مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۹، شماره ۳، مرداد و شهریور ۱۳۹۰
صفحه: ۳۴۹-۳۳۹

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 19, No. 3, Jul-Aug 2011
Pages: 339-349

بررسی اثر نوروپروتکتیوی عصاره الکلی برگ گیاه شاهدانه(کانابیس ساتیوا) بر دژنراسیون آلفا موتونورون‌های نخاع پس از آسیب عصب سیاتیک در رت

مریم طهرانی پور[۱]، بی بی زهرا جواد موسوی*[۲]

۱- استادیار فیزیولوژی جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد
۲- کارشناسی ارشد علوم جانوری، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۴/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱/۲۰

چکیده

مقدمه: در سیستم عصبی محیطی، ضایعات به جسم سلولی نورون‌هایی برمی‌گردد که آکسون‌های آنها آسیب دیده است. گیاه(شاهدانه) کانابیس ساتیوا دارای اثرات آنتی اکسیدانی و ضد آپوپتوزی است، بنابراین هدف از این مطالعه بررسی اثر حفاظتی عصاره الکلی برگ گیاه شاهدانه (کانابیس ساتیوا) بر دژنراسیون آلفا موتونورون‌های نخاع پس از آسیب عصب سیاتیک در رت می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی حیوانات به چهارگروه ۸ تایی A: کنترل، B: کمپرسیون، C: کمپرسیون + تیمار با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم الکلی و D: کمپرسیون + تیمار با دوز ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم الکلی تقسیم شدند.

ابتدا کمپرسیون عصب سیاتیک در گروههای C، B و D با استفاده از قیچی قفل دار به مدت ۶۰ ثانیه انجام گرفت. تزریق عصاره به صورت درون صفاقی طی هفته‌های اول و دوم پس از کمپرسیون صورت گرفت، پس از ۲۸ روز از زمان کمپرسیون تحت متد پرفیوژن، نخاع ناحیه کمری جدا شد. سپس دانسیته نورونی در هر گروه با گروه کمپرسیون مقایسه گردید سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Minitab 14 و آزمون آماری ANOVA تجزیه تحلیل شد.

نتایج: دانسیته نورونی تفاوت معناداری را در گروه کنترل و کمپرسیون نشان می‌دهد($P<۰/۰۰۱$). همچنین دانسیته نورونی در گروه‌های تیمار(۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) در مقایسه با گروه کمپرسیون افزایش معناداری دارد($P<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی برگ گیاه کانابیس ساتیوا دارای اثرات نوروپروتکتیو بر روی آلفاموتونورون‌های شاخ قدامی نخاع پس از ایجاد ضایعه است، بنابراین احتمالاً این اثرات ناشی از حضور فاکتورهای رشد و ترمیم در عصاره الکلی برگ گیاه بوده که موجب پیشبرد فرآیند رژنراسیون در نورون‌های آسیب دیده و پیشگیری از دژنراسیون می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کانابیس ساتیوا، تخریب نورونی، ترمیم عصب، شاهدانه

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۵۳۳۵۷۳، پست الکترونیک: javadmosavi60@yahoo.com

مقدمه

نورون‌ها تحت تاثیر عوامل فیزیکی، شیمیایی و پاتولوژیک دچار صدمه می‌شوند. عمده نورون‌ها تقسیم نمی‌شوند و تخریب آنها یک صدمه دائمی محسوب می‌شود(۱).

هنگامی که یک عصب قطع می شود، ارتباط آکسون با جسم سلولی قطع شده و قطعه دیستال آن از محل ضایعه تا انتها شروع به دژنراسیون همزمان می‌کند، به علاوه دژنراسیون تا اولین گره رانویه به سمت پروگزیمال نیز ادامه می‌یابد که این فرآیند را دژنراسیون والرین می‌گویند(۲).

چنانچه میزان تخریب بخش پروگزیمال شدید باشد اثرات ضایعه رو به عقب به سوی جسم سلولی توسعه یافته و سبب دژنراسیون مرکزی(تخریب جسم سلولی) می‌شود، مثلاً اجسام نیسل شکسته شده و در سرتاسر سیتوپلاسم پراکنده می‌شود که این فرآیند را کروماتولیز گویند، همچنین هسته از موقعیت مرکزی خود به سمت محیط سلول تغییر مکان می‌دهد و جسم سلولی به دلیل تغییرات اسمزی متورم می‌گردد(۲).

اگر چه بیشتر آسیب‌های آکسونی با آزاد سازی جریان سیگنالی کلسیم همراه می‌باشد، برخی آسیب‌های آکسونی که منجر به دژنراسیون حاد آکسونی می‌شود، در آن جدایی بخش پروگزیمال و انتهای دیستال به سرعت و در طول ۳۰ دقیقه پس از آسیب انجام می‌شود(۳).

دژنراسیون با متورم شدن آکسولما و تشکیل قطعات بیضی شکل ادامه می‌یابد(۳).

مسیرهای سیگنالینگ که منجر به دژنراسیون آکسولما می‌شود ناشناخته‌اند و نشان داده شده که آسیب حاد آکسونی پس از دژنراسیون آکسولما، ناپیوستگی گرانولی سیتواسکلتون آکسونی و ارگان‌های داخلی روی داده و اجتماع میتوکندری‌ها در نواحی پارانودال نزدیک نقاط آسیب دیده صورت می‌گیرد. فساد رتیکولوم سارکوپلاسمیک و تورم میتوکندری و ناپیوستگی آنها رخ داده، میکروتوبول‌ها دپلیمریزه می‌شوند و فساد نوروفیلامنت‌ها و دیگر ترکیبات سیتو اسکلتون صورت می‌گیرد(۳).

ناپیوستگی آکسولما وابسته به Ubiqitin و پروتئازهای Calpain (که باعث جریان یون کلسیم به درون نورون می‌شود) می‌باشد. بنابراین آکسون به قطعات مهره مانند تقسیم می‌شود(۳).

اگر یک فیبر عصبی قطع گردد هم در اعصاب محیطی و هم در اعصاب مرکزی تغییراتی ایجاد می‌شود که در صورت شدید بودن این تغییرات منجر به مرگ سلولی می‌شود(۴). اگر چه عمده نورون‌ها عموماً پس از تولد فاقد قدرت تکثیر می‌باشند اما می‌توانند در مقابل درجات معینی از ضایعات مقاومت کرده بهبود یابند(۵).

کانابیس یک گیاه یکساله دو پایه، بوته‌ای گلداراز خانواده کانابیناسه می‌باشد که برگ‌های مرکب پنجه‌ای با برگچه‌های دندانه‌ای دارد(۶).

گیاه کانابیس یک خانواده بی‌نظیر از ترکیبات ترپن و فنولیک که کانابینوئید نامیده می‌شود تولید می‌کند. دو کانابینوئیدی که معمولاً به میزان زیادی تولید می‌شود Δ9 Tetra Hydro Cannabinol (THC) و Cannabidiol (CBD) می‌باشد که تنها THC پسیکو اکتیو می‌باشد(۷). کانابیس از زمان‌های قدیم برای تهیه کنف، ریسمان، مصارف خوراکی، برای اهداف پزشکی و به عنوان یک داروی نشاط‌آور مورد استفاده قرار می‌گرفته است.

تولید کنف از گیاه کانابیس که میزان زیادی فیبر تولید می‌کند و سطوح پائینی از THC دارد انجام می‌شود(۸). کانابیس یک داروی تفریحی عمومی در سرتاسر جهان است که اثرات پسیکو اکتیو شناخته شده‌ای دارد(۸). اثرات پسیکو اکتیو اولیه شامل مرحله ریلکسیشن، کاهش درجه حرارت و احساس سرخوشی(ناشی از ترکیبات پسیکو اکتیواصلی THC می‌باشد. دومین اثرات پسیکو اکتیو شامل ایجاد تفکرات فلسفی و درون‌گرایی در میان حالت‌هایی از جنون و اضطراب می‌باشد(۹) و بالاخره سومین اثرات روان گردان کانابیس دارویی شامل افزایش ضربان قلب و افزایش احساس گرسنگی است که به وسیله 11-hydroxy-THC(که یک متابولیت پسیکو اکتیو از THC تولید شده در کبد است) ایجاد می‌شود(۱۱،۱۰).

دو شکل خوراکی از کانابیس(Canabinoids) در ایالات متحده در دسترس می‌باشند که شامل Dronabinol(Marinal) و Nabilone(Cesamet) می‌باشد(۱۲).

Dronabinol برای درمان کم اشتهایی در بیماری‌های نقص ایمنی بدن و درمان حالت‌های تهوع ناشی از شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۰،۱۱).

این ماده برای کاهش اثرات آلزایمر در افراد مسن همچنین استفاده می‌گردد(۸). کانابیس پزشکی برای درمان آب سیاه، کاهش درد و برای درمان بیماری‌های نورولوژیکال مانند بیماری صرع، افسردگی و اختلالات دو قطبی نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد(۸).

کانابیس در پزشکی اثرات پتانسیلی دیگری نیز در درمان اختلالات حرکتی دارد به طوری که داروی Sativex (یک عصاره از کانابیس) در کانادا به صورت اسپری زیر زبانی برای درمان بیماری MS مورد استفاده قرار می‌گیرد. THC موجود در کانابیس همچنین در درمان کم اشتهایی، کاهش وزن، اختلال حرکات، تنگی نفس، التهاب و عفونت استفاده می‌شود(۸).

کانابینوئیدها همچنین در متابولیسم انرژی و افزایش توده چربی در بدن و کبد نقش مهمی دارند(۱۳،۱۴) به علاوه آنها سبب افزایش توده استخوانی در استخوان‌ها شده و بنابراین برای درمان پوکی استخوان مفید می‌باشند(۱۳،۱۵،۱۶).

لذا با توجه به موارد مصرف فراوان این گیاه در پزشکی خصوصاً استفاده از آن در درمان بیماری‌های سیستم عصبی و با توجه به اینکه تا کنون تحقیقی در زمینه تاثیرات عصاره الکلی برگ گیاه مذکور صورت نگرفته لذا مصمم شدیم تا اثرنوروپروتکتیو عصاره الکلی برگ گیاه شاهدانه (Cannabis Sativa) را بر دانسیته نورونی آلفا موتو نورون‌های نخاع پس از آسیب عصب سیاتیک در رت مورد بررسی قرار دهیم.

روش بررسی

برگ کانابیس ساتیوا(شاهدانه) به طریقه تجارتی تهیه شد و توسط مرکز هرباریوم دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی مشهد به شماره هرباریومی ۲۵۴۸ تایید شد(هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد IAUM). برگ شاهدانه توسط دستگاه خرد کننده(آسیاب) کاملاً آسیاب گردید. از برگ شاهدانه عصاره الکلی با استفاده از دستگاه سوکسله مدل H626 تهیه شد، برای اینکار ۵۰ گرم پودر خشک برگ شاهدانه را داخل کاغذ مخصوص کارتوش ریخته در دستگاه قرار داده و از ۴۵۰ سی سی اتانول خالص به عنوان حلال استفاده شد. در پایان عصاره‌گیری با استفاده از کاغذ صافی عصاره فیلتر شده و سپس از عصاره الکلی حذف حلال صورت گرفت.

این مطالعه از نوع تجربی بوده است که برای انجام آن ۳۲ سر رت نر نژاد ویستار با سن تقریبی ۸ هفته و وزن ۳۵۰-۳۰۰ گرم از موسسه سرم‌سازی رازی خریداری شدند و در حیوان‌خانه گروه زیست دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد تا زمان آزمایش نگهداری شدند. شرایط نگهداری، درجه حرارت ۲۱ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۵۰٪ و سیکل نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی بود به طوری که همگی امکان دسترسی به آب و غذای کافی داشتند. حیوانات مورد آزمایش به چهار گروه A: کنترل، B: کمپرسیون، C: کمپرسیون + تیمار با دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم الکلی و D: کمپرسیون + تیمار با دوز ۵۰ میلی گرم/کیلوگرم الکلی تقسیم شدند به طوری که در هر گروه ۸ راس موش قرار گرفتند بود.

رت‌های هر گروه با تزریق درون صفاقی ماده بیهوشی رامپون و کتامین به نسبت(۶۰ و ۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بیهوش گردیدند(۱۷).

پس از از بین بردن موهای بدن جانور در ناحیه ران پای راست، پوست به اندازه ۳-۲ سانتی متر شکافته شده سپس ماهیچه ران جهت مشخص شدن عصب سیاتیک تحت جراحی قرار گرفت. عمل کمپرسیون عصب سیاتیک پای راست با استفاده از قیچی قفل‌دار(قفل دوم) به مدت ۶۰ ثانیه صورت گرفت.

پس از کمپرسیون عصب، محل ضایعه ضد عفونی و توسط گیره فلزی بخیه زده شد. در گروه‌های تیمار، اولین مرحله

تزریق عصاره با دوز ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم بلافاصله پس از عمل کمپرسیون انجام شد. پس از به هوش آمدن رت‌ها آنها را به قفس‌های جداگانه انتقال داده و در شرایط استاندارد حیوانخانه نگهداری نمودیم. دومین مرحله تزریق عصاره در گروه‌های تیمار یک هفته پس از اولین تزریق صورت گرفت. پس از ۲۸ روز از تاریخ کمپرسیون، با استفاده از متد پرفیوژن ابتدا بافت‌های بدن حیوان را تا حدی فیکسه می‌کنیم برای اینکار پس از بیهوش نمودن حیوان، از انتهای استخوان جناغ به صورت مثلثی برش زده به طوری که قفسه سینه شکافته شده و قلب نمایان گردد سپس سوند متصل به دستگاه پرفیوژن را از انتهای بطن چپ وارد آئورت نموده به دنبال آن برشی در ناحیه دهلیز راست ایجاد کردیم ابتدا به وسیله سرم فیزیولوژیک خون موجود در رگ‌ها را شسته سپس فیکساتور(فرمالین ۱۰٪ نمکی) را وارد گردش عمومی خون نمودیم و اینگونه بافت‌های جانور فیکس شد(۱۷). پس از آن از نخاع ناحیه کمری حیوانات نمونه‌برداری شد. نخاع تا انتهای مخروط انتهایی، از داخل ستون مهره‌ها خارج شده سپس از انتهای مخروط انتهایی نخاع ۱۸ میلی‌متر بالا رفته و نمونه‌هایی به طول ۸ میلی‌متر تهیه شد. نمونه‌های تهیه شده به مدت دو هفته درون فیکساتور قرار گرفته و پس از آن وارد مراحل پاساژ بافتی شدند که شامل سه مرحله: آبگیری از بافت(با استفاده از الکل)، شفاف سازی(توسط زایلن) و مرحله آغشتگی با پارافین بود. برش گیری با استفاده از دستگاه میکروتوم انجام شده به طوری که برش‌هایی با ضخامت ۷ میکرون ایجاد شد. برش گیری به صورت سریال صورت گرفته و از هر ۳۰ برش ۳ برش متوالی به لام منتقل گشت پس از آن نمونه‌ها با استفاده از رنگ آبی تلوئیدین رنگ آمیزی شدند(۱۸). در مرحله بعدی با استفاده از دستگاه فتو میکروسکوپ از منطقه شاخ قدامی نخاع در سمت راست در لام‌های تهیه شده، از دو برش متوالی عکس‌هایی تهیه گردید.

برای شمارش نورون‌های حرکتی α شاخ قدامی نخاع در سمت راست از روش دایسکتور استفاده شد. در این روش در یک چهارچوب مرجع نورون‌ها شمارش می‌گردند. اگر ذره‌ای در چهارچوب مرجع باشد ولی در چهار چوب بعدی(در برش متوالی بعدی) نباشد در شمارش به حساب می‌آید ولی اگر نورونی در هر دو چهار چوب باشد در شمارش محسوب نمی‌شود(۱۷).

پس از شمارش نورون‌ها دانسیته نورونی اینگونه محاسبه گردید:

$$ND=\Sigma Q/\Sigma frame \times V\ dissector$$

که در آن:

ΣQ: مجموع نورونهای شمارش شده در یک نمونه است.

Σframe: مجموع دفعات نمونه‌برداری شده در یک نمونه است.

V disecector: حجم چهار چوب نمونه‌برداری است که برابر است با:

$$V\ dissector= A\ frame \times H$$

A frame: مساحت چهار چوب نمونه برداری است.

H: فاصله بین دو برش متوالی یا ضخامت هر برش می‌باشد.

پس از به دست آوردن ND با استفاده از نرم افزار Minitab 13 و آزمون آماری ANOVA داده‌ها آنالیز شده و نتایج در سطح معناداری($P<۰/۰۰۱$) به دست آمد.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی پدیده دژنراسیون مرکزی در طول ۲۸ روز پس از کمپرسیون و بررسی اثر نوروپروتکتیو عصاره الکلی برگ گیاه شاهدانه به صورت شمارش نورون‌های حرکتی آلفا در شاخ قدامی نخاع گروه‌های تیمار شده در جدول ۱ ارائه گردیده است. همانطور که مشاهده می‌شود میانگین دانسیته تعداد نورون‌ها در گروه کمپرسیون کاهش معناداری را نسبت به گروه کنترل نشان می‌دهد همچنین دانسیته نورونی در گروه‌های تیمار شده با عصاره الکلی(دوز ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم الکلی) نیز افزایش معناداری را نسبت به گروه کمپرسیون به نمایش می‌گذارد.

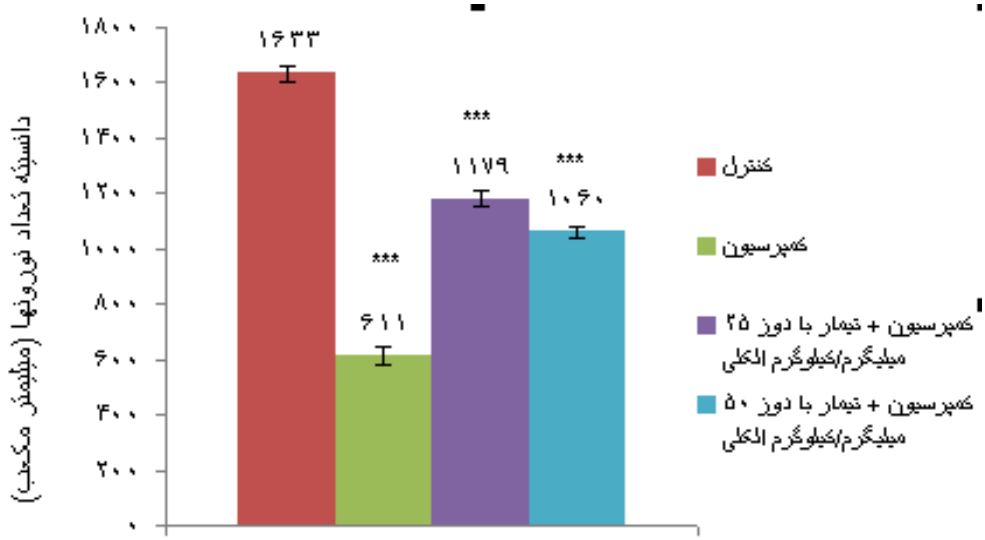
جدول ۱: مقایسه آلفاموتونورون‌های شمارش شده شاخ قدامی نخاع درسمت راست در گروه‌های مختلف

شماره نمونه	گروه کنترل	گروه کمپرسیون	گروه تیمار با دوز ۲۵ (میلیگرم/کیلوگرم الکلی)	گروه تیمار با دوز ۵۰ (میلیگرم/کیلوگرم الکلی)
۱	۱۵۷۹	۴۳۴	۱۲۲۴	۱۰۲۶
۲	۱۶۵۸	۵۹۲	۱۱۴۵	۱۰۶۶
۳	۱۵۰۰	۵۵۲	۱۲۲۴	۱۱۴۵
۴	۱۷۳۷	۷۱۰	۱۲۶۳	۱۰۲۶
۵	۱۶۵۸	۵۵۲	۱۱۴۵	۱۱۴۵
۶	۱۵۴۰	۶۷۱	۱۰۶۶	۹۸۷
۷	۱۶۵۸	۷۱۰	۱۲۲۴	۱۰۶۶
۸	۱۷۳۷	۶۷۱	۱۱۴۵	۱۰۲۶
میانگین ± انحراف معیار	۱۶۳۳/۴±۳۰/۷	۶۱۱/۵±۳۴/۲	۱۱۷۹/۵±۲۲/۹	۱۰۶۰/۹±۲۰/۴

با توجه به اینکه P=۰/۰۰۰ و (P<۰/۰۰۱) نمودار زیر نشان می‌دهد که بین دو گروه کنترل و کمپرسیون تفاوت معنی‌داری در دانسیته تعداد نورون‌ها وجود دارد.

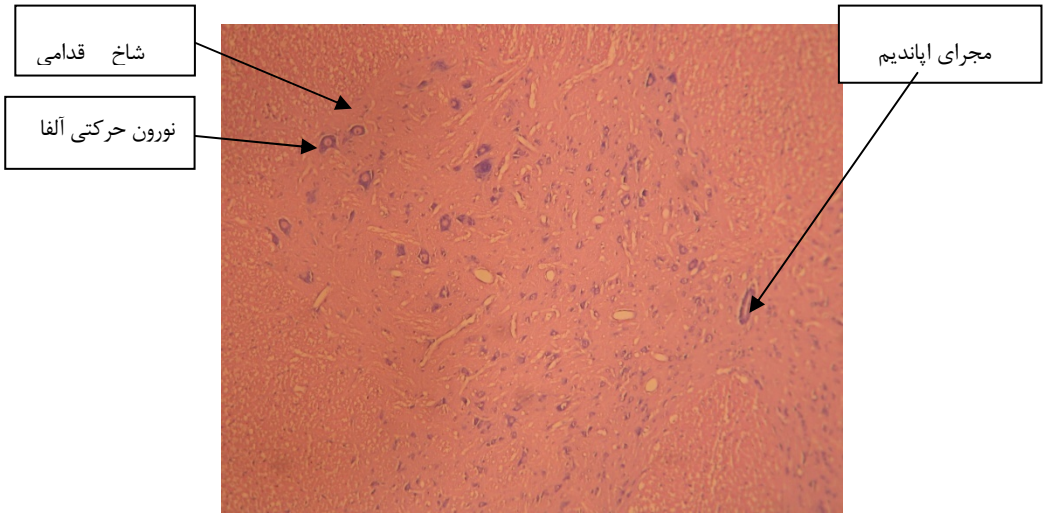
و همچنین گروه‌های تیمار شده با عصاره الکلی(دوز ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن عصاره الکلی برگ گیاه شاهدانه) افزایش معناداری را در دانسیته تعداد نورون‌ها در مقایسه با گروه کمپرسیون نشان می‌دهند.

جهت بررسی نتایج این تحقیق تصاویری از آلفا موتو نورون‌های شاخ قدامی نیمه راست نخاع مورد بررسی قرار گرفت که در تصاویر ۱ تا ۴ نمایش داده شده است.

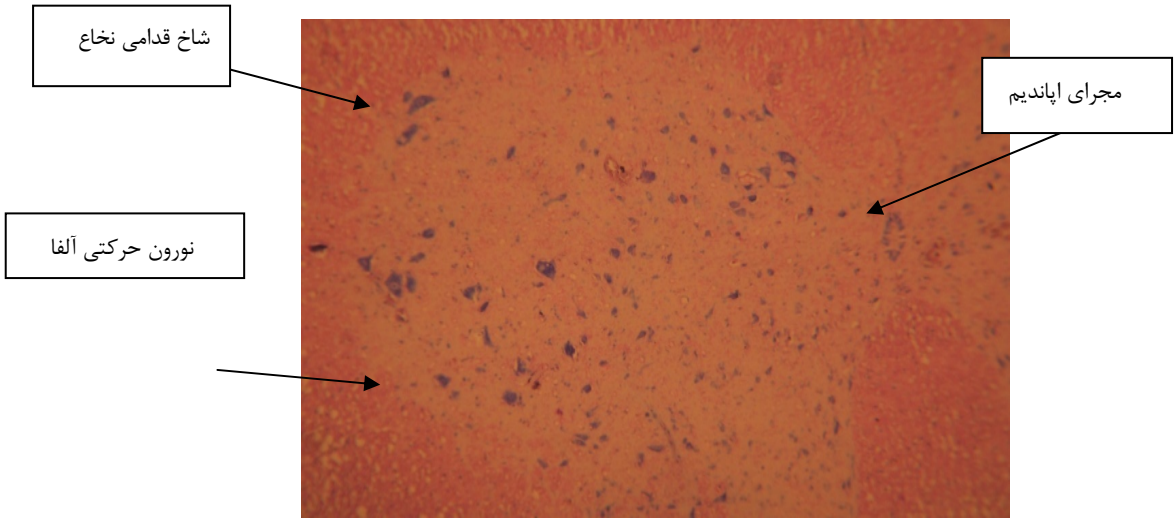


نمودار۱: مقایسه دانسیته تعداد نورونهای حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع بین کمپرسیون و سایر گروه ها (تعداد=۸)

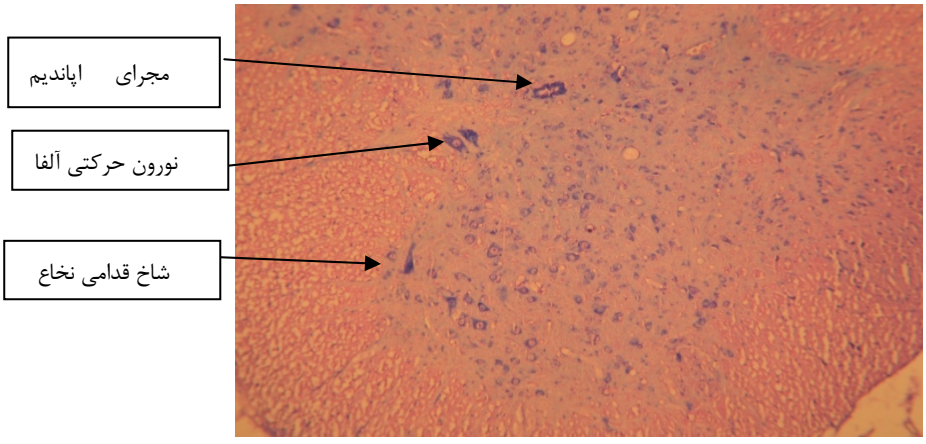
$P<0/001^{***}$، $P<0/01^{**}$ و $P<0/05^{*}$



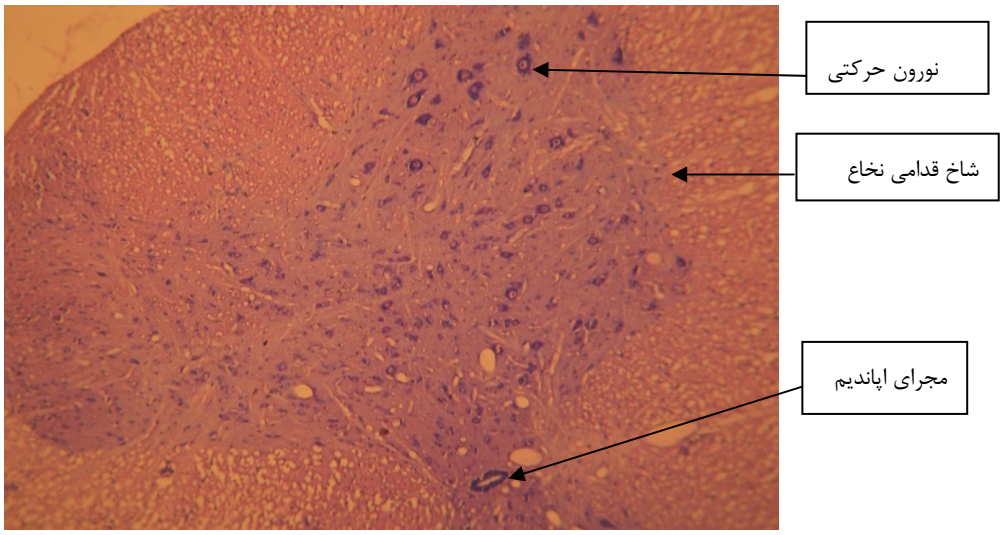
تصویر ۱: برش عرضی نخاع در گروه کنترل(رنگ آمیزی آبی تولوئیدین، درشتنمایی X ۴۰۰)



تصویر۲: برش عرضی نخاع در گروه کمپرسیون(رنگ آمیزی آبی تولوئیدین، درشتنمایی X ۴۰۰)



تصویر۳: برش عرضی نخاع در گروه تیمار[C دوز ۲۵ میلی‌گرم/کیلوگرم الکلی] (رنگ آمیزی آبی تولوئیدین، درشتنمایی X ۴۰۰)



تصویر ۴: برش عرضی نخاع در گروه تیمارD [دوز ۵۰ میلی گرم/ کیلوگرم الکلی](رنگ آمیزی آبی تولوئیدین، درشتنمایی X۴۰۰)

بحث

این مطالعه نشان داد که کمپرسیون عصب سیاتیک سبب کاهش معنی‌دار نورون‌های حرکتی آلفا شاخ قدامی نخاع موش صحرایی می‌گردد و عصاره الکلی برگ گیاه شاهدانه با دوز ۲۵ و۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم در موش‌هایی با کمپرسیون عصب سیاتیک، باعث افزایش معنی‌دار دانسیته نورون‌های حرکتی الفا شاخ قدامی نخاع می‌گردد.

تحقیقات نشان می‌دهد که آسیب‌های نخاعی منجر به بروز آپوپتوزیس و راه اندازی مسیرهای مرگ داخل سلولی می‌شوند(۱۹). تحقیقاتی که Kinugasa و همکارانش در سال ۲۰۰۲ انجام دادند نشان داد که آکسوتومی و له شدگی عصب آپوپتوز را در نورون‌ها القا می‌کند(۲۰). تحقیقی که ما نیز انجام دادیم موید این مطلب می‌باشد. همانطور که در قسمت نتایج مشاهده می‌گردد دانسیته نورونی در گروه کمپرسیون نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته بدین معنا که کمپرسیون عصب سیاتیک جانور سبب پدید آمدن اثرات دژنراسیون مرکزی به صورت رتروگراد به سمت جسم سلولی نورون‌های حرکتی در شاخ قدامی نخاع شده(تصاویر ۱ و ۲) و نهایتاً دانسیته نورونی در گروه کمپرسیون در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته(جدول۱)، (نمودار ۱)($p<۰/۰۰۱$).

شواهدی که طی چند سال اخیر جمع‌آوری شده نشان می‌دهد که مواد مخدر مبتنی بر اندوکانابینوئیدها به طور باالقوه‌ای برای کاهش اثرات نورودژنراسیون سیستم عصبی مفید می‌باشد. در واقع کانابینوئیدهای درونی و بیرونی به منظور اعمال محافظت نورون در مدل‌های آزمایشگاهی و طبیعی از مکانیسم‌های زیر استفاده می‌کنند:

۱- جلوگیری از مسمومیت نورونی با استفاده از جلوگیری از آزاد سازی گلوتامات ۲- کاهش نفوذ کلسیم ۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۴– افزایش بیان فاکتورهای نروتروفیک ۵- کاهش التهاب ۶- افزایش خون رسانی به محل آسیب دیده(۲۱،۲۲).

با توجه به موارد ذکر شده کانابینوئیدها می‌توانند به عنوان مولکول‌های محافظ نورونی لحاظ شوند. آنها خصوصیات آنتی‌اکسیدانی فوق العاده‌ای دارند. در واقع کانابینوئیدها اثرات پروتکتیوی خود در مقابل سمیت گلوتامات را از مسیرهای وابسته به رسپتور انجام نمی‌دهند(۲۳) بلکه آنها به وسیله خصوصیات آنتی‌اکسیدانی اثرات خود را القا می‌کنند و اثرات آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات از طریق آسکوربات و آلفا توکوفرول اعمال می‌شود که به کانابینوئیدها توان مقابله با گلوتامات و

آسیب‌های اکسیداتیو را می‌دهد(۲۴).

بنابراین احتمال می‌رود یکی از مکانیسم‌های اصلی که گیاه کانابیس ساتیوا(حاوی کانابینوئید) از آن جهت اعمال حفاظت نورونی بهره جسته باشد ویژگی آنتی‌اکسیدانی این گیاه باشد و احتمالاً به این دلیل دانسیته نورونی در گروه‌هایی که با عصاره الکلی این گیاه تیمار شده نسبت به گروه کمپرسیون افزایش یافته است.

کانابینوئیدها همچنین سبب کاهش التهاب در ناحیه آسیب دیده می‌گردد به طوری که این ماده در مراحل اولیه پس از آسیب از ترشح سایتوکین‌های اصلی و التهابی مانند فاکتور نکروز دهنده توموری آلفا(TNF-α) اینتر لوکین ۱ بتا(IL-1β) و اینتر لوکین ۶(IL-6) جلوگیری می‌نماید(۲۴). بنابراین مکانیسم موثر دیگری که به وسیله آن عصاره الکلی برگ گیاه می‌تواند پس از کمپرسیون عصب سیاتیک از مرگ سلولی جلوگیری کند کاهش التهاب در محل آسیب می‌باشد.

افزایش خون رسانی به محل آسیب دیده نیز مکانیسم دیگری است که سبب بقای نورون‌ها می‌گردد. تحقیقات منتشر شده نشان می‌دهد کانابینوئیدها از واکنش‌های تحریک شده توسط فاکتور اندوتلین ۱(که سبب انقباض عروق می‌شود) پیشگیری کرده و با کاهش انقباض عروق در ناحیه آسیب دیده سبب افزایش خون رسانی به این ناحیه شود(۲۵). بنابراین می‌توان گفت که کانابینوئیدها با استفاده از هر یک از مکانیسم‌های ذکر شده به لحاظ بالینی مولکول‌های محافظ نورونی می‌باشند و بدین جهت است که دانسیته نورونی در گروه‌های تیمار شده با عصاره الکلی برگ گیاه Cannabis Sativa(حاوی ماده موثره کانابینوئید) افزایش معناداری در مقایسه با گروه کمپرسیون داشته است.

بر اساس تحقیقات گذشته کانابینوئیدها می‌توانند به عنوان فاکتورهای محافظتی در برخی بیماری‌های از بین برنده نورون‌های عقده‌های قاعده‌ای مانند پارکینسون و هانگ تین‌تون کره مطرح باشند(۲۲). در حقیقت کانابینوئیدها برای حفاظت نورونی از دو مکانیسم اصلی استفاده می‌کنند که شامل:

مکانیسم مستقل از رسپتورهای کانابینوئیدی است که هدف آن کاهش آسیب‌های اکسیداتیو است.

القا و افزایش رسپتورهای کانابینوئیدی CB2 است(۲۲).

آنچه ما در این تحقیق یافتیم کاملا منطبق با یافته‌های تحقیقات دیگر بوده است همانطور که اشاره گردید کانابینوئیدها عناصری حفاظتی هستند که با استفاده از روشهای گوناگون از بروز مرگ نورونی و پیشروی آن جلوگیری می‌نمایند.

نتیجه‌گیری

به نظر می‌رسد عصاره الکلی برگ گیاه کانابیس ساتیوا(Cannabis Sativa) دارای ماده یا مواد موثره ای است که پس از آسیب آکسونی از افزایش نفوذ کلسیم به درون آکسون جلوگیری نموده و با کاهش التهاب و افزایش خون رسانی به محل آسیب دیده، جمع‌آوری و حذف اکسیدانت‌های مضر از مرگ نورون‌ها جلوگیری کرده و بقای آنها را تضمین می‌کند علاوه بر آن این ماده همچنین سبب افزایش فاکتورهای نوروتروفیک شده و احتمالاً بدین وسیله سبب ترمیم نورون‌های آسیب دیده می‌گردد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره الکلی برگ گیاه مذکور یک عامل حفاظت نورونی بوده که احتمالاً می‌توان آن را جهت درمان بسیاری از بیماری‌های نورودژنراتیو استفاده نمود.

سپاسگزاری

این تحقیق در گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صورت گرفت که از تمام همکاران گروه زیست و مدیریت محترم گروه سرکار خانم دکتر محمودزاده و ریاست محترم دانشکده علوم آقای دکتر هروی جهت همکاری‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع:

1- Vargas ME, Barres BA. ***Why is wallerian degeneration in the CNS so slow.*** Annual Rev neurosci 2007; 30: 153-79.

2- Coleman MP, Conforti L, Buckmaster EA, Tarlton A, Ewing RM. ***An 85–kb tandem triplication in the slow wallerian degeneration (Wids) mouse.*** Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95(17): 9985-90.

3- Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Misgeld T. ***In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord.*** Nat Med 2005; 11: 572-77.

4- Ferrer I, Planas AM. ***Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra.*** J Neuropathol Exp Neurol 2003; 62(4): 329-39.

5- Kirsch M, Campos Friz M, Vouioukas VI, Hafmann HD. ***Wallerian degeneration and axonal regeneration after sciatic nerve crush arealtered in ICAM-1- deficientmice.*** Cell Tissue Res 2009; 338(1): 19-28.

6- Small E, Cronquist A. ***A practical and natural taxonomy for cannabis*** .Taxon 1976; 25(4): 405-35

7- Small E, Beckstead HD. ***Common cannabinoid phenotypes in 350 stocks of Cannabis.*** Lloydia 1973; 36(2): 144-65.

8- Grotenhermen F, Russo E. ***Cannabis and cannabinoids: pharmacology, toxicology, and therapeutic potential.*** New York. Routledge; 2002. p. 123.

9- Unzicker C, Erberich H, Moldrich G, Woldt H, Bulla J, Mechoulam R, et al. ***Hippocampal cannabinoid -1 receptor upregulation upon endothelin-B receptor deficiency: a neuroprotective substitution effect ?*** Neurochem RES 2005; 19(7): 1691-98.

10- Osei-Hyiaman D, Harvey–White J, Batkai S, Kunos G. ***The role of the endocannabinoid system in the control of energy homeostasis.*** Int J Obes (Lond) 2006; 30(suppl 1): S33-8.

11- Kirkham TC, Tucci SA. ***Endocannabinoids in appetite control and the treatment of obesity.*** CNS Neuronal Disorder Drug Targets 2006; 5(3): 275-92.

12- King SA. ***Cannabinoids and Pain***. Psychiatric Times 2008; 25 (2):12-16

13- Di Marzo V, Goparaju SK, Wang L, Liu J, Bátkai S, Járai Z, et al. ***Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake.*** 2001; 410(6830): 822-5.

15- Kirkham TC, Williams CM, Fezza F, Di Marzo V. ***Endocannabinoid levels in rat limbic forebrain and hypothalamus in relation to fasting, feeding and satiation: stimulation of eating by 2-arachidonoyl glycerol.*** Br J Pharmacol 2002; 136(4): 550-7.

16- Karsenty G. ***Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass.*** Cell Metab 2006; 4(5): 341-8.

17- Behnam-Rasuli M, Nikravesh M, Mahdavi-Shahri N, Tehranipour M. ***Post operative time effect after siatic nerve crush on the number of alpha motonrurons,using a stereological counting method(Disector).*** Iran Biomed J

2000; 4(1): 45-9.

18- Kiernan J. ***Histological & histochemical methods theory & practice.*** 4th ed. London: Cold Spring Harbor laboratory Press; 2008. p. 214-39.

19- Guertin AD, Zhang DP, Mak KS, Alberta JA, Kim HA. ***Microanatomy of axon/glial signaling during Wallerian degeneration.*** J Neuroscience 2005; 25: 3478-87.

20- Kinugasa T, Ozaki S, Hamanaka S, Kudo N. ***The effects of sciatic nerve axotomy on spinal motoneurons in neonatal Bax-deficient mice .*** Neurosci Res 2002; 44(4): 439-46.

21- van der Stelt M, Di Marzo V. ***Cannabinoid reseptors and theire role in neuroprotection.*** Neuro Molecular Med 2005; 7(1-2): 37-50.

22- Sagredo O, Arencibia G, Lago E, Finetti S, Decio A. ***Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorder.*** Mol Neurobiol 2007; 36(1): 82-91.

23- Chen J, Lee CT, Errico S, Deng X, Cadet JL, Freed WJ. ***Protective effects of Δ9-tetrahydrocannabinol against N-methyl-D-aspartate-induced AF5 cell death.*** Brain Res Mol Brain Res 2005; 134(2): 215-25.

24- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. ***Cannabidiol and(-)-D9- tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants.*** Proc Nati Acad Sci USA 1998; 95(14): 8268-73.

25- Mechoulam R, Shohami E. ***Endocannabinoids and traumatic brain injury.*** Mol Neurobiol 2007; 36(1): 68-74.

The Neuroprotective Effect of Alcoholic Extract of Cannabis Sativa on Neuronal Density of Spinal Cord Alpha Motoneurons after Sciatic Nerve Injury in Rats

Tehranipour M(PhD)[1], Javadmoosavi Z(MSc)*[2]

[1,2]Department of Biology, Islamic Azad University Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Received: 7 Jul 2010 Accepted: 9 Apr 2011

Abstract

Introduction: Injuries of the peripheral nerve system affect the neurons cell body leading to axon injury. Cannabis sativa plant has anti oxidant and anti apoptotic effects. Therefore the aim of present study was to study the neuroprotective effect of alcoholic extract of cannabis sativa leaves on neuronal density of alpha motoneurons in spinal cord after sciatic nerve injury in rats.

Methods: In this experimental research, animals were divided into four groups; A: control, B: compression, C: compression+ treatment with 25 mg/kg alcoholic extract, D: compression + treatment with 50 mg/kg extract (n=8). At first, sciatic nerve compression in B, C and D groups was achieved for 60 seconds using locker pincers. Alcoholic extract was injected intra peritoneally in the first and second weeks after compression. Then 28 days after compression, under profusion method, the lumbar spinal cord was sampled and the numerical density in each group was compared with the compression group. The data was analyzed with the use of Minitab 14 software and ANOVA statistical test.

Results: Neuronal density showed a meaningful difference in the compression and control groups($P<0.001$). Neuronal density in treatment groups(25, 50 mg/kg) also had a meaningful increase($P<0.001$) as compared to the compression group.

Conclusion: Alcoholic extract of cannabis sativa leaves has a neuroprotective effect on spinal cord alpha motoneurons after injury. This could be due to growth and regeneration factors present in the alcoholic extract of cannabis sativa leaves that induce regeneration process in injured neurons or prevent degeneration.

Keywords: Cannabis, Nerve Degeneration, Nerve Regeneration; Pripheral Nervous System Diseases

This paper should be cited as:
Tehranipour M, Javadmoosavi Z. ***The neuroprotective effect of alcoholic extract of cannabis sativa on neuronal density of spinal cord alpha motoneurons after sciatic nerve injury in rats*** . J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(3):339-49.

Corresponding author: Mobile: +98 9132533573, Email: javadmosavi60@yahoo.com