مجلـه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـــان
دوره‌ی ۲٤, شمـاره‌ی ۱۰٦, آذر و دی ۱۳۹۵, صفحات ٦۳ تا ۷۸

اثر محافظتی دوزهای مختلف کانابیدیول بر میزان نفوذپذیری سد خونی- مغزی و آسیب‌های حاصل از مدل ایسکمی مغزی در موش صحرایی

سپیده خاکسار[۱]، دکتر محمدرضا بیگدلی[۲]

نویسنده‌ی مسوول: گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی bigdelimohammadreza@yahoo.com

دریافت: ۹۴/۸/۲۷ پذیرش: ۹۴/۱۰/۲۱

چکیده

زمینه و هدف: *سکته‌ی مغزی از بیماری‌های نورولوژیکی است که سرعت وقوع آن در جوامع در حال توسعه رو بـه افـزایش اسـت. کانابیـدیول ترکیبی غیرروان گردان از گیاه شاهدانه است که امروزه در زمینه‌ی پژوهش‌های بنیادی و درمانی توجه محققـین را بـه خـود جلـب کـرده اسـت. به‌طوری که از بارزترین خصوصیت آن، اثرات نوروپروتکتیو قوی است که در مدل‌های حیوانی صرع، آلزایمر و پارکینسون بـه خـوبی نـشان داده شده است. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر کانابیدیول بر آسیب‌های سکته‌ی مغزی به ویژه انسجام سد خونی- مغزی بود.*

روش بررسی: *تعداد ٦٦ سر موش صحرایی بالغ نر از نژاد ویستار انتخاب و به‌صورت تصادفی به شش گروه اصلی تقسیم بندی شدند. با اسـتفاده از جراحی استریوتکسی، کانول در بطن جانبی مغز تعبیه شد. کانابیدیول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و۲۰۰ نانو گرم به مدت پـنج روز بـه بطـن جـانبی تزریق گردید. بعد از تیمار، موش‌ها تحت عمل جراحی ایسکمی مغزی قرار گرفتند و بعد از ۲۴ ساعت، نقایص نورولوژیکی، حجم انفارکتوس و میزان نفوذ پذیری سد خونی- مغزی مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که کانابیدیول در دوزهای ۱۰۰ و۲۰۰ نانو گرم در ایسکمی مغزی موجب کاهش قابل توجهی در نقایص نورولوژیکی، حجم انفارکتوس و نفوذپذیری سد خونی- مغزی در مقایسه با گروه حلال گردید.*

نتیجه‌گیری: *یافته‌های این مطالعه بیان می‌دارد که کانابیدیول احتمالا با کـاهش میـزان نفوذپـذیری سـد خـونی- مغـزی و نقـایص نورولـوژیکی، آسیب‌های حاصله از ایسکمی را که به‌صورت انفارکتوس بروز می‌کند را به طور قابل توجهی تخفیف می‌دهد.*

واژگان کلیدی: ***کانابیدیول، ایسکمی مغزی، انفارکتوس مغزی، سد خونی- مغزی***

مقدمه

شاهدانه نوعی گیاه گلدار است که دارای برگ‌هـاي انبـوه دراز و کنگره دار می‌باشد و بومی آسـیای مرکـزی و جنـوبی است. کانابینوئیدها برای اولین بار از گیـاه شـاهدانه اسـتخراج گردید. به‌طور کلـی کانابینوئیـدها بـه انـواع فیتوکانابینوئیـدها (کانابینوئیـدهای طبیعـی اسـتخراج شـده از گیـاه شـاهدانه)، کانابینوئیدهای درون زا (برای نمونـه آناندامایـد و AG-۲) و کانابینوئیدهای سـنتزی (ماننـد CP55,940 و Win55,212) تقسیم بندی می‌شود (۱). تاکنون ۴۸۳ ترکیب شیمیایی از این

۱- دانشجوی دکترای فیزیولوژی جانوری، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

۲- دکترای فیزیولوژی جانوری، دانشیار گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده‌ی علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی

گیاه شناسایی و ۸۵ ترکیب کانابینوئیدی متفاوت استخراج شده است. مهم ترین ترکیبات فیتوکانابینوئیدی، Δ9-تترا هیدروکانابینول (THC) و کانابیدیول (CBD یا Cannabidiol) است. THC به‌عنوان ترکیب اصلی روان گردان این گیاه شناخته شده است و به‌عبارتی بسیاری از اثرات مضر کانابیس به THC نسبت داده شده است (۲). از نگاهی دیگر، عدم خصوصیات روان گردانی کانابیدیول و خواص پروتکتیو آن جنبه‌ی مثبتی از گیاه شاهدانه را آشکار می‌کند (۳). درعین حال، دیده شده است که استفاده‌ی طولانی مدت کانابیدیول، تحمل به اثرات پروتکتیو را ایجاد نمی‌کند. همچنین اثرات آن بادوام و طولانی مدت است (٤). در دهه‌ی اخیر، خواص درمانی کانابیدیول در زمینه‌ی بیماری‌های مرتبط با دستگاه عصبی مرکزی به ویژه بیماری نورودژنرتیو توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است (۳). یکی از بیماری‌های سیستم عصبی مرکزی که ناتوانی جسمی مزمن و هزینه‌های هنگفت مالی و روانی را در جوامع بشری به دنبال دارد؛ سکته‌ی مغزی است. سکته‌ی مغزی سومین علت مرگ و میر را در دنیا به خود اختصاص داده است (۵). ۸۵ درصد سکته‌های مغزی به علت ایسکمی و ۱۵ درصد به علت خونریزی می‌باشد. مغز برای حفظ عملکرد و زنده ماندن نیاز به تامین مستمر اکسیژن و گلوکز دارد. زمانی که تامین این دو به دلیل ایسکمی مغزی دچار اختلال شود؛ آبشاری از وقایع پاتوفیزیولوژی پشت سر هم اتفاق می‌افتد که تماما ناشی از فقدان یا کاهش انرژی به شکل ATP است (٦). با بررسی سکته‌ی مغزی در مدل‌های حیوانی، اطلاعات مفیدی در زمینه‌ی پاتوفیزیولوژی ایسکمی مغزی به دست آمده است. به‌طوری که به‌طور اختصار می‌توان آزادسازی بیش از حد گلوتامات، افزایش کلسیم درون سلولی (۷)، اختلال در عملکرد میتوکندری، تجمع رادیکال‌های آزاد، استرس اکسیداتیو (۸)، التهاب (۹)، تخریب سد خونی- مغزی (۱۰)، ادم مغزی و در نهایت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را نام برد (۱۱). از میان فرآیندهای پاتوفیزیولوژی ناشی از ایسکمی، افزایش نفوذپذیری سد خونی- مغزی جزء آسیب‌های جدی محسوب می‌شود. تغییراتی که در ترکیبات ساختاری رگ‌های خونی در طی ایسکمی مغزی اتفاق می‌افتد؛ می‌تواند نفوذپذیری سد خونی- مغزی را افزایش دهد. اختلال در عملکرد سد خونی- مغزی با آزادسازی وسیع رادیکال‌های آزاد مانند ROS و واسطه‌گرهای التهابی (سایتوکین و کموکاین‌ها) از بافت‌های آسیب دیده توصیف می‌شود. این واسطه گرهای التهابی بیان مولکول‌های چسبنده مانند مولکول چسبنده‌ی درون سلولی-۱ (ICAM-1) و مولکول چسبنده‌ی سلول رگی-۱ (VCAM-1) را در سلول‌های اندوتلیال افزایش داده و به‌دنبال آن چسبندگی لوکوسیت‌های در گردش را به سلول‌های اندوتلیال القا کرده و در نهایت تغییر در انسجام سد خونی- مغزی و مهاجرت به خارج از رگ‌ها و نفوذ در پارانشیم مغزی را موجب می‌شود (۱۲). لوکوسیت‌های مهاجرت کرده از رگ‌ها موجب ترشح بیشتر رادیکال‌های آزاد، سایتوکین‌ها و کموکاین‌ها (به ویژه فاکتور نکروز تومور و اینترلوکین‌ها) می‌گردد که همین فرآیند در نابودی بیشتر ماتریکس خارج سلولی و شکستن سد خونی- مغزی نقش ایفا می‌کند (۹). بنابراین هر عاملی که بتواند موجب کاهش فاکتورهای التهابی، تعدیل رادیکال‌های آزاد و حفظ یکپارچگی سد خونی- مغزی شود؛ نقش بسزایی در کاهش آسیب‌های حاصل از ایسکمی خواهد داشت. از سوی دیگر از میان ترکیبات کانابینوئیدی گیاه شاهدانه، خصوصیات بارزی از کانابیدیول وجود دارد که این ترکیب را به‌عنوان کاندید مناسبی برای کاهش آسیب‌های حاصل از ایسکمی مغزی معرفی می‌کند از جمله، نقش ضد التهابی و آنتی‌اکسیدانی کانابیدیول است (١٤و ١٣). گزارش شده است که کانابیدیول توانسته است با کاهش اینترلوکین-۱ و نیتریک اکساید سنتتاز القایی (iNOS)(۱۵) و مهار مهاجرت نوتروفیل‌ها (٤) نقش ضد التهابی خود را ایفا کند. در ضمن،

همان‌گونه که اشاره شده است افزایش بیش از حد رادیکال‌های آزاد و استرس اکسیداتیو یکی از آسیب‌های شاخص ایسکمی مغزی است که به مرگ نورونی می‌انجامد و گزارشات حاکی از خاصیت نوروپروتکتیو قوی کانابیدیول به‌واسطه‌ی مهار استرس اکسیداتیو می‌باشد (۱۳). آسیب ایسکمی تنها به سکته‌ی مغزی منتهی نمی‌شود؛ بلکه این فرآیند در جراحی بیماران آنوریسم، مبتلایان به کم خونی داسی شکل سلول، نقص‌های مادرزادی قلب و سابقه‌ی حمله‌ی قلبی نیز اتفاق می‌افتد. یکی از اهداف تحقیق حاضر، یافتن استراتژی جدیدی برای ایجاد تحمل به ایسکمی در این افراد است. بنابراین در این تحقیق در نظر گرفتیم که اثرات کانابیدیول را در مدل حیوانی سکته مغزی مورد بررسی قرار دهیم. بدین صورت که با استفاده‌ی مکرر کانابیدیول به مدت پنج روز در سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم پارامترهای ارزیابی آسیب‌های ایسکمی که شامل نقص‌های نورولوژیکی، حجم سکته و میزان نفوذپذیری سد خونی- مغزی می‌باشد را مورد سنجش قرار دادیم. در این پژوهش برای اولین بار اثر تزریق درون مغزی کانابیدیول بر آسیب‌های ایسکمی مغزی مورد ارزیابی قرار گرفته است. همچنین تاکنون اثر کانابیدیول بر انسجام سد خونی- مغزی بررسی نشده است. امید است که با توجه به اهمیت چشمگیر کانابیدیول به عنوان یک عامل امید بخش، به‌همراه اطلاعات حاصل از این پژوهش بتوان مسیری در جهت کاهش صدمات این قشر آسیب پذیر از جامعه باز نمود.

روش بررسی

گروه بندی حیوانات: ٦٦ سرموش صحرایی بالغ نر به وزن ۲۵۰ الی ۳۵۰ گرم از نژاد ویستار از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی خریداری شده و در شرایط استاندارد (دمای ۲±۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد و چرخه‌ی ۱۲ ساعت روشنایی/ تاریکی با شروع روشنایی در ساعت ۷ صبح) برای آزمایش نگهداری شدند. حیوانات در تمام مدت آزمایش دسترسی آزاد به آب و غذا داشتند. در این تحقیق سعی شد که از حداقل موش‌های صحرایی استفاده گردد. تمامی مراحل آزمایش نیز بر اساس پروتکل تایید شده کمیته اخلاق دانشگاه شهید بهشتی اجرا شد. لازم به ذکر است، این تحقیق به روش تجربی انجام شد. موش‌های صحرایی به‌صورت تصادفی به شش گروه اصلی (n=۶) تقسیم بندی شدند. در گروه اول یا کنترل، موش‌هایی که بدون دریافت تیماری تحت عمل جراحی استریوتکسی و ایسکمیک قرار گرفتند. موش‌های گروه دوم یا شم بدون دریافت تیماری، استرس جراحی بر روی آن‌ها اعمال شد. بدون این که کانولی در سر آن‌ها تعبیه شود و یا این که فیلامنتی شریان مغزی آن‌ها را مسدود کند. گروه سوم نیز گروه دریافت کننده‌ی حلال نامگذاری شد که به مدت پنج روز حلال کانابیدیول را پیش از جراحی ایسکمی مغزی دریافت کردند. در نهایت گروه دریافت کننده‌ی کانابیدیول به سه زیرگروه ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم تقسیم بندی شد. در این زیرگروه‌ها، موش‌های صحرایی کانابیدیول را به مدت پنج روز و روزی یک بار از طریق بطن‌های جانبی مغزی دریافت کردند و در روز پنجم سی دقیقه بعد از دریافت کانابیدیول تحت عمل جراحی ایسکمی مغزی قرار گرفتند و بعد از انسداد یک ساعته‌ی شریان میانی مغزی، خونرسانی مجدد برقرار گردید. بیست و چهار ساعت بعد برای سنجش نقایص نورولوژیکی، حجم سکته و نفوذپذیری سد خونی- مغزی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در گروه‌هایی که تحت عمل جراحی ایسکمیک قرار گرفته بودند، زیرگروه‌های مجزا برای تعیین حجم سکته و نفوذپذیری سد خونی- مغزی در نظر گرفته شد. مقایسه‌ی آماری بین گروه‌های کنترل و دریافت کننده‌ی حلال انجام شد، زیرا شواهدی مبنی بر نقش وپروتکتیو DMSO دیده شده است (١٦).

ترکیبات دارویی: کانابیدیول (Tocris, UK) در محلولی از

۱۰DMSO درصد و ۹۰PBS درصد حل گردید. تزریق کانابیدیول پیش از انجام جراحی ایسکمی مغزی در سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم صورت گرفت (۱۷). تزریق به‌صورت یک طرفه به بطن جانبی راست مغز در حجم دو میکرولیتر انجام گرفت (۱۷). به ازای تزریق هر میکرولیتر زمانی معادل ۶۰ ثانیه در نظر گرفته شد. همچنین پس از اتمام تزریق، ۶۰ ثانیه نیز برای اطمینان از ورود داروها به داخل بطن مغزی محاسبه گردید.

جراحی استریوتاکسی: پس از بیهوشی، سر حیوان در دستگاه استریوتاکس (Stoelting, USA) قرار گرفته و موی سرشان تراشیده شد و به وسیله‌ی دستگاه استریوتاکس ثابت گردید تا امکان اعمال جراحی بر روی آن وجود داشته باشد. سپس ناحیه‌ی سر ضد عفونی شده و با تیغ بیستوری یک برش طولی روی پوست سر ایجاد شد. به دنبال آن بافت‌های زیر جلدی کنار زده شده تا استخوان جمجمه در معرض دید قرار گیرد. سپس با استفاده از مختصات بطن جانبی مغز به دست آمده از اطلس پاکسینوس مکان مورد نظر علامت گذاری شد (AP,−0.58 mm; L,±1.4 mm; DV,−1.6 mm) (۱۸) و با استفاده از مته سوراخ گردید و کانولی از جنس فولاد ضد زنگ که از سر سوزن شماره‌ی ۲۳ تهیه شده بود؛ بر روی جمجمه در محل بطن جانبی تعبیه گردید. برای حفاظت کانول از آلودگی و بسته نشدن، با استفاده از کانول‌های مخصوص دندانپزشکی سرپوشی برای کانول‌ها ساخته شد. در نهایت ناحیه‌ی جراحی توسط سیمان جراحی پر شد. پس از اتمام جراحی همه‌ی حیوانات یک هفته دوره ریکاوری بعد از عمل را گذراندند. یک هفته پس از جراحی، کانابیدیول و حلال آن با سرنگ همیلتون و با حجم دو مایکرولیتر در داخل بطن جانبی تزریق شد.

تاییدیه‌ای بر محل قرارگیری کانول در بطن جانبی مغز: کانول بر طبق اطلس پاکسینوس و واتسون تعبیه شد (۱۸). بعد از انجام تست رفتاری، موش‌ها با دوز بالای کلروفرم کشته و مغزهای آنها جدا شده در فرمالین ۱۰ درصد برای ۴۸ ساعت تثبیت شدند، سپس برش گیری از مناطق مغزی ورود کانول انجام گرفت.

ایجاد مدل سکته‌ی مغزی (انسداد شریان میانی مغزی): موش‌های صحرایی پس از بیهوشی، تحت عمل جراحی انسداد شریان میانی مغزی راست (Middle Cerebral Occlusion Artery) قرار گرفتند. بدین صورت که یک نخ بخیه نایلون ۳-۰ از طریق تنه شریان کاروتید مشترک (Commen Carotid Artery) وارد رگ شریانی داخلی (Internal Carotid Artery) گردید و تا رسیدن به شریان مغزی قدامی (Anterior Carotid Artery) از میان شریان کاروتیدی داخلی ادامه داده شد. در اثر ورود نخ بخیه و مسدود کردن مسیرهای شریان‌های خون رسان، جریان خون از هر طرف به MCA بسته شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی متر طول نخ از تنه CCA مشخص می‌گردد. بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم با کمک دماسنج دیجیتالی اندازه‌گیری شد و در حدود ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد حفظ گردید.

ارزیابی رفتاری نقایص نورولوژیک: بیست و چهار ساعت بعد از خونرسانی مجدد، ارزیابی نورولوژیکی انجام گرفت. در این بخش، توانایی حسی و حرکتی حیوان در هشت تست سنجیده شد. در بخش ارزیابی حرکتی، با انجام تست‌هایی توانایی حیوان برای بالا رفتن از سطح شیب‌دار، میزان قدرت و تعادل وضعی اندام‌ها و تقارن تونوس عضلانی مورد ارزیابی قرار گرفت. با ابزارهایی میزان حس حیوان در اندام‌های جلویی و عقبی سنجیده شد. همچنین میزان هوشیاری حیوان، تقارن اندام‌ها در هنگام راه رفتن و موقعیت قرارگیری اندام‌ها بر روی سطح صاف به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت که در جدول ۱ توضیح داده شده است. مجموعه امتیازهای به‌دست آمده از هر تست به‌عنوان امتیاز کل

نورولوژیکی محاسبه گردید که با حداکثر امتیاز ۲۸ و با حداقل امتیاز صفر در موش‌های نرمال اعلام گردید (۱۹).

ارزیابی حجم سکته مغزی: بیست و چهار ساعت بعد از خونرسانی مجدد، موش‌های صحرایی با دوز بالای داروی بیهوشی کشته شدند و مغزشان خارج شده و در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در سالین سرد استراحت داده شدند. سپس، مغز در ماتریکس مغزی قرار داده شد و به‌طور کرونال به مقاطع دو میلی‌متر برش داده شد. این برش‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد (بن ماری) در محلول دو درصد ۲،۳،۵ تری فنیل تترازولین کلراید (TTC) (مرک، آلمان) برای رنگ‌آمیزی انکوبه شدند. رنگ سفید نشانگر نواحی ایسکمیک و رنگ قرمز یا صورتی همان نواحی سالم هستند. سپس این برش‌ها به‌ترتیب در کنار کاغذ شطرنجی دارای مقیاس، چیده شدند و عکس برداری با یک دوربین دیجیتال انجام گرفت. در نهایت مساحت ناحیه‌ی ایسکمی هر برش توسط برنامه Image j (version 1.46r) مورد سنجش قرار گفت و این مساحت حاصل در ضخامت دو میلی‌متر ضرب شده و اعداد همه برش‌ها جمع شده و با روش Swanson طبق فرمول زیر محاسبه شد (۲۰). در واقع با محاسبه‌ی حجم تصحیح شده ناحیه آسیب دیده (Corrected Infarct Volume)، دخالت ادم مغزی در اندازه‌گیری حجم سکته تصحیح گردید.

(CIV) حجم تصحیح شده ناحیه آسیب دیده = حجم نیمکره‌ی چپ – (حجم نیمکره‌ی راست – حجم ناحیه‌ی آسیب دیده)

سنجش میزان نفوذپذیری سد خونی- مغزی: استحکام سد خونی- مغزی توسط اندازه‌گیری میزان خروج اوانس بلو (EB) ارزیابی می‌شود. نخست، رت‌ها از طریق ورید دم، محلول اوانس بلو ۲ درصد را به اندازه‌ی ۴ میلی‌لیتر در کیلوگرم وزن بدن بعد از ۳۰ دقیقه ایسکمی دریافت می‌کردند. ۲۴ ساعت بعد از جریان مجدد خون، رت‌ها تحت بیهوشی از ناحیه‌ی قفسه سینه باز می‌شوند و با ۲۵۰ میلی‌لیتر سالین از طریق بطن چپ از وجود اوانس بلو داخل رگی پاک می‌شوند تا زمانی که مایع پرفیوز بی‌رنگ از دهلیز راست خارج شود سپس مغز خارج می‌شود. برای اندازه‌گیری میزان خروج EB، بافت مغز در ۵/۲ میلی‌لیتر بافر فسفات هموژن شده و برای رسوب پروتئین به آن ۵/۲ میلی‌لیتر اسیدتری کلرواستیک ۶۰ درصد اضافه می‌شود. سپس سه دقیقه با ورتکس به هم زده می‌شود و ۳۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد خنک می‌شود. آن گاه به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌گردد. در نهایت، جذب نوری اوانس بلو در بخش رویی توسط اسپکتوفتومتر (امریکا Perkin-Elmer) در طول موج ۶۱۰ نانو متر اندازه‌گیری می‌شود و غلظت آن مطابق منحنی استاندارد محاسبه می‌گردد.

تجزیه و تحلیل آماری: تمام آنالیزها با کمک نرم افزار SPSS۲۲ انجام شد. داده‌های حاصل از امتیازهای نقص رفتاری نورولوژیک با استفاده از آنالیز غیر پارامتریک Kruskal-Wallis و آزمون تعقیبی Dunn و نتایج به‌دست آمده از حجم سکته و سد خونی- مغزی با استفاده از تست یک طرفه ANOVA محاسبه گردید. نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده است. معیار معناداری برای هر گروه P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

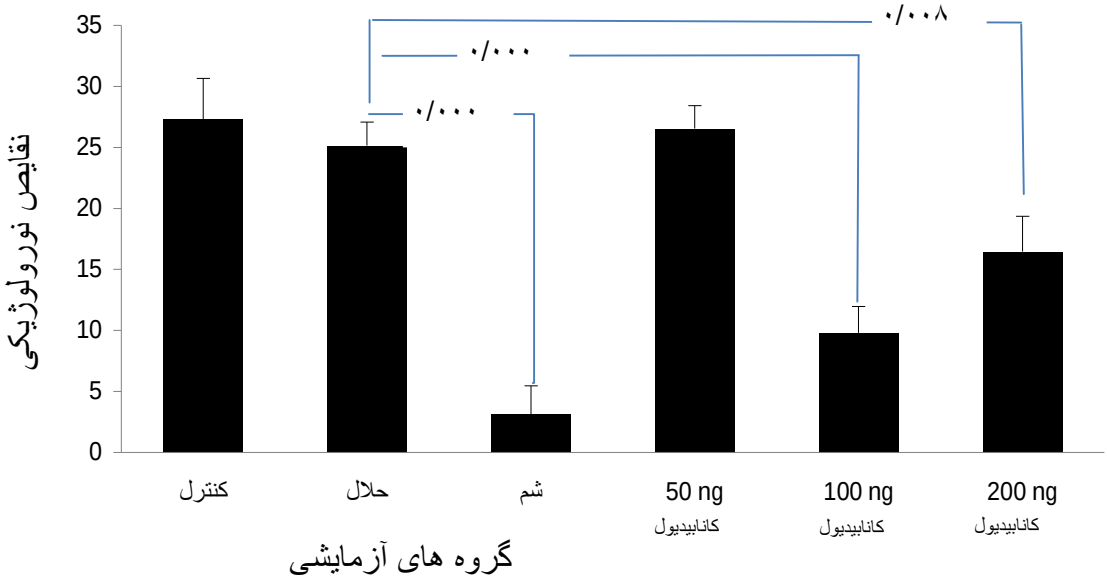
جدول ۱: جدول امتیازبندی ارزیابی تقایص نورولوژیکی برای موش‌های آزمایشگاهی ۲۴ ساعت بعد از جراحی ایسکمی (۱۹)

تست‌ها	توضیحات	امتیازبندی
(Postural signs) نشانه های وضعی	۱. درجه‌ای از خم شدن اندام در هنگام بلند کردن حیوان با دم	۲-۰
(Forelimb Flexion) ۱.خم شدن اندام جلویی	۲. درجه‌ای از چرخش بدن در هنگام بلند کردن حیوان با دم	۲-۰
(Thorax Rotation) ۲.چرخش قفسه سینه		
اختلال در راه رفتن (Gait Disturbance)	راه رفتن مستقیم	۰
	راه رفتن به سمت جهت مخالف	۱
	راه رفتن مستقیم و چرخش به صورت متناوب	۲
	راه رفتن به سمت جهت مخالف و چرخش به صورت متناوب	۳
	چرخش و یا سایر اختلالات مانند به پشت افتادن و خزیدن	۴
	چرخش مداوم به سمت جهت مخالف	۵
(Climbing) بالا رفتن	بالا رفتن از یه سطح شیب دار با زاویه ۴۵ درجه	۱-۰
(Biased movement) حرکات مغرضانه		
(Pull tail) ۱. کشیدن دم حیوان سه بار	صفر یا یک جابجایی به سمت جهت مخالف	۰
(Push back) ۲. هل دادن پشت حیوان سه بار	۳-۲ بار جابجایی به سمت جهت مخالف	۲-۱
	صفر یا یک جابجایی به سمت جهت مخالف	۰
	۲-۳ بار جابجایی به سمت جهت مخالف	۲-۱
(Limb placing) طرز قرار گرفتن اندام ها		
۱.اندام های جلویی	طبیعی، ضعیف، بدون حرکت	۲-۰
۲. اندام های عقبی	طبیعی، ضعیف، بدون حرکت	۲-۰
(Symmetry of muscle tone) تقارن تونوس عضلانی		
(lateral resistance) ۱. مقاومت جانبی	۱.درجه ای از مقاومت در هنگام فشار جانبی	۲-۰
(Grasping Strength) ۲. قدرت چنگ زدن	۲. تقارن قدرت چنگ زدن بر روی قفس سیمی	۱-۰
(Sensory function) عملکرد حسی		
(Grasping reflex) ۱.رفلکس چنگ زدن پنجه پای جلویی	چنگ زدن یک لوله زمانیکه به آرامی لمس می‌کند	۱-۰
(Touching reflex۲. رفلکس لمس کردن)	عقب کشیدن اندام جلویی در هنگام تماس با سوزن	۱-۰
(Motility) هوشیاری	طبیعی یا رفتار جستجوگرانه کاهش یافته به میزان خیلی کم	۱-۰
مشاهده حیوان برای یک دقیقه	جا به جا کردن اندام ها بدون اقدام خاصی	۲
	جا به جا شدن در پاسخ به محرک	۳
	عدم پاسخگویی به محرک، با تونوس عضلانی طبیعی	۴
	انقباض شدیدا کاهش یافته، نشانه های پیش از مرگ	۵

یافته ها

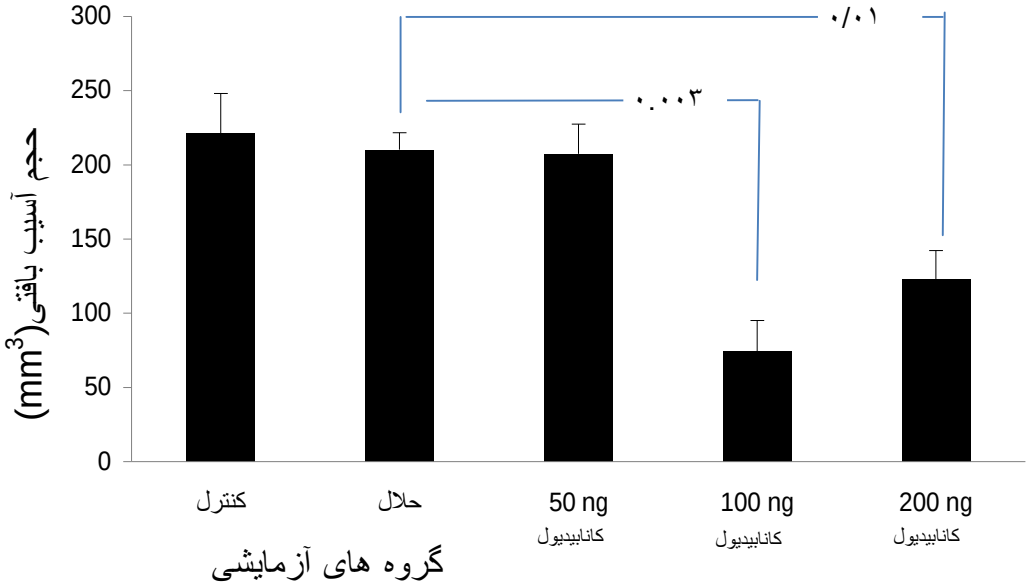
اثر نوروپروتکشن ایجاد شده توسط کانابیدیول بر نقایص نورولوژیکی: در تحقیقات مرتبط با تاثیر عوامل نوروپروتکتیو و داروها بر آسیب‌های ایسکمی، ارزیابی تست‌های رفتاری بسیار حایز اهمیت می‌باشد. پیش تیمار کانابیدیول با دوز ۱۰۰ نانوگرم به مدت پنج روز توانست نقایص نورولوژیکی ایجاد

شده را در مقایسه با گروه حلال کاهش دهد که این اختلاف کاهشی به صورت معنادار بوده است (P<۰/۰۰۱). در گروه دریافت کننده‌ی کانابیدیول با دوز ۲۰۰ نانوگرم نیز این کاهش به صورت معنادار بوده است (P=۰/۰۰۸). در حالی که دوز ۵۰ نانوگرم کانابیدیول تغییر قابل توجهی در نقایص نورولوژیکی ایجاد نکرد. امتیازهای حاصل از گروه شم در تمامی تست ها نسبت به گروه تحت جراحی MCAO کاهش قابل توجهی داشت که این نتیجه کاملا قابل انتظار بوده است. مقایسه‌ی گروه دریافت کننده‌ی حلال نیز نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان نداد (نمودار ۱).

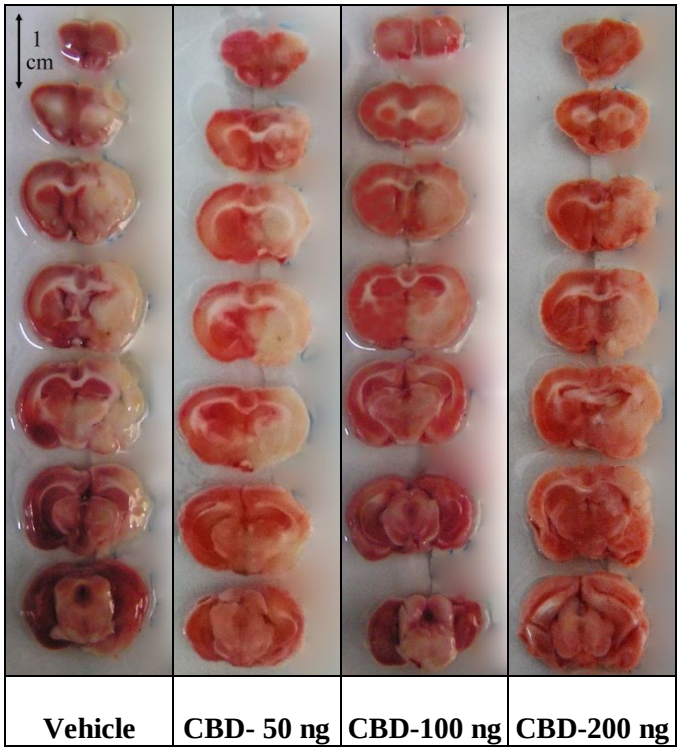


نمودار ۱: اثر استعمال کانابیدیول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر نقایص نورولوژیکی بیست و چهار ساعت بعد از خونرسانی مجدد در جراحی MCAO در موش صحرایی. نتایج نشان می دهد که کانابیدیول در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم موجب بهبود نقایص نورولوژیکی گردید. هر ستون نمایانگرمیانگین ±انحراف معیار می‌باشد (n=۱۵).

اثر نوروپروتکشن ایجاد شده توسط کانابیدیول بر حجم آسیب بافتی: تاثیر کانابیدیول بر آسیب بافتی، بیست و چهار ساعت پس از خونرسانی مجدد مورد سنجش قرار گرفت. در گروه حلال، میزان کل حجم آسیب بافتی ۱۱±۳۴/۲۱۰ میلی‌متر مکعب بود. نتایج نشان داد که استفاده از دوز ۱۰۰ نانوگرم کانابیدیول باعث کاهش در حجم کل آسیب مغزی (۲۰±۴۲/۷۴ میلی‌متر مکعب) به‌صورت معناداری شده است (P=۰/۰۰۳). همچنین در گروه دریافت کننده‌ی دوز ۲۰۰ نانوگرم کانابیدیول، حجم کل آسیب بافتی در این گروه نیز برابر با ۲۴±۱۸/۱۲۳ میلی‌متر مکعب بود که این کاهش از نظر آماری معنادار بوده است (P=۰/۰۱). در حالی که استفاده از دوز ۵۰ نانوگرم کانابیدیول اثر قابل توجهی در کاهش حجم آسیب بافتی در مقایسه با گروه حلال ایجاد نکرد. در ضمن، تغییری در گروه دریافت کننده‌ی حلال کانابیدیول در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نگردید (شکل ۱ و نمودار ۲).

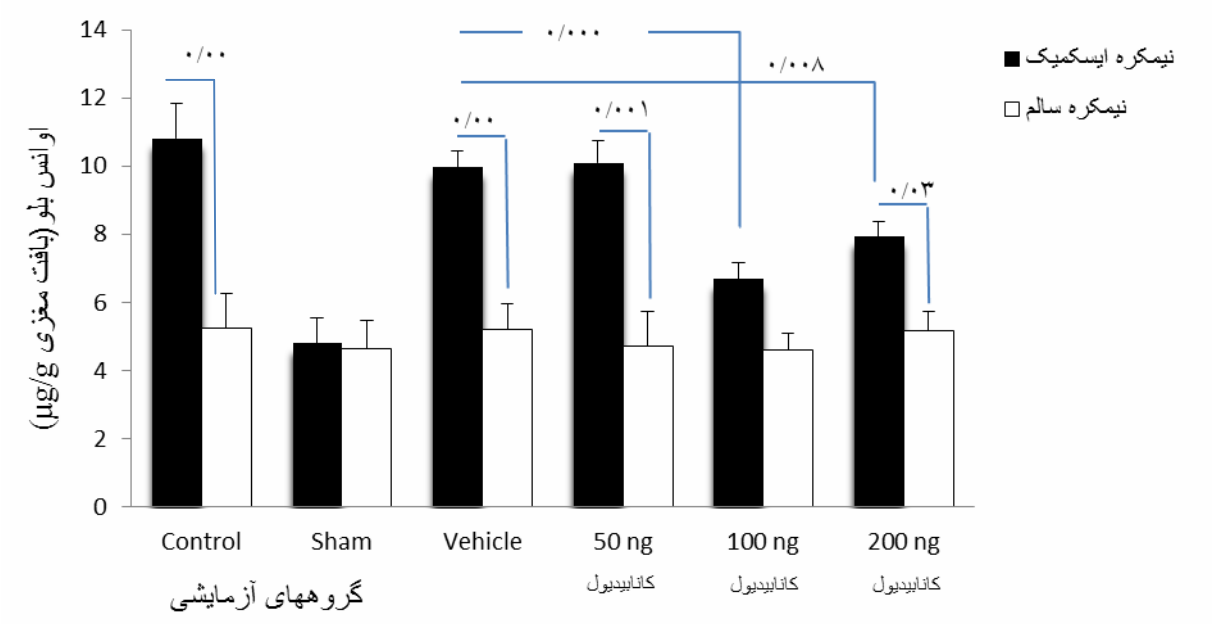


*نمودار ۲: این نمودار بیانگر اثر تزریق درون بطن مغزی کانابیدیول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر حجم آسیب بافتی بیست و چهار ساعت بعد از خونرسانی مجدد در جراحی **MCAO** در موش صحرایی. کانابیدیول در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم باعث کاهش معناداری در حجم انفارکتوس گردید. هر ستون نمایانگرمیانگین ± انحراف معیار می‌باشد (n=۶).*



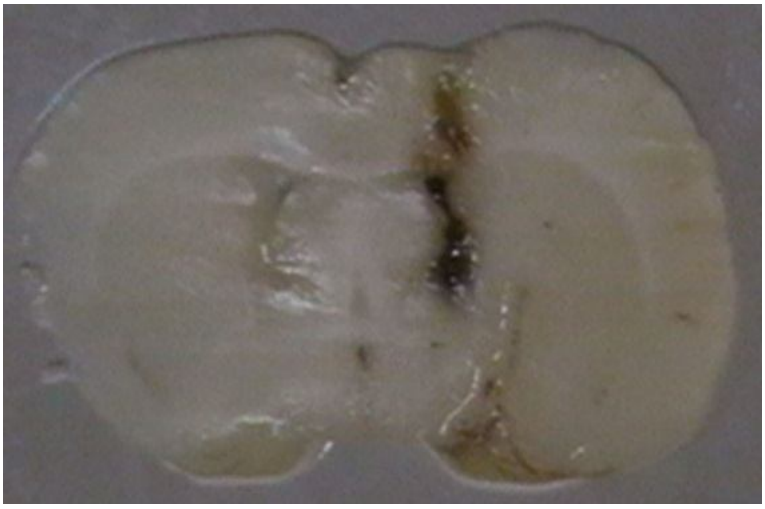
شکل ۱: رنگ آمیزی برش بافتی مغز در گروهای مختلف با مشخصه قرمزی در نواحی سالم و سفیدی در نواحی آسیب دیده.

اثر نوروپروتکشن ایجاد شده توسط کانابیدیول بر میزان نفوذپذیری سد خونی- مغزی: اثر کانابیدیول بر میزان نفوذپذیری سد خونی- مغزی در نمودار ۳ نشان داده شد. مدل ایسکمی مغزی ایجاد شده در موش‌ها، به طور قابل توجهی موجب افزایش خروج اوانس بلو از سد خونی- مغزی در نیمکره ایسکمی نسبت به نیمکره‌ی سالم شد. در حالی که اختلاف بین دو نیمکره‌ها در گروه‌های شم و دریافت کننده‌ی کانابیدیول ۱۰۰ نانوگرم معنادار نبود. غلظت اوانس بلو در بافت مغزی نیمکره‌ی ایسکمیک و نیمکره‌ی سالم گروه حلال به‌ترتیب ۰/۴۸ ±۹/۹۵ و ۰/۷۸ ±۵/۱۸ میکروگرم/گرم بافت مغزی بود. استفاده از کانابیدیول در دوز ۱۰۰ نانوگرم (۰/۴۵±۴/۶۱= نیمکره‌ی سالم و ۰/۴۹±۶/۶۷= نیمکره‌ی ایسکمیک) و ۲۰۰ نانوگرم (۰/۵۵±۵/۱۶= نیمکره‌ی سالم و ۰/۴۴±۷/۹۳ = نیمکره‌ی ایسکمیک) کاهش معناداری را در اختلال عملکرد سد خونی- مغزی نسبت به گروه حلال نشان داد (به‌ترتیب $P<0/001$ و $P=0/008$). در حالی که در دوز پایین‌تر ۵۰ نانوگرم تاثیر چندانی بر نفوذپذیری سد خونی– مغزی نداشت. مقایسه آماری بین گروه کنترل و حلال اختلاف معناداری را نشان نداد (نمودار ۳).



نمودار ۳: نفوذپذیری سد خونی- مغزی در گروه‌های مختلف شامل کنترل، شم، دریافت کننده حلال و دریافت کننده کانابیدیول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم. این ارزیابی در نیمکره‌های ایسکمیک و سالم انجام گرفت. نتایج بیانگر اثر کاهنده کانابیدیول بر گسستگی سد خونی- مغزی در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم می‌باشد. هر ستون نمایانگر میانگین± انحراف معیار می‌باشد (n=۶).

تایید جایگاه قرارگیری کانول: برای حصول اطمینان از این که کانابیدیول وارد بطن جانبی مغز شده است؛ تصاویر بطن جانبی مغز بعد از کانول گذاری و برش گیری با مختصات و تصویر بطن جانبی مغز از اطلس پاکسینوس انطباق داده شد (شکل ۲).



شکل ۲: محل قرارگیری کانول در بطن جانبی مغز

بحث

جراحی MCAO جزء متداول ترین مدل ایجاد سکته‌ی ایسکمیک مغزی در حیوانات است. علاوه بر سنجش میزان انفارکتوس، بررسی نقایص نورولوژیکی در گروه‌های آزمایشی اطلاعات مفیدی را در راستای میزان اثربخشی تیمار مورد نظر در اختیار محقق قرار می‌دهد. قطعا رفتارهای نورولوژیکی بازتابی از میزان انفارکتوس و آسیب در موش‌های ایسکمیک خواهد بود. در صورت مراقبت‌های ویژه و زنده ماندن حیوان، ۲۴ ساعت بعد از ایجاد مدل سکته‌ی مغزی بررسی نورولوژیکی در حیوان صورت گرفت. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داده است که کانابیدیول به‌طور قابل توجهی توانسته است در رفتاری وابسته به دوز (دوزهای ۱۰۰ و۲۰۰ نانوگرم) نقایص نورولوژیکی القا شده به وسیله‌ی جراحی ایسکمیک را بهبود بخشد. در سال‌های اخیر گزارشاتی مشابه ارایه شده است که نتایج مطالعه‌ی حاضر را تایید می‌کند (۲۲و ۲۱). البته روش‌های متفاوتی تاکنون برای ارزیابی رفتاری مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال، در این تحقیق سعی شده است که تست‌هایی جامعی به کار برده شود که بتواند رفتارهای حسی و حرکتی حیوان را تا حدود زیادی پوشش دهد. در ضمن، تحقیقاتی نیز اثر مثبت کانابیدیول را بر کاهش آسیب‌های شناختی مانند اختلالات حافظه و یادگیری نیز گزارش داده‌اند (۲۳و ۲۲). نکته‌ی قابل تامل این است که استعمال کانابیدیول بعد از ایجاد ایسکمی مغزی توانسته است نقایص نورولوژیکی را تا چهار هفته بعد از ایجاد ایسکمی بهبود بخشد (۲۲). از این رو تاکید می‌شود که اثرات کانابیدیول طولانی مدت و بادوام است. همچنین در این پژوهش، اثر نوروپروتکتیو کانابیدیول با ارزیابی حجم انفارکتوس تایید شد. یافته‌های حاصل از تحقیق حاضر نشان می‌دهد که کانابیدیول در یک رفتار وابسته به دوز توانست موجب کاهش حجم سکته شود. به‌طوری که در دوز پایین این اثرات مشاهده نگردید و با افزایش دوز، اثرات مثبت آن در کاهش انفارکتوس آشکار گردید. هم راستا با پژوهش حاضر، گزارشاتی از اثرات کاهنده‌ی کانابیدیول بر حجم انفارکتوس موجود می‌باشد (۲٤و ۲۱). مطالعات پیشین انجام گرفته در رابطه با اثر کانابیدیول بر ایسکمی مغزی به‌طور عمده در جهت درمان صورت گرفته است؛ درحالی که پیش درمان، ایجاد تحمل به ایسکمی و تزریق درون مغزی کانابیدیول جزء نوآوری این پژوهش می‌باشد. در واقع وجه

تمایز این تحقیق با مطالعات گذشته تفاوت در هدف مطالعه، روش استعمال کانابیدیول، مدل ایجاد ایسکمی مغزی، مدت زمان انسداد و روش‌های سنجش آسیب ایسکمی می‌باشد. انفارکتوس در واقع برآیندهای پاتوفیزیولوژی است که شاخص‌ترین آن‌ها تحریک پذیری بیش از حد نورون به دلیل افزایش بی‌رویه‌ی کلسیم درون سلولی است که سلول را به سمت مرگ پیش می‌برد. در مطالعه‌ای اعلام شده است که کانابیدیول در شرایطی با تحریک پذیری بالا از نوسانات کلسیم جلوگیری می‌کند و کلسیم درون سلولی را کاهش می‌دهد (۲۵). در نتیجه این احتمال وجود دارد که کانابیدیول با احیاء هوموستاز یونی به ویژه کلسیم در کاهش انفارکتوس نیز ایفای نقش کند. از سوی دیگر، گفته می شود که افزایش آدنوزین خارج سلولی در ایسکمی مغزی فرآیند نوروپروتکتیو را موجب می‌شود (۲٦). در راستای این یافته‌ها، توانایی کانابیدیول در مهار بازجذب آدنوزین و یا به عبارتی در تشدید سیگنالینگ آدنوزین این احتمال را شکل می‌دهد که کانابیدیول با به کارگیری مسیر آدنوزینی نقش نوروپروتکتیو خود را اعمال می‌کند (۲۷). همچنین، اثبات شده است که یکی از مسیرهای میانبر کانابیدیول برای کاهش کلسیم درون سلولی، مهار بازجذب اندوکانابینوئیدها و تشدید سیگنالینگ آن است (۲۸). در ضمن، یکی از علت‌های پایه‌ای آسیب ایسکمی، کاهش جریان خون مغزی است که بیان شده است این کاهش به واسطه‌ی نقص در گردش جریان خون مغزی ایجاد می‌شود (۲۹). در پژوهشی در سال ۲۰۰۵ اعلام شده است که کانابیدیول در مدل حیوانی ایسکمی مغزی، باعث افزایش جریان خون مغز به ویژه در کورتکس گردیده است. این اثر کانابیدیول را به توانایی آن در گشاد کردن شریان‌های مغزی نسبت داده‌اند (۲٤). همچنین شایان ذکر است که بی‌شک خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی کانابیدیول نیز در کاهش انفارکتوس و حجم سکته دخیل بوده است (۱۴و ۱۳). در ضمن نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که کانابیدیول در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم موجب کاهش معناداری در نفوذپذیری سد خونی- مغزی گردید. تحقیق حاضر برای اولین بار اثر کانابیدیول را بر انسجام سد خونی– مغزی در شرایط in vivo بررسی کرده است. تنها یک گزارش ارایه شده در کنگره موجود است که بیان می‌دارد؛ کانابیدیول در شرایط in vitro به واسطه اثر بر روی گیرنده فعال کننده تکثیر پراکسی زوم (PPAR γ) توانست در حفظ انسجام سد خونی– مغزی ایفای نقش کند (۳۰). سد خونی– مغزی با اتصالات محکم بین سلول‌های اندوتلیال شناخته می‌شود. همان طوری که اشاره شده است اختلال در یکپارچگی سد خونی- مغزی نتیجه آزادسازی بی‌رویه رادیکال‌های آزاد مانند ROS و واسطه گرهای التهابی (سایتوکاین و کموکاین‌ها) می‌باشد که ایجاد شکاف بین سلول‌های اندوتلیال رگ خونی مغز و نفوذ لوکوسیت‌ها به پارانشیم مغزی را به دنبال دارد (۱۲). بنابراین هر ترکیبی که بتواند آزادسازی بیش از حد واسطه گرهای التهابی و رادیکال‌های آزاد را مهار کند؛ احتمالا خواهد توانست که آسیب ایسکمیک را کاهش دهد. یکی از واسطه گرهای التهابی به نام فاکتور نکروز تومور (TNF-α) در آسیب به سلول‌های اندوتلیال مغزی و به دنبال آن افزایش نفوذ پذیری سد خونی- مغزی نقش برجسته‌ای دارد (۳۱). ما حدس می‌زنیم که کانابیدیول با کاهش واسطه گرهای التهابی مانند TNF-α می‌تواند اثرات حفاظتی خود را بر سد خونی- مغزی اعمال کند (۱۵). در ضمن، یافته‌های دیگر نقش سایر واسطه گرهای التهابی مانند اینترلوکین-۱، ۶ و نیتریک اکساید سنتتاز القایی را در پاتوژنز تخریب سد خونی- مغزی تایید می‌کند. ممکن است بخشی از اثر مثبت کانابیدیول نتیجه کاهش این واسطه گرها باشد (۱۵و ۱٤). از سوی دیگر، ثابت شده است که کانابیدیول در مدل حیوانی دیابت، بیان ICAM-1 را کاهش داده است که پیامد آن کاهش مهاجرت لوکوسیت‌ها به ویژه نوتروفیل‌ها خواهد بود (۳۲و ٤). در راستای نقش ضد

التهابی کانابیدیول، سومین احتمال این است که فعالیت میکروگلیا آسیب به سد خونی- مغزی را تشدید می‌کند؛ درحالی که مهار آن به واسطه اثر بخشی بر سد خونی- مغزی مانع بسیاری از آسیب‌های ایسکمیک گردیده است (۳۳). در عین حال، گزارشی اثر کاهنده‌ی کانابیدیول را بر فعالیت میکروگلیا اعلام کرده است (٤). این نکته قابل ذکر است که با استناد به گزارشات علمی، نقش رادیکال‌های آزاد در تخریب سد خونی– مغزی غیر قابل انکار است. بنابراین ترکیبی مانند کانابیدیول با خاصیت آنتی اکسیدانی قوی بدون شک خواهد توانست در سرکوب رادیکال‌های آزاد ایفای نقش کند (۱۳). در زمینه‌ی تخریب ماتریکس خارج سلولی در ایسکمی، آنزیم‌هایی فعال می‌شوند که با هضم غشای پایه سبب فروپاشی جامعیت سد خونی- مغزی می‌شوند که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به متالوپروتئیناز ماتریکس (MMP) اشاره کرد. متالوپروتئینازهای ماتریکس خانواده‌ای از اندوپپتیدازها هستند. سوبستراهای اختصاصی این آنزیم‌ها، پروتئین‌های موجود در ماتریکس خارج سلولی اندوتلیالی مثل فیبرونکتین، لامینین و کلاژن هستند (۱۰). گزارش شده است که کانابیدیول در مدل حیوانی دیابت میزان بیان متالوپروتئینازهای ماتریکس (به‌ویژه MMP-2 و MMP-9) را کاهش داده است (۳٤). ممکن است کانابیدیول از طریق مهار این ترکیبات در حفظ سد خونی– مغزی موثر باشد. درنهایت این فرضیه قوت پیدا می‌کند که کانابیدیول به طور عمده به واسطه‌ی مهار مسیرهای التهاب و استرس اکسیداتیو می‌تواند اختلال در انسجام سد خونی– مغزی را کاهش دهد. به‌طور کلی، توجه به نتایج پژوهش حاضر یک نکته‌ی قابل تاملی را برجسته می‌کند که کانابیدیول در دوز ۱۰۰ نانوگرم بهترین اثر حفاظتی را در برابر آسیب‌های ایسکمی نشان داده است؛ درحالی که دوز کمتر تاثیری نداشته و دوز بالاتر تاثیر کمتری داشته است. این یافته‌ها، رفتار وابسته به دوز کانابیدیول را در یک منحنی زنگوله ای شکل پاسخ- دوز تایید می‌کند. گزارشاتی نیز در راستای تصدیق این یافته موجود است که رفتار وابسته به دوز کانابیدیول را با یک اثر مطلوب (Optimal Effect) ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش کرده‌اند (۳۵و ۲٤).

نتیجه‌گیری

بنابراین با توجه به نتایج حاضر تا حدودی می‌توان بیان داشت که کانابیدیول در مدل ایسکمی مغزی موقتی نیز مانند سایر بیماری‌های نورودژنراتیو نقش نوروپروتکتیوی خود را به خوبی ایفا کرده است. به‌طوری که این ترکیب احتمالا با کاهش نفوذپذیری سد خونی- مغزی مانع از گسترش سایر آسیب‌های حاصله از ایسکمی مغزی گردیده است. اگرچه تحقیقات بیشتری برای شفاف سازی مکانیسم‌های درگیر لازم می‌باشد. امید است که یافته‌های حاضر بتواند درجهت جلوگیری از بروز ایسکمی مغزی در بیمارانی مستعد و با ریسک بالای آسیب مغزی گامی بر دارد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی ستاد توسعه علوم و فناوری‌های شناختی (طرح حمایت از پایان نامه‌ها به شماره ۱۸۴۳) انجام شد.

References

1-Clarke R, Watson DP. Cannabis and natural cannabis medicines. In: ElSohly MA, ed. Marijuana and the cannabinoids. New Jersey: Humana Press; 2007: 1-15.

2- ElSohly MA. The chemical constituents of cannabis and cannabinoids. In: Grotenhermen F, Russo E, eds. Cannabis and cannabinoids:

pharmacology, toxicology, and therapeutic potential. New York: Haworth Integrative Healing Press. 2002; 27-35.

3- Scuderi C, Filippis DD, Iuvone T, Blasio A, Steardo A, Esposito G. Cannabidiol in medicine: a review of its therapeutic potential in CNS disorders. *Phytother Res*. 2009; 23: 597-602.

4- McHugh D, Tanner C, Mechoulam R, Pertwee RG, Ross RA. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and phytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol*. 2008; 73: 441-50.

5- Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012; 125: e2-e220.

6- Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*. 2004; 19: 151-67.

7- Obrenovitch TP, Richards DA. Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1995; 7: 1-54.

8- Moro MA, Almeida A, Bolanos JP, Lizasoain I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Radic Biol Med*. 2005; 39: 1291-304.

9- Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol*. 2010; 87: 779-89.

10- Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res*. 1999; 842: 92-100.

11-Onteniente B, Rasika S, Benchoua A, Guegan C. Molecular pathways in cerebral ischemia: cues to novel therapeutic strategies. *Mol Neurobiol*. 2003; 27: 33-72.

12- Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J*. 2009; 276: 13-26.

13- Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95: 8268-73.

14- Esposito G, Scuderi C, Savani C, et al. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol*. 2007; 151: 1272-9.

15- Castillo A, Tolon MR, Fernandez-Ruiz J, Romero J, Martinez-Orgado J. The neuroprotective effect of cannabidiol in an in vitro model of newborn hypoxic-ischemic brain damage in mice is mediated by CB(2) and adenosine receptors. *Neurobiol Dis*. 2010; 37: 434-40.

16- Di Giorgio AM, Hou Y, Zhao X, Zhang B, Lyeth BG, Russell MJ. Dimethyl sulfoxide provides neuroprotection in a traumatic brain

injury model. *Restor Neurol Neurosci*. 2008; 26: 501-7.

17- Shirazi-zand Z, Ahmad-Molaei L, Motamedi F, Naderi N. The role of potassium BK channels in anticonvulsant effect of cannabidiol in pentylenetetrazole and maximal electroshock models of seizure in mice. *Epilepsy Behav*. 2013; 28: 1-7.

18- Paxinos G, Watson CR, Emson PC. AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods*. 1980; 3: 129-49.

19- Reglodi D, Tamas A, Lengvari I. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull*. 2003; 59: 459-66.

20- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR. A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990; 10: 290-3.

21- Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR, et al. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxia-ischemia in newborn pigs. *Pediatr Res*. 2011; 70: 272-7.

22- Pazos MR, Cinquina V, Gomez A, et al. Cannabidiol administration after hypoxia-ischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology*. 2012; 63: 776-83.

23- Schiavon AP, Soares LM, Bonato JM, Milani H, Guimaraes FS, Weffort de Oliveira RM. Protective effects of cannabidiol against hippocampal cell death and cognitive impairment induced by bilateral common carotid artery occlusion in mice. *Neurotox Res*. 2014; 26: 307-16.

24- Mishima K, Hayakawa K, Abe K, et al. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine1A receptor-dependent mechanism. *Stroke*. 2005; 36: 1077-82.

25- Ryan D, Drysdale AJ, Lafourcade C, Pertwee RG, Platt B. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca2+ levels. *J Neurosci*. 2009; 29: 2053-63.

26- Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, Fredholm BB. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci*. 1992; 13: 439-45.

27- Carrier EJ, Auchampach JA, Hillard CJ. Inhibition of an equilibrative nucleoside transporter by cannabidiol: a mechanism of cannabinoid immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 7895-900.

28- Ryan D, Drysdale AJ, Pertwee RG, Platt B. Interactions of cannabidiol with endocannabinoid signalling in hippocampal tissue. *Eur J Neurosci*. 2007; 25: 2093-102.

29- Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, et al. Delayed treatment with cannabidiol has a cerebroprotective action via a cannabinoid receptor-independent myeloperoxidase-inhibiting mechanism. *J Neurochem*. 2007; 102: 1488-96.

30- Hind W, England T, O'Sullivan S. cannabidiol protects an in vitro model of the blood-brain barrier against increased permeability following

oxygen-glucose deprivation. 6th european workshop on cannabinoid research trinity college dublin; 2013; Ireland.

31- Yang GY, Gong C, Qin Z, Liu XH, Lorris Betz A. Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999; 69: 135-43.

32- El-Remessy AB, Al-Shabrawey M, Khalifa Y, Tsai NT, Caldwell RB, Liou GI. Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *Am J Pathol*. 2006; 168: 235-44.

33- Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke*. 2006; 37: 1087-93.

34- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Batkai S, et al. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2010; 56: 2115-25.

35- Hayakawa K, Mishima K. Therapeutic potential of non-psychotropic cannabidiol in ischemic stroke. *Pharmaceuticals*. 2010; 3: 2197-212.

Protective Effect of Different Doses of Cannabidiol on Blood-Brain Barrier Permeability and Damages Resulting from Cerebral Ischemia Model in Rats

Khaksar S[1], Bigdeli MR[1]

[1]Dept. of Physiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University,Tehran,Iran

Corresponding Author: Bigdeli MR, Dept. of Physiology, Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Received: 18 Nov 2015 **Accepted:** 11 Jan 2016

Background and Objective: Stroke is a neurological disease with a rapid increase in incidence across developing world. Cannabidiol is a non- psychoactive constituent of *cannabis* which has attracted the attention of investigators in basic and therapeutic research. The most significant property of cannabidiol is its strong neuroprotective effect manifested in animal model of epilepsy, Alzheimer, and Parkinson. The present study was designed to examine the effect of cannabidiol on stroke damages in particular the blood-brain barrier integrity.

Materials and Methods: 66 rats were randomly divided into 6 main groups. Using stereotaxic surgery, guide cannula was implanted in the lateral ventricle. Cannabidiol (50, 100, and 200 ng) was administrated for 5 consequent days through Intracerebroventricular (i.c.v.) injection. After pretreatment, the rats were subjected to right middle cerebral artery occlusion (MCAO). After 24 hours, reperfusion neurological deficit scores (NDS), infarct volume (IV), and blood–brain barrier (BBB) permeability were assessed.

Results: The results indicate that administration of cannabidiol (100 and 200 ng) in the cerebral ischemia caused a remarkable reduction in NDS and IV, as well as BBB permeability in comparison with the vehicle group.

Conclusion: The obtained results indicate that cannabidiol possibly ameliorates ischemic injuries manifested as infarction through reduction of the blood-brain barrier permeability and neurological defects.

Keywords: Cannabidiol, Cerebral ischemia, Infarction, Blood-brain barrier