

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-Rasouli 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.

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 شده است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، موش‌های صحرایی نر ویستار (۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم) در ۷ گروه دریافت‌کننده سالیین (i.p) - سالیین (i.t)، سالیین (i.p) - DMSO (i.t)، سالیین (i.p) - Genipin (i.t)، مرفین (i.p) ۱۰ mg/kg - DMSO (i.t)، مرفین (i.p) ۱۰ mg/kg - Genipin (i.t)، مرفین (i.p) ۱۰ mg/kg - DMSO (i.t) و مرفین (i.p) ۱۰ mg/kg - 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، به روش پلتیسومتری به دست 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 حالی که 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 احتمالاً اثرات ضد التهابی Genipin از طریق مهار NF-κB به قدری قوی است که اثرات مهاری آن بر UCP2 و متعاقباً 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 به دلیل تشابه مکانیسم‌های عمل این دوز مرفین و Genipin باشد، که کانال‌های K_{ATP} پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: Genipin، UCP2، التهاب، مرفین

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

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 پیش‌برنده التهاب در بیماری‌های نورودژنراتیو افزایش می‌یابد و بسیاری از این فاکتورهای التهابی خود مستقیماً 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] بیان شده 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 تحریک‌پذیری سلول می‌شود [۴-۶]. 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 [۷-۹]. Genipin یک مولکول فعال در عصاره میوه گیاه *Gardenia Jasminoides* (از خانواده روناس) است که به صورت اختصاصی فعالیت UCP2 را مهار می‌کند [۱۰]. به نظر 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 زیست‌شناسی

دورنویس: ۰۵۱۱ ۸۷۶۲۲۲۷

تلفن: ۰۹۱۵ ۵۲۴۲۰۱۵

پست الکترونیک: fereidoni@um.ac.ir

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۳/۲/۱۴

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱

خلاف انتظار، پژوهش حاضر و تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که این مولکول دارای اثرات ضد التهابی هم به صورت محیطی و هم به صورت مرکزی است [۱۳-۱۱]. آگونیست‌های گیرنده‌های اویپوئیدی 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 مهاري اویپوئیدها نقش دارند [۱۵]. به علاوه، مرفین گیرنده‌های اویپوئیدی پیش سیناپسی را نیز فعال می‌کند. هم‌چنین با مهار جریان‌های کلسیمی آزادسازی نوروترانسمیترها را کاهش می‌دهد [۱۶] و بدین طریق می‌توان اثرات مهاري اویپوئیدها 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 به صورت 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 متعاقباً کاهش التهاب می‌شود، Genipin ممکن است با مهار UCP2 و اثر متضاد بر تحریک‌پذیری نورون‌ها و یا اثر بر سلول‌های میکروگلیا اثرات ضد التهابی مرفین را تحت تأثیر قرار دهد. به منظور بررسی این فرضیات از مدل ادم القاء شده توسط فرمالین در یای موش صحرایی استفاده شد.

به منظور انجام این مطالعه پژوهشی از موش های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۰۰ تا ۲۵۰ گرم استفاده شد. حیوانات در جعبه هایی از جنس پلکسی گلاس در محیطی با دمای $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی/۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می شدند، 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 آزمایش های مربوط به بررسی میزان ادم، ضمن رعایت حقوق حیوانات [۱۷]، بر روی حیواناتی که هیچ گونه نقص حرکتی نداشتند، انجام شد. به منظور انجام این پژوهش از محلول های Genipin (Sigma-Aldrich) با غلظت ۱ mM [حامل دارو، حلال DMSO (۵/۰ درصد، حجم/حجم) بود] و مرفین (تماد) با دوزهای ۱۰ mg/kg و ۱ $\mu\text{g/kg}$ استفاده شد. حیوانات جراحی شده به صورت تصادفی

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 میج در ستون جیوه واقع شده بر روی یک ترازوی دیجیتال فرو برده شد و عدد ترازو تقسیم بر جرم حجمی جیوه به عنوان حجم پا ثبت گردید. حجم پا یک ساعت پس از تزریق فرمالین مجدداً اندازه گیری 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 داده ها

داده ها به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ارائه شده با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism 5 و به روش آنالیز ANOVA یک طرفه ارزیابی شدند. سپس، میانگین داده ها بین گروه های مختلف با آزمون تعقیبی توکی مقایسه گردید. حداقل سطح معنی داری معادل $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. سرانجام نتایج به کمک نرم افزار Microsoft Excel 2007 بر روی نمودار نمایش داده شدند.

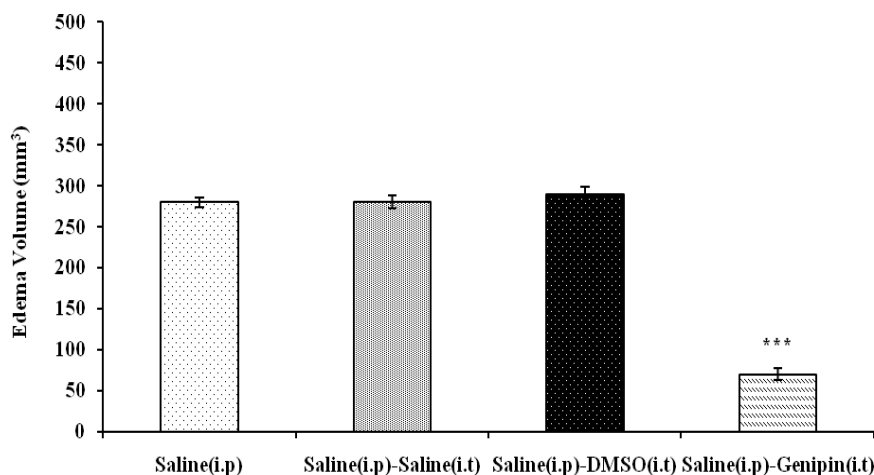
نتایج

مقایسه میانگین ها نشان داد بین گروه های کنترل و گروه های تجربی از نظر آماری اختلاف معنی دار 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 معنی داری در میزان ادم التهابی در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.p) - سالین (i.t) نگردید که نشان دهنده عدم تأثیر حلال بر ادامه روند آزمایش ها بود. علاوه بر آن، میزان ادم القاء شده در این دو گروه با گروهی که تحت عمل جراحی جهت کانون گذاری قرار نگرفته و فقط سالین را به صورت داخل صفاقی دریافت کرده بودند، نیز تفاوت معنی داری نداشت، که این نیز خود نشان دهنده عدم تأثیر جراحی بر میزان ادم القاء شده است. از طرفی نتایج حاصل از این پژوهش بیان گر آن بود که میزان ادم در گروه دریافت کننده سالین (i.p) - Genipin (i.t) کاهش چشم گیری در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.p) - DMSO (i.t) داشت ($P < 0.001$).

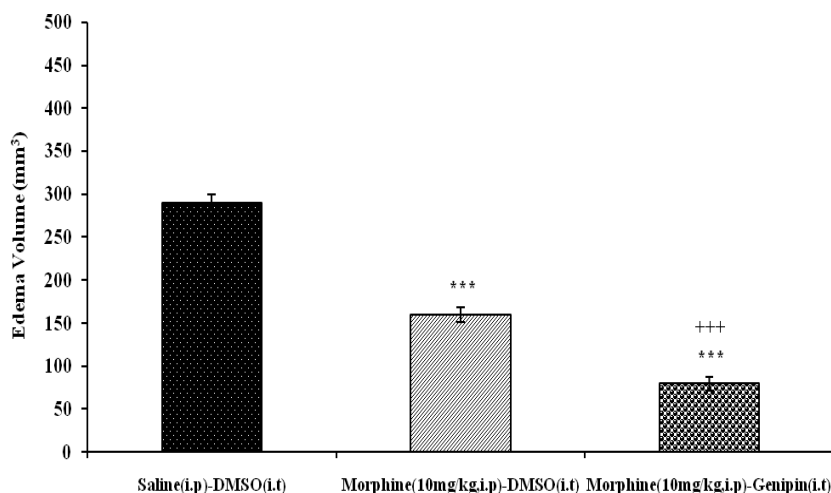
(شکل شماره ۱)، که نشان می دهد تجویز مرکزی Genipin دارای اثرات ضد التهابی قابل توجه است. نتایج هم چنین نشان دادند که میزان ادم القاء شده توسط فرمالین در گروه دریافت کننده دوز معمول مرفین (i.p) - DMSO (i.t) ۱۰ mg/kg در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.p) - DMSO (i.t) کاهش معنی دار یافت ($P < 0.001$) و هم چنین تجویز نخاعی Genipin ادم التهابی را پس از تجویز داخل صفاقی دوز معمول مرفین در گروه مرفین (i.p) - Genipin (i.t) ۱۰ mg/kg در مقایسه با گروه سالین (i.p) - DMSO (i.t) نیز کاهش داد ($P < 0.001$); میزان این کاهش به دلیل 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 پای فرمالین در گروه دریافت کننده دوز بسیار ناچیز مرفین (i.p) - DMSO (i.t) ۱ µg/kg در مقایسه با گروه دریافت کننده سالین (i.p) - DMSO (i.t) افزایش یافت ($P < 0.05$). هم چنین، تجویز نخاعی Genipin به همراه تجویز داخل صفاقی دوز بسیار ناچیز مرفین در گروه دریافت کننده مرفین (i.p) - DMSO (i.t) ۱ µg/kg در مقایسه با گروه سالین (i.p) - DMSO (i.t) منجر به افزایش معنی داری در میزان ادم التهابی شد ($P < 0.001$). این نتایج نشان دهنده این است که Genipin قادر نیست بر اثر پیش برندگی التهاب توسط دوز بسیار ناچیز مرفین غلبه کند؛ به نحوی که حضور و عدم حضور Genipin تفاوت معنی داری در تشدید التهاب توسط دوز بسیار ناچیز مرفین نداشت (شکل شماره ۳).

جدول شماره ۱- میانگین حجم ادم القاء شده (میلی متر مکعب) توسط فرمالین در گروه های مختلف مورد مطالعه

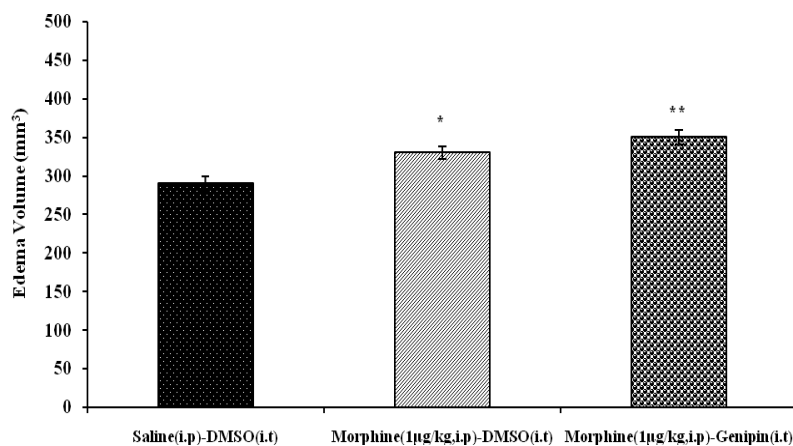
$\bar{X} \pm \text{SEM}$	گروه های بیمار شده
$282 \pm 1/32$	سالین (i.p)
$280 \pm 1/12$	سالین (i.p) - سالین (i.t)
$290 \pm 1/24$	سالین (i.p) - DMSO (i.t)
$74 \pm 1/27$	سالین (i.p) - Genipin (i.p)
$160 \pm 1/32$	مرفین (i.p) - DMSO (i.t) ۱۰ mg/kg
$82 \pm 1/29$	مرفین (i.p) - Genipin (i.p) ۱۰ mg/kg
$332 \pm 1/35$	مرفین (i.p) - DMSO (i.t) ۱ µg/kg
$363 \pm 1/26$	مرفین (i.p) - Genipin (i.p) ۱ µg/kg



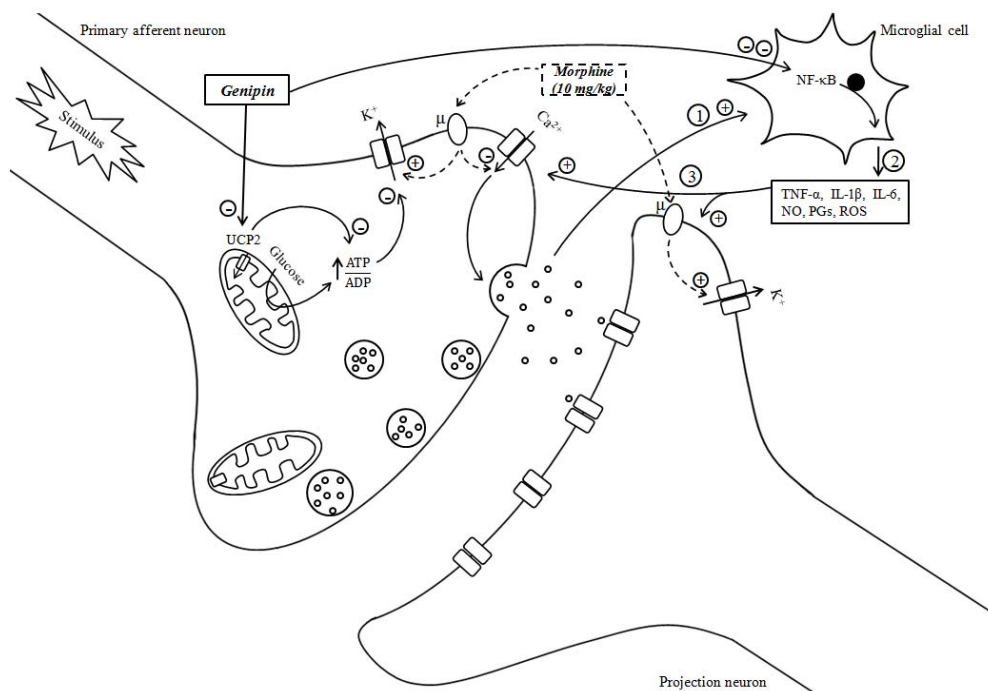
شکل شماره ۱- مقایسه میزان ادم القاء شده توسط تزریق کف پای فرمالین در گروه‌های سالین (i.p)، سالین (i.p)-سالین (i.t)، سالین (i.p)-DMSO (i.t) و سالین (i.p)-Genipin (i.t) ۱ mM. داده‌ها به صورت $\bar{X} \pm SEM$ ارائه شده‌اند، و $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه سالین (i.p)-DMSO (i.t).



شکل شماره ۲- مقایسه میزان ادم القاء شده توسط تزریق کف پای فرمالین در گروه‌های سالین (i.p)-DMSO (i.t)، مرفین (i.p)-DMSO (i.t) ۱۰ mg/kg و مرفین (i.p)-Genipin (i.t) ۱ mM. داده‌ها به صورت $\bar{X} \pm SEM$ ارائه شده‌اند، و $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه سالین (i.p)-DMSO (i.t) ۱۰ mg/kg، و $P < 0.001$ +++ در مقایسه با گروه مرفین (i.p)-DMSO (i.t) ۱۰ mg/kg.



شکل شماره ۳- مقایسه میزان ادم القاء شده توسط تزریق کف پای فرمالین در گروه‌های سالین (i.p)-DMSO (i.t)، مرفین (i.p)-DMSO (i.t) ۱ µg/kg و مرفین (i.p)-Genipin (i.t) ۱ mM. داده‌ها به صورت $\bar{X} \pm SEM$ ارائه شده‌اند، و $P < 0.001$ *** و $P < 0.05$ * در مقایسه با گروه سالین (i.p)-DMSO (i.t).



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 احتمالاً 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

هیستامین، IL-6، و پروستاگلندین D2، را به صورت معکوس تنظیم می‌کند. به علاوه، تزریق زیر پوستی ماده P، که فعال کننده ماست سل‌ها 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 به وسیله کاراژینان، تشکیل air pouch توسط کاراژینان، اندازه گیری مقدار نیتریک اکساید (NO) در اگزودیت [۱۱]، و ادم القاء شده در گوش موش به وسیله 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 $IkB-\beta/NF-\kappa B$ مسیری

نتایج به دست آمده از این مطالعه تجربی نشان داد که تجویز نخاعی Genipin باعث کاهش چشم گیر التهاب در مدل ادم القاء شده در پای موش صحرایی به وسیله 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. به علاوه، تولید NO و سیتوکاین‌های التهابی مثل $IFN-\gamma$ و $TNF-\alpha$ نیز در این موش‌ها در هردو محیط برون-تنی و درون تنی بیشتر از موش‌های $Ucp2^{+/+}$ است. مراحل کلیدی در فعال سازی آبشار $NF-\kappa B$ ، از جمله فعالیت IkB کیناز و جابجایی زیر واحدهای $NF-\kappa B$ به هسته، همگی در موش‌های $Ucp2^{-/-}$ افزایش چشم گیری نشان می‌دهند، که حتی در شرایط پایه نیز قابل توجه است [۸]. هم چنین، نشان داده شده است که UCP2 بسیاری از عملکردهای ماست سل‌ها هم چون تولید

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، به نحوی 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 ($1 \mu\text{g/kg}$) پیش‌برنده التهاب می‌باشد. بر خلاف دوز معمول مرفین، دوز بسیار ناچیز آن احتمالاً 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 متعاقباً افزایش سنتز گانگلیوزید GM1 نیز باعث بروز اثرات تحریکی اویپوئیدها می‌شود. افزایش GM1 باعث فعال شدن عملکردهای مرتبط با گیرنده‌های اویپوئیدی جفت شده با Gs، افزایش تغییر گیرنده‌های اویپوئیدی از وضعیت مهار به وضعیت تحریکی جفت شده با Gs؛ و در نتیجه باعث افزایش راندمان جفت شدن گیرنده‌های اویپوئیدی جفت شده با Gs به سیستم سیگنال رسانی PKA و متعاقباً حساس شدن فوق‌العاده گیرنده‌های اویپوئیدی تحریکی می‌شود [۲۴]. در تجویز نخاعی Genipin پس از تجویز داخل صفاقی دوز بسیار ناچیز مرفین، حضور Genipin اثری بر پیش‌بردگی التهاب مرفین نداشت، ولی این دوز مرفین توانست خواص ضد التهابی Genipin را معکوس کند. اگرچه Genipin از طریق سرکوب فعالیت NF- κ B در سلول‌ها میکروگلیا و کاهش آزاد سازی سیتوکاین‌های پیش التهابی دارای اثرات ضد التهابی است، اما ظاهراً حضور مرفین به‌عنوان عامل پیش‌برنده 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 پیش‌برنده 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 [۲۵-۲۸]. از آنجا که حضور Genipin باعث مهار کانال‌های K_{ATP} شده و دوز بسیار ناچیز $1 \mu\text{g/kg}$ مرفین از طریق اثر بر G پروتئین‌های تحریکی، PIP2 و فسفریلاسیون وابسته به

که با فعالیت مهار Genipin بر تولید NO نیز مرتبط است، اعمال می‌نماید و از تجزیه I κ B- 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- κ B 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- κ B در سلول‌های میکروگلیا فعال شده در پاسخ به LPS را سرکوب کرده و آزاد سازی NO و دیگر سیتوکاین‌های پیش‌برنده التهاب مثل TNF- α ، PGE2، IL-1 β 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 زیر جلدی فرمالین را نیز با مهار فعالیت فاکتور NF- κ B مهار کرده و باعث بروز اثرات ضد التهابی چشم‌گیر شده است. بنابراین، ظاهراً 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 اویپوئیدی 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 مهار اویپوئیدها نقش دارند [۱۵]. به علاوه، مرفین گیرنده‌های اویپوئیدی پیش‌سیناپسی 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 اویپوئیدها 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 اویپوئیدی μ

نورودژنراتیو باشد. از طرفی Genipin می‌تواند با مهار UCP2 و متعاقب آن مهار کانال‌های K_{ATP} باعث افزایش تحرک‌پذیری و در نتیجه افزایش التهاب شود. از آنجا که دوز بسیار ناچیز مرفین توانسته است اثرات ضد التهابی Genipin را کاملاً معکوس کند و نیز با در نظر گرفتن این نکته که اثرات Genipin می‌تواند به واسطه 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. بدین وسیله 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- κ B activation in Ucp2^{-/-} mice leads to

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

نتیجه‌گیری

روی هم رفته، نتایج این مطالعه بیانگر آن است که تجویز Genipin به صورت نخاعی ادم القاء شده توسط فرمالین را به طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد، که احتمالاً مربوط به مهار قوی فاکتور NF- κ B 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

- 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, Shirihaï 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.

- [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 α s, 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 $\beta\gamma$ -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.