماری روزانه با تست clinical score مورد بررسی قرار گرفت [۲۲] و موش‌هایی که امتیاز ۱ را کسب کردند، به عنوان موش مبتلا به EAE در نظر گرفته شدند.

گیرنده‌های CB1 و CB2 منجر به شناسایی مکانیسم مولکولی اتصال لیگاند به گیرنده، انتخابی بودن گیرنده‌ها و نوع فعالیت آنها گردید. گیرنده‌های کانابینوئیدی متعلق به گروهی از گیرنده‌های حساس به سم سیاه سرفه و جفت شونده با G پروتئین هستند و موجب فعال شدن سیستم‌های انتقال پیام داخل سلولی از جمله مهار آدنیلات سیکلаз و تحریک آپشار MAP کیناز می‌شوند [۹-۱۲]. HU-210 دارای توانمندی بیشتری نسبت به THC برای اتصال به گیرنده‌های CB1 عصبی و مهار آدنیلات سیکلاز است [۱۳، ۷]. کانابینوئیدها با مهار عملکرد سیستم ایمنی مرتبط بوده و اکثر مطالعات حیوانی نشان داده‌اند که اثر مهار کنندگی کانابینوئیدها وابسته به دوز است و این فعالیت به طور عمده به فعال شدن گیرنده‌های CB2 نسبت داده می‌شود که اغلب منحصر به سلول‌های ایمنی محیطی از جمله لنفوцит‌ها، ماکروفاژ‌ها و ماست سل هاست [۱۵، ۱۴]. HU-210 فاز تکثیری پاسخ ایمنی هومورال را از طریق اختلال در سنتز لنفوцит‌های B سرکوب کرده و موجب مهار فعالیت ماکروفاژ‌ها می‌شود. با این حال، اطلاعات جدید نشان می‌دهد که اثر مهار کنندگی سیستم ایمنی توسط کانابینوئیدها باید مورد بررسی مجدد قرار بگیرد [۱۷، ۱۶].

HU-210 ۱۰۰ تا ۵۰۰ برابر قوی تر از THC باعث تسکین درد و هیپوترمی در موش‌ها می‌شود [۱۸]. نشان داده شده است که HU-210 منجر به کاهش تولید سایتوکاین‌های التهابی و افزایش تولید ایترولوکین ۱۰ ضد التهابی در موش‌های آلووده به کورینه باکتریوم می‌گردد [۱۹]. مکانیسم‌های توصیف شده فوق همراه با پروفایل ایمن دارو، مشوق ما در ارائه این فرضیه گردید که استفاده از HU-210 می‌تواند به عنوان یک رویکرد درمانی جدید برای آسیب نوروولوژیک در MS مفید باشد. مطالعه حاضر برای ارزیابی اثر experimental HU-210 در مدل (autoimmune encephalomyelitis (EAE شد. همراه با التهاب و دمیلینه شدن سیستم اعصاب مرکزی بوده و پس از حساس نمودن حیوانات آزمایشگاهی توسط آنتی- ژن‌های میلین یا myelin oligodendrocyte glycoprotein (mog) (بوجود می‌آید [۲۰]. این مدل حیوانی به عنوان یک آنالوگ بیماری مالتیپل اسکلروزیس انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه ما اثر HU-210 را به عنوان یک آگونیست گیرنده کانابینوئیدی بر پروفایل سایتوکاین‌ها و علائم بالینی بیماری در مدل EAE موش مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه از نوع مطالعه تجربی

صورتی که در دوز ۳ و ۱۰ میلی‌گرم این اختلاف معنی‌دار نیست $P1=0.296$ ، $P2=0.912$. نمودار شماره ۳ نتایج حاصل از تجویز HU-210 بر میزان TNF α را نشان می‌دهد. تیمار با دوز ۳۰ میلی‌گرم HU-210 در موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش معنی‌دار در میزان TNF α در مقایسه با موش‌های مبتلا که با فسفات دریافت کردند، می‌شود ($P<0.001$). با این حال، هر سه دوز ۳۰، ۱۰، ۳ mg/kg HU-210 باعث افزایش معنی‌داری در فاکتور ضد التهابی IL-4 موش‌های مبتلا در مقایسه با گروه ۴ (موش‌های سالمی که هیچ گونه تیماری را نداشتند) و گروه ۸ (موش‌های سالمی که هیچ گونه تیماری را نداشتند) و گروه ۴ ($EAE + pbs$) می‌شود ($P1=0.002$ ، $P2<0.001$). البته جالب توجه است که این افزایش در گروه ۳ (مبتلا به بهترتب). این موش‌ها در مقایسه با موش‌های سالم فاقد تیمار نتفاوت معنی‌داری ندارند. هم‌چنین، در این مقایسه، فاکتورهای التهابی نیز تفاوت معنی‌داری ندارند. هم‌چنین، در حالی که تزریق سه دوز دارو به موش‌های سالم، فاکتور ضد التهابی IL4 را به طور معنی‌داری در مقایسه با موش‌های سالم تیمار نشده افزایش داد ($P1<0.001$ ، $P2<0.001$). $P3<0.001$ بهترتب).

بحث

نتایج این مطالعه نشان دهنده وجود اثرات مثبت EAE+3 mg HU-210 بر علائم بالینی EAE و پروفایل سیتوکین ها است که می تواند در کاهش التهاب ناشی از EAE موثر باشد. نتایج این مطالعه در مورد علائم بالینی نشان داد که امتیاز علائم بالینی در گروه mgHU-210 افزایش شده است. این اثرا را با گروه شاهد EAE+pbs (EAE+pbs) دارد. اما این اختلاف بین گروه های دریافت کننده HU-210 در دوز ۱۰ mg/kg و ۳ دیده نشد. به نظر می رسد تزریق داخل صفاتی HU-210 در دوز ۳۰ mg/kg در روز پنجم پس از ایجاد EAE می تواند باعث کاهش شدت بیماری تا ۳۷ درصد شود (شکل شماره ۱). اختلاف بین گروه ۳ با گروه شاهد (EAE+pbs) در روزهای ۱۷، ۹، ۷، ۵، ۱۳، ۱۱، ۱۵ معنی دار است ($P < 0.05$). اما گروه ۱ (EAE+3 mg HU-210) با گروه شاهد فقط در روز نهم اختلاف معنی داری را نشان می دهد ($P = 0.016$). آنالیز داده های این مطالعه نشان می دهد که تزریق این ترکیب در دوز ۱۰ mg/kg ۱۰ پس از ایجاد EAE در موش ها موجب کاهش علائم بالینی می شود، اما این کاهش در هیچ کدام از روز ها معنی دار نیست.

آزمایشات انجام شده

تست EAE clinical score: علایم بالینی روز ۲۴-۲۲

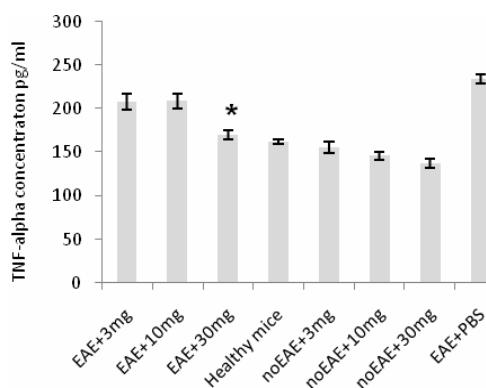
پس از القای بیماری ظاهرشد و شدت بیماری از صفر (عدم ابتلا به بیماری)، نیم (ضعف نسبی دم یا از دست دادن خفیف تونوسیته عضله دم)، یک (ضعف و شل شدن دم)، یک و نیم (مشکل خفیف در راه رفتن)، دو (فلج خفیف پاهای عقب)، دو و نیم (فلج مشخص پاهای عقب و کشیدن پاهای)، سه (فلج اندام‌های تحتانی)، سه و نیم (فلج اندام‌های تحتانی و فلنج خفیف دست‌ها)، چهار (فلج کامل دست‌ها و پاهای به طوری که حیوان قادر به حرکت نیست)، پنج (در حال مرگ یا مرگ به خاطر القاء MS) درجه‌بندی شد [۲۳-۲۸]. اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی التهابی و ضد التهابی: موش‌ها در روز هفدهم تیمار، کشته شده و پس از جمع آوری خون، سرم آنها جدا گشت و پس از آن سطح TNF α ، ایترلوکین ۱۲ (IL-12) به عنوان فاکتورهای ایمنی التهابی و سطح ایترلوکین ۴ (IL-4) به عنوان فاکتورهای ایمنی، ضد التهابی، با روش، الایرا اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS انجام پذیرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از one-way ANOVA و تست مکمل Tukey استفاده شد. بهمنظور بررسی تغییرات شدت بیماری در روزهای مختلف نیز از روش اندازه‌گیری تکراری ($P < 0.05$) (Repeated Measurement) استفاده گردید و به عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظر گرفته شد.

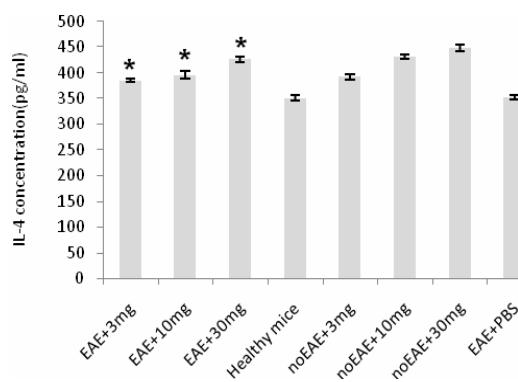
نتائج

نتایج مرتبط با اثر تجویز HU-210 به صورت داخل صفاقی به موش‌های مبتلا به EAE (مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس) بر علاوه بالینی آن در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج این بررسی با استفاده از تست Repeated Measurement نشان می‌دهد که تجویز HU-210 به صورت داخل صفاقی به موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش شدت بیماری از نظر تست امتیاز بالینی بالاخص در دوز ۳۰ میلی‌گرم می‌شود. نتایج حاصل از تاثیر HU-210 بر میزان IL-12 در موش‌های تحت مطالعه در شکل شماره ۲ تماش داده شده است. نتایج آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری را در مورد فاکتورهای التهابی بین گروه‌ها نشان داد ($P=0.042$). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که EAE تیمار با دوز ۳۰ میلی‌گرم HU-210 در موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش معنی‌دار میزان IL-12 در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE که با فسیفات داریافت کردند، می‌شود ($P=0.012$). د.



نمودار شماره ۳- اثر دوزهای مختلف HU-210 بر غلظت TNF α در موش‌های تحت مطالعه.

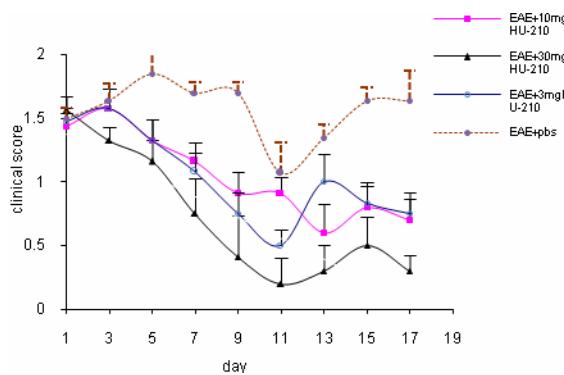
* تیمار با دوز ۳۰ میلی‌گرم HU-210 در موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش معنی‌دار میزان TNF α در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE که با فرفسفات سالین دریافت کردند می‌شود ($P<0.001$).



نمودار شماره ۴- اثر دوزهای مختلف HU-210 بر غلظت IL-4 در موش‌های تحت مطالعه.

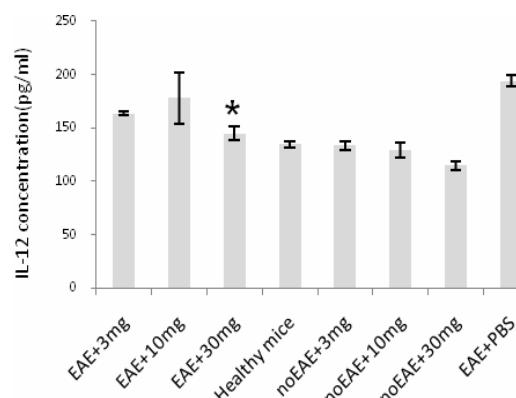
* تیمار با دوز ۳ و ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم HU-210 در موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش معنی‌دار میزان IL-4 در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE که با فرفسفات دریافت کردند، می‌شود ($P1=0.002$, $P2<0.001$, $P3<0.001$ به ترتیب).

با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان بیان کرد که اثر HU-210 وابسته به دوز می‌باشد. در مطالعه حاضر نتایج مانشان داد که در مدل EAE هنگامی که HU-210 بلافرضه ای از ایجاد EAE با دوز ۳۰ mg/kg تجویز می‌شود، موجب کاهش شدت بیماری از لحاظ امتیازات بالینی بین ۸۱ تا ۳۷ درصد شده و بیشترین کاهش شدت بیماری در روز ۱۱ و ۱۷ دیده می‌شود ($P=0.003$, $P=0.009$ به ترتیب). در مطالعه Buccellato و همکاران اثر عصاره کانابیوئیدها بر عملکرد حرکتی موش‌های مبتلا به EAE بررسی شد و نتایج این مطالعه نشان داد که فاز عود بیماری به طور



نمودار شماره ۱- اثر دوزهای مختلف HU-210 بر امتیاز بالینی موش‌های مبتلا به EAE. EAE+3mg HU-210 (گروه ۱) موش‌های مبتلا به EAE را در دوز ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. امتیازات بالینی در این گروه در روز نهم با گروه ۸ اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P=0.016$). EAE+10mg HU-210 (گروه ۲) موش‌های مبتلا به EAE را در دوز ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. امتیازات بالینی در این گروه در مقایسه با گروه ۸ در هیچ‌کدام از روزها اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. EAE+30mg HU-210 (گروه ۳) موش‌های مبتلا به EAE را در دوز ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. تزریق داخل صفاقی HU-210 در دوز ۳۰ mg/kg در روز پنجم پس از ایجاد EAE می‌تواند باعث کاهش شدت بیماری تا ۳۷ درصد شود. اختلاف بین این گروه با گروه شاهد (EAE+pbs) در روزهای ۵، ۷، ۱۱، ۱۳، ۱۵ معنی‌دار است ($P<0.05$).

EAE+pbs (گروه ۸) موش‌های مبتلا به EAE را دریافت کردند.



نمودار شماره ۲- اثر دوزهای مختلف HU-210 بر غلظت IL-12 در موش‌های تحت مطالعه.

* تیمار با دوز ۳۰ میلی‌گرم HU-210 در موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش معنی‌دار میزان IL-12 در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE که با فرفسفات دریافت کردند، می‌شود ($P=0.012$).

با مکانیسم مشابه موجب بهبود علائم EAE در موش‌های تحت مطالعه می‌شود. در حال حاضر دقیقاً مشخص نیست که این گیرنده‌ها چگونه به اینی زایی TH1 مرتبط هستند. ممکن است که اثرات مرکزی که با واسطه CB1 انجام می‌شود از طریق محور آدرنال - هیپوفیز - هیپotalاموس عمل کرده و بنابراین فعالیت TH1 را تحت تاثیر قرار دهد [۲۶]. از سوی دیگر ممکن است گیرنده‌های CB2 که در سلول‌های اینمی بیان می‌شوند، در کنترل سایتوکاین‌های محیطی و بلوغ سلول ۱ TH نقش داشته باشند [۲۷]. اکثر تحقیقات انجام شده در مورد کانابینوئیدها در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهند که سرکوب‌کنندگی سیستم اینمی وابسته به دوز است و این کاهش فعالیت به‌طور عمده به فعال سازی گیرنده‌های CB2 نسبت داده می‌شود که غالباً به‌طور اختصاصی بر روی سلول‌های محیطی نظری لنفوسيت‌ها، ماکروفاژها و ماست‌سل‌ها بیان می‌شوند [۲۸،۸]. تصور می‌شود که در مطالعه ما HU-210 بالاخص در دوز ۳۰ mg/kg موجب مهار فعالیت ماکروفاژها می‌شود و به‌علت ظرفیت ماکروفاژها به‌عنوان سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌زن و تولید‌کننده پروتئین‌های تنظیمی مثبت و منفی، می‌توان بیان کرد که این ترکیب می‌تواند موجب سرکوب سیستم اینمی گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر ثابت می‌کند که HU-210 با اثرگذاری بر آبشار ایمونولوژیک که پس از القای EAE بوجود می‌آید، تاثیر مفیدی را در مدل EAE ایجاد کرده و پیشنهاد می‌شود که از پتانسیل این دارو برای درمان فاز حاد MS استفاده شود.

تشکر و قدردانی

مقاله فوق حاصل طرح تحقیقاتی مصوب پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کاشان با شماره ۸۶۴۴ می‌باشد. بدین وسیله از این معاونت محترم تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

- [1] Barnett MH, Prineas JW. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Ann Neurol* 2004; 55(4): 458-68.
- [2] Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2008; 372(9648): 1502-17.
- [3] Zajicek JP, Sanders HP, Wright DE, Vickery PJ, Ingram WM, Reilly SM, et al. Cannabinoids in multiple sclerosis (CAMS) study: safety and efficacy data for 12 months follow up. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005; 76(12): 1664-9.
- [4] Bologov A, Gafni M, Keren O, Sarne Y. Dual Neuroprotective and Neurotoxic Effects of Cannabinoid Drugs in Vitro. *Cell Mol Neurobiol* 2011; 31(2): 195-202.
- [5] Geiger S, Nickl K, Schneider EH, Seifert R, Heilmann J. Establishment of recombinant cannabinoid receptor assays and characterization of several natural and synthetic ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010; 382(2): 177-91.

قابل توجهی کاهش می‌باید [۲۳]. در یک مطالعه دیگر Wirguin و همکاران اثر کانابینوئیدی را به نام دلتا ۸ ترا هیدروکانابینول در EAE مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که دوز ۴۰ mg/kg ۲۱ روز پس از القای EAE موجب کاهش بروز شدت EAE می‌شود [۲۴]. نتایج این مطالعه در مورد پروفایل سایتوکاین‌ها نشان داد که دوز HU-210 در دوز ۳۰ mg/kg باعث کاهش معنی‌دار سطح سایتوکین‌های التهابی TNF α و ایترلوکین ۱۲ (IL-12) در مقایسه با گروه شاهد شد. تیمار با دوز ۳۰ mg/kg به اندازه‌ای در کاهش IL-12 موثر بود که اختلاف معنی‌داری بین گروه ۳ (گروه مبتلا به EAE دریافت کننده تیمار با دوز ۳۰ mg/kg) و گروه ۴ (موش‌های سالم که هیچ گونه تیماری را نداشتند) مشاهده نمی‌شود (شکل‌های شماره ۲ و ۳). تزریق دارو در موش‌های سالم اثرات منفی بر علائم بالینی و سایتوکاین‌های التهابی اندازه‌گیری شده نشان نداد و حتی در هر سه دوز باعث افزایش معنی‌داری در فاکتور ضد التهابی IL4 در مقایسه با موش‌های سالم تیمار نشده گردید ($P1 < 0.001$, $P2 < 0.001$, $P3 < 0.001$). و هم‌چنین تزریق HU-210 در هر سه دوز ۳۰, ۱۰, ۳ mg/kg باعث افزایش معنی‌دار سطح ایترلوکین ۴ (IL-4) به‌عنوان فاکتور اینمی ضد التهابی، در موش‌های مبتلا شد. به‌نظر می‌رسد که در طول فاز حاد EAE، اولین سایتوکاین‌هایی که در سیستم عصبی مرکزی ظاهر می‌شوند لنفوتوکسین‌ها و ایترلوکین ۱۲ است که با ظهور سلول‌های التهابی که بلافضله قبل از شروع علائم بالینی در مغز ظاهر می‌شوند، منطبق است. پس از آن در طول فاز حاد بیماری، ایترفرون گاما، IL6 و TNF α ظاهر شده و میزان بیان آنها موازی با شدت علائم بالینی و میزان ارتضاح سلول‌های التهابی می‌باشد [۲۵]. بنابراین همان‌طور که در این مطالعه نشان داده شد می‌توان تصور کرد که HU-210 از طریق مهار TNF α موجب کاهش شدت علائم EAE شده است. اخیراً شواهد زیادی نشان می‌دهند که تزریق HU-210 بر گیرنده‌های THC که تاثیری مشابه با CB1 و CB2 دارد، با کاهش تولید IL12 و کاهش عملکرد گیرنده آن موجب سرکوب فعالیت TH1 می‌شود [۱۵]. تصور می‌شود که HU-210

- [6] Hill MN, Gorzalka BB. Enhancement of anxiety-like responsiveness to the cannabinoid CB(1) receptor agonist HU-210 following chronic stress. *Eur J Pharmacol* 2004; 499(3): 291-5.
- [7] Devane WA, Dysarz FA, 3rd, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 1988; 34(5): 605-13.
- [8] Rieder SA, Chauhan A, Singh U, Nagarkatti M, Nagarkatti P. Cannabinoid-induced apoptosis in immune cells as a pathway to immunosuppression. *Immunobiology* 2010; 215(8): 598-605.
- [9] Howlett AC, Blume LC, Dalton GD. CB(1) cannabinoid receptors and their associated proteins. *Curr Med Chem* 2010; 17(14): 1382-93.
- [10] Lipina C, Stretton C, Hastings S, Hundal JS, Mackie K, Irving AJ, et al. Regulation of MAP kinase-directed mitogenic and protein kinase B-mediated signaling by cannabinoid receptor type 1 in skeletal muscle cells. *Diabetes* 2010; 59(2): 375-85.
- [11] Marriott KS, Huffman JW. Recent advances in the development of selective ligands for the cannabinoid CB(2) receptor. *Curr Top Med Chem* 2008; 8(3): 187-204.
- [12] Powles T, Te Poele R, Shamash J, Chaplin T, Propper D, Joel S, et al. Cannabis-induced cytotoxicity in leukemic cell lines: the role of the cannabinoid receptors and the MAPK pathway. *Blood* 2005; 105(3): 1214-21.
- [13] Howlett AC, Champion TM, Wilken GH, Mechoulam R. Stereochemical effects of 11-OH-delta 8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology* 1990; 29(2): 161-5.
- [14] Croxford JL, Yamamura T. Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol* 2005; 166(1-2): 3-18.
- [15] Klein TW, Cabral GA. Cannabinoid-induced immune suppression and modulation of antigen-presenting cells. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1(1): 50-64.
- [16] Basavarajappa BS, Nixon RA, Arancio O. Endocannabinoid system: emerging role from neurodevelopment to neurodegeneration. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9(4): 448-62.
- [17] Pertwee RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 2005(168): 1-51.
- [18] Martin-Calderon JL, Munoz RM, Villanua MA, del Arco I, Moreno JL, de Fonseca FR, et al. Characterization of the acute endocrine actions of (-)-11-hydroxy-delta8-tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl (HU-210), a potent synthetic cannabinoid in rats. *Eur J Pharmacol* 1998; 344(1): 77-86.
- [19] Smith SR, Terminelli C, Denhardt G. Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293(1): 136-50.
- [20] Martin R, McFarland HF. Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1995; 32(2): 121-82.
- [21] Costa O, Divoux D, Ischenko A, Tron F, Fontaine M. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG(35-55)peptide in C57BL6/J strain of mice. *J Autoimmun* 2003; 20(1): 51-61.
- [22] Kerschensteiner M, Stadelmann C, Buddeberg BS, Merkler D, Bareyre FM, Anthony DC, et al. Targeting experimental autoimmune encephalomyelitis lesions to a predetermined axonal tract system allows for refined behavioral testing in an animal model of multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2004; 164(4): 1455-69.
- [23] Buccellato E, Carretta D, Utan A, Cavina C, Speroni E, Grassi G, et al. Acute and chronic cannabinoid extracts administration affects motor function in a CREAE model of multiple sclerosis. *J Ethnopharmacol* 2011; 133(3): 1033-8.
- [24] Wirguin I, Mechoulam R, Breuer A, Schezen E, Weidenfeld J, Brenner T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by cannabinoids. *Immunopharmacology* 1994; 28(3): 209-14.
- [25] Tanasescu R, Constantinescu CS. Cannabinoids and the immune system: an overview. *Immunobiology* 2010; 215(8): 588-97.
- [26] Visser J, van Boxel-Dezaire A, Methorst D, Brunt T, de Kloet ER, Nagelkerken L. Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vitro. *Blood* 1998; 91(11): 4255-64.
- [27] Guindon J, Hohmann AG. Cannabinoid CB₂ receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 2008; 153(2): 319-34.
- [28] Nagarkatti P, Pandey R, Rieder SA, Hegde VL, Nagarkatti M. Cannabinoids as novel anti-inflammatory drugs. *Future Med Chem* 2009; 1(7): 1333-49.