Original Article

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

Aarabi MH[1], Shahaboddin ME[1*], Parastouei K[1], Motallebi M[2], Jafarnejad A[1], Mirhashemi SM[1], Hamidi Gh[3], Alvani Sh[4]

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: shahabadin@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 علایم بالینی در مدل تجربی مولتیپل اسکلروزیس

محمدحسین اعرابی [۱]، محمداسماعیل شهاب الدین [۲*]، کریم پرستویی [۲]، میترا مطلبی [۳]، اکبرجعفرنژاد [۱]، سیدمهدی میرهاشمی [۱]، غلامعلی حمیدی [٤]، شکوفه الوانی [٥]

خلاصه:

سابقه و هدف: مولتیپل اسکلروزیس یک بیماری التهابی مزمن می‌باشد که با دمیلینه شدن سیستم عصبی مرکزی همراه است. مطالعات اخیر خواص مفید ضد التهابی و تعدیل کنندگی سیستم ایمنی کانابینوئیدها را گزارش کرده‌اند. یکی از ترکیبات دست‌ساز فعال‌کننده گیرنده‌های کانابینوئیدها HU-210 است. مطالعه حاضر برای ارزیابی اثر بخشی درمان با HU-210 بر پروفایل سایتوکاین‌ها و علائم بالینی بیماری در مدل انسفالومیلیت اتوایمیون تجربی (EAE) انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی از ٤٨ سر موش نر نژاد C57BL/6 استفاده شد. برای القاء EAE، مقدار ۲۵۰ میکروگرم پپتید MOG35-55 به هر موش تزریق گردید. در ۳ گروه موش‌های مبتلا به EAE به‌ترتیب با دوزهای ۳، ۱۰، ۳۰ mg/kg به‌مدت ۱۷ روز به‌صورت یک‌روز در میان با HU-210 داخل صفاقی تیمار شدند. وضعیت بالینی موش‌ها در طول مطالعه با آزمون امتیازات بالینی ارزیابی شد. موش‌ها در روز هفدهم تیمار کشته شده و سطح TNFα، IL-12 و IL-4 سرمی آنها با روش الایزا اندازه‌گیری شد.

نتایج: تجویز HU-210 به موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش شدت بیماری از نظر تست امتیاز 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 IL-12 و TNFα سرم می‌شود. هم‌چنین، هر سه دوز تیمار موجب افزایش معنی‌دار IL-4 در موش‌های مبتلا در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE دریافت‌کننده بافرفسفات 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، کانابینوئیدها

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

مقدمه

مولتیپل اسکلروزیس (MS) یک بیماری خود ایمنی پیش‌رونده 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. بیمارانی‌که مبتلا به این بیماری هستند دچاراسپاسم‌های عضلانی دردناک، عدم تعادل در راه رفتن، ضعف یا فلج، یبوست و از دست دادن کنترل مثانه می‌شوند [۲،۱].

در برخی مطالعات نشان داده شده است که کانابینوئیدها موجب کاهش تحلیل عصبی پیش رونده می‌شوند [۳]. تحقیقات اولیه مرتبط با کانابینوئید با استفاده از ماده فعال ماری جوانا (تترا هیدرو کانابینول، THC) انجام پذیرفت. مطالعات بر روی ساختار THC به شناسایی خواص ترکیبات کانابینوئیدی که دارای فعالیت بیولوژیکی‌اند کمک کرده و منجر به سنتز تعدادی آگونیست کانابینوئیدی با تمایل بالا گردید [٥،٤]. از جمله این ترکیبات می‌توان به CP55,940 و WIN55,212-2 و HU-210 اشاره کرد. HU-210 با نام شیمیایی (−)-3-(1,1-dimethylheptyl)-(−)-[11-hydroxy-delta8-tetrahydrocannabinol] متعلق به گروه کانابینوئیدهای کلاسیک است که در ساختار آن بنزوپیران سه حلقه‌ای وجود دارد [٦،٤]. خاصیت چربی دوستی قابل توجه HU-210 به آن اجازه می‌دهد که از سد مغزی خونی عبور کند. امروزه دو نوع گیرنده مختلف کانابینوئید از بافت‌های پستانداران شناسایی و کلون شده است. گیرنده CB1 که به‌طور عمده در سیستم عصبی مرکزی و بیضه‌ها یافت می‌شود [۷] و گیرنده CB2 که محیطی است و در سیستم ایمنی یافت می‌شود [۸]. کلون کردن

[۱] دانشیار، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۲] مربی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۳] کارشناس ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی و ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[۴] دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

[٥] کارشناس ارشد سم شناسی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان

***نشانی نویسنده مسئول:**

کاشان، کیلومتر۵ بلوارقطب راوندی، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، مرکز تحقیقات بیوشیمی و تغذیه در بیماری‌های متابولیک

تلفن: ۰۳۶۱ ۵۵۵۰۰۲۱ **دورنویس:** ۰۳۶۱ ۵۵۵۱۱۱۲

پست الکترونیک: shahaboddin@kaums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۲ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۰/۳/۲۹

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 سیکلاز و تحریک آبشار 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 به‌طور عمده به فعال شدن گیرنده‌های CB2 نسبت داده می‌شود که اغلب منحصر به سلول‌های ایمنی محیطی از جمله لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و ماست سل‌هاست [۱۵،۱٤]. HU-210 فاز تکثیری پاسخ ایمنی هومورال را از طریق اختلال در سنتز لنفوسیت‌های B سرکوب کرده و موجب مهار فعالیت ماکروفاژها می‌شود. با این حال، اطلاعات جدید نشان می‌دهد که اثر مهارکنندگی سیستم ایمنی توسط کانابینوئیدها باید مورد بررسی مجدد قرار بگیرد [۱۷،۱٦]. HU-210 ۱۰۰ تا ۵۰۰ برابر قوی‌تر 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 اینترلوکین ۱۰ ضد التهابی در موش‌های آلوده 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 به‌عنوان یک رویکرد درمانی جدید برای آسیب نورولوژیک در MS مفید باشد. مطالعه حاضر برای ارزیابی اثر بخشی درمان با HU-210 در مدل (experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE در موش انجام شد. EAE همراه با التهاب و دمیلینه شدن سیستم اعصاب مرکزی بوده و پس از حساس نمودن حیوانات آزمایشگاهی توسط آنتی-ژن‌های میلین یا myelin oligodandricyte glycoprotein (mog) به‌وجود می‌آید [۲۰]. این مدل حیوانی به‌عنوان یک آنالوگ بیماری مالتیپل اسکلروزیس انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه ما اثر HU-210 را به‌عنوان یک آگونیست گیرنده کانابینوییدی برپروفایل سایتوکاین‌ها و علائم بالینی بیماری در مدل EAE موش مورد بررسی قرار دادیم.

مواد و روش‌ها

حیوانات آزمایشگاهی: این مطالعه از نوع مطالعه تجربی شاهد دار تصادفی شده بود که بر روی ٤٨ سر موش نر نژاد C57BL/6 با محدوده سنی ٦ تا ٨ هفته و وزن ۲۲-۱٦ گرم انجام شد که از مرکز تکثیر حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور خریداری شده بودند. غذای استاندارد موش آزمایشگاهی و آب شهری در ظروف مخصوص در دسترس آنها قرارگرفت و کلیه ملاحظات اخلاقی برطبق آیین 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، ٤٨ سر موش هفت روز قبل از شروع مطالعه، به‌طور تصادفی به ٨ گروه ٦ تایی با شرایط سنی و وزنی یکسان به‌صورت زیر تقسیم شدند: گروه-های ۱ و ۲ و ۳- شامل موش‌هایی که پس از ایجاد EAE به‌مدت ۱۷ روز به‌صورت یک‌روز در میان به‌ترتیب مقادیر ۳ و۱۰ و۳۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن HU-210 را همراه با ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) دریافت کردند. گروه٤-گروه کنترل: موش‌های سالمی که هیچ‌گونه تزریقی در آنها صورت نگرفت. گروه‌های ۵ و ٦ و ۷- گروه کنترل: موش‌های سالمی که به مدت ۱۷ روز به صورت یک روز در میان به‌ترتیب مقادیر ۳ و ۱۰و ۳۰ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم 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 به‌صورت یک روز در میان مقدار ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) دریافت کردند. به‌منظور ارزیابی علائم بالینی در موش‌ها تست clinical score انجام پذیرفت. القاء EAE: به‌منظور القاء EAE، مقدار ۲۵۰ میکروگرم پپتید Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein) MOG35-55) با توالی NH2–MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK–(OH) خریداری شده از شرکت ALEXIS را در ۱۵۰ میکرولیتر بافر فسفات و ۱۵۰ میکرولیتر ادجوانت کامل فروند (شرکت Sigma) مخلوط کرده و به‌صورت 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 ٤۰۰ نانوگرم Pertusis toxin در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بافر فسفات حل شده و در زمان صفر و ٤٨ ساعت بعد از ایمونیزاسیون به‌صورت 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، به‌عنوان موش مبتلا به EAE در نظرگرفته شدند.

آزمایشات انجام شده

تست EAE clinical score: علایم بالینی ۲۴-۲۲ روز 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 پاها)، سه (فلج اندام‌های تحتانی)، سه و نیم (فلج اندام‌های تحتانی و فلج خفیف دست‌ها)، چهار (فلج کامل دست‌ها و پاها به‌طوری‌که حیوان قادر به حرکت نیست)، پنج (در حال مرگ یا مرگ به خاطر القاء MS) درجه‌بندی شد [۲۸-۲۳]. اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی التهابی و ضد التهابی: موش‌ها در روز هفدهم تیمار، کشته شده و پس از جمع‌آوری خون، سرم آنها جدا گشت و پس از آن سطح TNFα، اینترلوکین ۱۲ (IL-12) به‌عنوان فاکتورهای ایمنی التهابی و سطح اینترلوکین ٤ (IL-4) به‌عنوان فاکتورهای ایمنی ضد التهابی با روش الایزا اندازه‌گیری شد.

آنالیزآماری

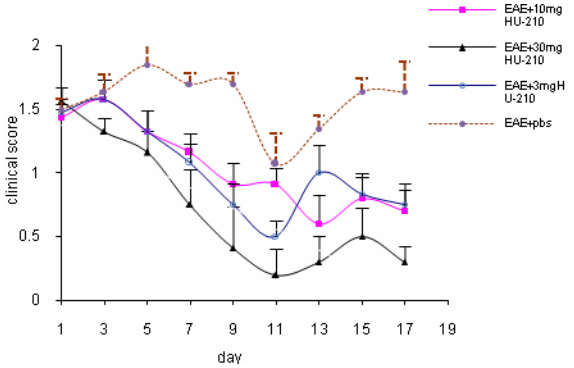
تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS انجام پذیرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از one-way ANOVA و تست مکمل Tukey استفاده شد. به‌منظور بررسی تغییرات شدت بیماری در روزهای مختلف نیز از روش اندازه‌گیری تکراری (Repeated Measurement) استفاده گردید و $P<۰/۰۵$ به‌عنوان سطح معنی‌داری داده‌ها در نظرگرفته شد.

نتایج

نتایج مرتبط با اثر تجویز HU-210 به‌صورت داخل صفاقی به موش‌های مبتلا به EAE (مدل حیوانی مولتیپل اسکلروزیس) بر علائم بالینی آن در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. نتایج این بررسی با استفاده از تست Repeated Measurement نشان می‌دهد که تجویزHU-210 به‌صورت 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 نمایش داده شده است. نتایج آنالیز واریانس اختلاف معنی‌داری را در مورد فاکتورهای التهابی بین گروه‌ها نشان داد ($P=۰/۰٤۲$). نتایج آزمون تعقیبی نشان داد که 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 بافر فسفات دریافت کردند، می‌شود ($P=۰/۰۱۲$). در صورتی‌که در دوز ۳ و ۱۰ میلی‌گرم این اختلاف معنی‌دار نیست ($P1=۰/۲۹٦$، $P2=۰/۹۱۲$، به‌ترتیب). نمودار شماره ۳ نتایج حاصل از تجویز HU-210 بر میزان TNFα را نشان می‌دهد. تیمار با دوز ۳۰ میلی‌گرم HU-210 در موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش معنی‌دار در میزان TNFα در مقایسه با موش‌های مبتلا که بافر فسفات دریافت کردند، می‌شود ($P<۰/۰۰۱$). با این حال، هر سه دوز mg/kg ۳۰،۱۰،۳ HU-210 باعث افزایش معنی‌داری در فاکتور ضد التهابی IL-4 موش‌های مبتلا در مقایسه با گروه ٤ (موش‌های سالمی که هیچ‌گونه تیماری را نداشتند) و گروه ۸ (EAE + pbs) می‌شود ($P1=۰/۰۰۲$، $P2<۰/۰۰۱$، $P3<۰/۰۰۱$ به‌ترتیب). البته جالب توجه است که این افزایش در گروه ۳ (مبتلا به EAE دریافت کننده تیمار با دوز mg/kg ۳۰) بیشتراست. نتایج مربوط به اثر HU-210 بر علائم بالینی و پروفایل سایتوکاین‌های موش‌های سالمی که دوزهای ۳، ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را دریافت کردند، نشان داد که علائم بالینی در این موش‌ها در مقایسه با موش‌های سالم فاقد تیمار تفاوت معنی-داری ندارد. هم‌چنین، در این مقایسه، فاکتورهای التهابی نیز تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهند، در حالی‌که تزریق سه دوز دارو به موش-های سالم، فاکتور ضد التهابی IL4 را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با موش‌های سالم تیمار نشده افزایش داد ($P1<۰/۰۰۱$، $P2<۰/۰۰۱$، $P3<۰/۰۰۱$ به‌ترتیب).

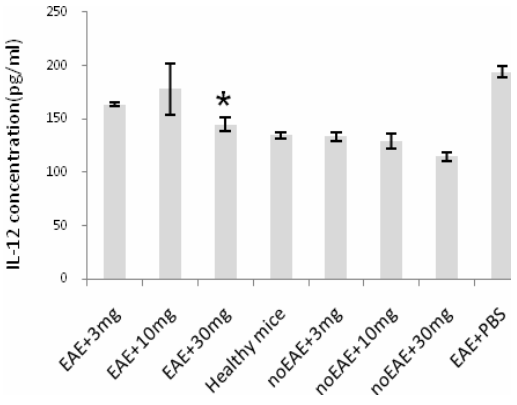
بحث

نتایج این مطالعه نشان‌دهنده وجود اثرات مثبت HU-210 بر علائم بالینی EAE و پروفایل سیتوکین‌ها است که می‌تواند 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 ۳۰+EAE در روز پنجم تیمار اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد (EAE+pbs) دارد. اما این اختلاف بین گروه‌های دریافت‌کننده HU-210 در دوز mg/kg ۱۰ و ۳ دیده نشد. به‌نظر می‌رسد تزریق داخل صفاقی HU-210 در دوز mg/kg ۳۰ در روز پنجم پس از ایجاد EAE می‌تواند باعث کاهش شدت بیماری تا ۳۷ درصد شود (شکل شماره ۱). اختلاف بین گروه ۳ با گروه شاهد (EAE+pbs) در روزهای ۱۷، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵ معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). اما گروه ۱ (EAE+3 mg HU-210) با گروه شاهد فقط در روز نهم اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد ($P=۰/۰۱٦$). آنالیز داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد که تزریق این ترکیب در دوز ۱۰mg/kg پس از ایجاد EAE در موش‌ها موجب کاهش علائم بالینی می‌شود، اما این کاهش در هیچ‌کدام از روزها معنی‌دار نیست.



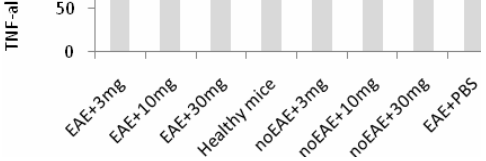
نمودار شماره ۱- اثر دوزهای مختلف HU-210 بر امتیاز بالینی موش‌های مبتلا به EAE. EAE+3mgHU-210: (گروه ۱) موش‌های مبتلا به EAE که HU-210 را در دوز ۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. امتیازات بالینی در این گروه در روز نهم با گروه ۸ اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P=۰/۰۱۶). EAE+10mgHU-210: (گروه ۲) موش‌های مبتلا به EAE که HU-210 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+30mgHU-210: (گروه ۳) موش‌های مبتلا به EAE که HU-210 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 ۱۷، ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵ معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

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



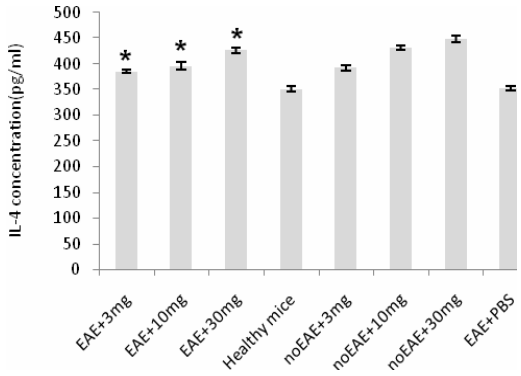
نمودار شماره ۲- اثر دوزهای مختلف HU-210 بر غلظت IL-12 در موش‌های تحت مطالعه.

* 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 بافر فسفات دریافت کردند، می‌شود (P=۰/۰۱۲).



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

* تیمار با دوز ۳۰ میلی‌گرم HU-210 در موش‌های مبتلا به EAE باعث کاهش معنی‌دار میزان TNFα در مقایسه با موش‌های مبتلا به EAE که بافرفسفات سالین دریافت کردند می‌شود (P<۰/۰۰۱).



نمودار شماره ٤- 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 بافر فسفات دریافت کردند، می‌شود ($P1$=۰/۰۰۲، $P2$<۰/۰۰۱، $P3$<۰/۰۰۱ به‌ترتیب)

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان کرد که اثر HU-210 وابسته به دوز می‌باشد. در مطالعه حاضر نتایج ما نشان داد که در مدل EAE هنگامی‌که HU-210 بلافاصله پس از ایجاد EAE با دوز mg/kg ۳۰ تجویز می‌شود، موجب کاهش شدت بیماری از لحاظ امتیازات بالینی بین ۳۷ تا ۸۱ درصد شده و بیشترین کاهش شدت بیماری در روز ۱۱ و ۱۷ دیده می‌شود (P=۰/۰۰۳، P=۰/۰۰۹ به‌ترتیب). در مطالعه Buccellato و همکاران اثر عصاره کانابینوییدها بر عملکرد حرکتی موش‌های مبتلا به EAE بررسی شد و نتایج این مطالعه نشان داد که فاز عود بیماری به‌طور

قابل توجهی کاهش می‌یابد [۲۳]. در یک مطالعه دیگر Wirguin و همکاران اثر کانابینوئیدی را به نام دلتا ۸ تترا هیدروکانابینول در EAE مورد بررسی قرار دادند. آنها دریافتند که دوز ٤٠ mg/kg ۲۱ روز پس از القای EAE موجب کاهش بروز شدت EAE می‌شود [۲٤]. نتایج این مطالعه در مورد پروفایل سایتوکاین‌ها نشان داد که HU-210 در دوز ۳۰mg/kg باعث کاهش معنی‌دار سطح سایتوکین‌های التهابی TNFα و اینترلوکین ۱۲ (IL-12) در مقایسه با گروه شاهد شد. تیمار با دوز mg/kg ۳۰ به اندازه‌ای در کاهش IL-12 موثر بود که اختلاف معنی‌داری بین گروه ۳ (گروه مبتلا به EAE دریافت‌کننده تیمار با دوز mg/kg ۳۰) و گروه ٤ (موش‌های سالمی که هیچ‌گونه 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<$۰/۰۰۱، $P2<$۰/۰۰۱، $P3<$۰/۰۰۱). و هم‌چنین تزریق HU-210در هر سه دوز mg/kg ۳، ۱۰، ۳۰ باعث افزایش معنی‌دار سطح اینترلوکین ٤(IL-4) به‌عنوان فاکتور ایمنی 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 اینترلوکین ۱۲ است که با ظهور سلول‌های التهابی که بلافاصله قبل از شروع علائم بالینی در مغز ظاهر می‌شوند، منطبق است. پس از آن در طول فاز حاد بیماری، اینترفرون گاما، IL6 و TNFα ظاهر شده و میزان بیان آنها موازی با شدت علائم بالینی و میزان ارتشاح سلول‌های التهابی می‌باشد [۲۵]. بنابراین همان‌طورکه در این مطالعه نشان داده شد می‌توان تصور کرد که HU-210 از طریق مهار TNFα موجب کاهش شدت علائم EAE شده است. اخیرا شواهد زیادی نشان می‌دهند که تزریق THC که تاثیری مشابه با HU-210 بر گیرنده‌های CB1 و CB2 دارد، با کاهش تولید IL12 و کاهش عملکرد گیرنده آن موجب سرکوب فعالیت TH1 می‌شود [۱۵]. تصور می‌شود که HU-210 با مکانیسم مشابه موجب بهبود علائم EAE در موش‌های تحت مطالعه می‌شود. در حال حاضر دقیقا مشخص نیست که این گیرنده‌ها چگونه به ایمنی زایی TH1 مرتبط هستند. ممکن است که اثرات مرکزی که با واسطه CB1 انجام می‌شود از طریق محور آدرنال – هیپوفیز- هیپوتالاموس عمل کرده و بنابراین فعالیت TH1 را تحت تاثیر قرار دهد [۲٦]. از سوی دیگر ممکن است گیرنده‌های CB2 که در سلول‌های ایمنی بیان می‌شوند، در کنترل سایتوکاین‌های محیطی و بلوغ سلول TH 1 نقش داشته باشند [۲۷]. اکثر تحقیقات انجام شده در مورد کانابینوئیدها در مدل‌های حیوانی نشان می‌دهند که سرکوب‌کنندگی سیستم ایمنی وابسته به دوز است و این کاهش فعالیت به‌طور عمده به فعال سازی گیرنده-های CB2 نسبت داده می‌شود که غالبا به‌طور اختصاصی بر روی سلول‌های محیطی نظیر لنفوسیت‌ها، ماکروفاژها و ماست سل‌ها بیان می‌شوند [۲۸،۸]. تصور می‌شود که در مطالعه ما HU-210 بالاخص در دوز mg/kg ۳۰ موجب مهار فعالیت ماکروفاژها می-شود و به‌علت ظرفیت ماکروفاژها به‌عنوان سلول‌های عرضه‌کننده آنتی‌ژن و تولیدکننده پروتئین‌های تنظیمی مثبت و منفی، می‌توان بیان کرد که این ترکیب می‌تواند موجب سرکوب سیستم ایمنی گردد.

نتیجه‌گیری

مطالعه حاضر ثابت می‌کند که HU-210 با اثرگذاری بر آبشار ایمونولوژیک که پس از القای EAE به‌وجود 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 ۸٦٤٤ 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.

[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-dimethylh-eptyl (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 Sci1*** 995; 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.