

اثر کانابیدیول در پیشگیری از ادم مغزی و آسیب‌های ناشی از مدل ایسکمی

مغزی موضعی - موقتی در موش صحرایی

سپیده خاکسار^۱، دکتر محمد رضا بیگدلی^{۲*}

۱. دانشجوی دکتری فیزیولوژی جانوری، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه فیزیولوژی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: طی ایسکمی مغزی، مجموع فرآیندهای پاتولوژی سلولی و ملکولی، آسیب مغزی را موجب می‌شود که شاخص‌ترین آنها التهاب و استرس اکسیداتیو است. کانابیدیول، کانابینوئید طبیعی غیر روان‌گردان، در مدل‌های مختلف بیماری‌های نورودژنراتیو، اثرات حفاظت عصبی را به واسطه‌ی خصوصیت ضدالتهابی و ضداکسیدانی اعمال می‌کند. بنابراین اثرات نوروپروتکتیو این ترکیب در مدل ایسکمی مغزی دور از انتظار نیست. در مطالعه‌ی حاضر، تلاش کرده‌ایم که اثر کانابیدیول را بر پیشرفت آسیب‌های سکتی مغزی به‌ویژه ادم مغزی بررسی کنیم.

مواد و روش‌ها: موش‌های صحرایی به شش گروه اصلی تقسیم شدند. با استفاده از جراحی استریوتکسی، کانول در بطن جانبی مغز تعبیه شد. کانابیدیول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم به مدت پنج روز به بطن جانبی تزریق گردید. بعد از تیمار، موش‌ها تحت عمل جراحی ایسکمی مغزی قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، نقص نورولوژیکی، حجم انفارکتوس و ادم مغزی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که کانابیدیول در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم، موجب کاهش قابل توجهی در نقص‌های نورولوژیکی، حجم انفارکتوس و ادم مغزی در مقایسه با گروه حلال گردیده است. این در حالی است که دوز ۵۰ نانوگرم کانابیدیول نتوانسته است موجب تغییرات خاصی در این پارامترها شود.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه بیان می‌دارد که کانابیدیول ممکن است با کاهش محتوای آب مغزی و نقایص نورولوژیکی، آسیب‌های حاصله از ایسکمی را که به صورت انفارکتوس بروز می‌کند، به طور قابل توجهی تخفیف دهد.

واژگان کلیدی: کانابیدیول، ایسکمی مغزی، انفارکتوس مغزی، ادم مغزی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Khaksar S, Bigdeli M. The effect of cannabidiol in prevention of brain edema and damages caused by transient model of focal cerebral ischemia in rats. *Pejouhandeh* 2015;20(4):181-191.

مقدمه

عوارضی مانند فلج ناحیه‌ای از بدن و مشکلاتی در حافظه، حرف زدن و حرکت کردن مواجه خواهد شد. مغز برای حفظ عملکرد و زنده ماندن نیاز به تأمین مستمر اکسیژن و گلوکز دارد. زمانی که تأمین این دو، به علت ایسکمی مغزی دچار اختلال شود، آبخاری از وقایع پاتوفیزیولوژی پشت سر هم اتفاق می‌افتد که همگی ناشی از فقدان یا کاهش انرژی به شکل ATP است (۲). از شاخص‌ترین پیامدهای پاتوفیزیولوژی ایسکمی مغزی می‌توان سمیت ناشی از تحریک‌پذیری سلول، التهاب، اختلال در عملکرد سد خونی-مغزی، ادم مغزی و تشکیل رادیکال‌های آزاد نام برد که در نهایت سلول را به سمت مرگ سلولی پیش می‌برد (۲، ۳، ۴). از میان فرآیندهای پاتوفیزیولوژی ناشی از ایسکمی، ادم مغزی جزو آسیب‌های جدی محسوب می‌شود. در فاز اولیه‌ی آسیب

در کشورهای در حال توسعه، شیوع سکتی مغزی رو به افزایش است. با توجه به پیشرفت جمعیت سالمند در این کشورها، این بیماری در آینده به طور ناگوارتری افزایش خواهد یافت. همین امر موجب می‌شود که سالانه هزینه‌های مالی و روانی بسیاری به خانواده‌های مبتلایان و جامعه تحمیل گردد، زیرا این بیماری، ناتوانی جسمی طولانی مدت را به دنبال دارد (۱). در این بیماری، شخص مبتلا در صورت زنده ماندن با

*نویسنده مسؤوّل مکاتبات: دکتر محمد رضا بیگدلی؛ تهران، اوین، بلوار دانشجو، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم زیستی، گروه فیزیولوژی جانوری؛ تلفن: ۰۲۷۲۱۰۲۹۹ (۰۲۱)؛ نمابر: ۰۲۷۲۱۰۲۲۴۳ (۰۲۱)؛ پست الکترونیک: bigdelimohammadreza@yahoo.com

کانابینوئیدی گیاه شاهدانه، خصوصیات بارزی از کانابیدیول وجود دارد که این ترکیب را به عنوان کاندید مناسبی برای پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها به ویژه سکتته مغزی معرفی می‌کند. از جمله مهمترین این خصوصیات، باید به اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی کانابیدیول اشاره کرد (۱۴، ۱۵). گزارش شده است که استرس اکسیداتیو (عدم توازن رادیکال‌های آزاد و آنتی‌اکسیدان‌ها) از آسیب‌های جدی ناشی از ایسکمی - هیپوکسی است که به مرگ نورونی می‌انجامد و کانابیدیول توانسته است با مهار استرس اکسیداتیو به عنوان یک نوروپروتکتیو قوی شناخته شود (۱۶). در ضمن، مطالعات آزمایشگاهی بیان داشته‌اند که کانابیدیول توانسته است با مهار اینترلوکین-۱ (IL-1) و نیتریک اکساید سننتاز القایی (iNOS) (۱۴) و مهاجرت نوتروفیل‌ها (۱۷)، نقش ضدالتهابی خود را به خوبی ایفا کند. مطالعات پیشین در راستای اثر کانابیدیول بر ایسکمی مغزی به طور عمده در جهت درمان صورت گرفته است، در حالی که هدف اصلی تحقیق حاضر برای به‌کارگیری پیش درمان کانابیدیول، یافتن استراتژی مناسب برای ایجاد تحمل به ایسکمی است. در واقع وجه تمایز این تحقیق با مطالعات گذشته تفاوت در هدف مطالعه، روش تجویز کانابیدیول، مدل ایجاد ایسکمی مغزی، مدت زمان انسداد و روش‌های سنجش آسیب ایسکمی می‌باشد.

در این تحقیق در نظر گرفتیم که اثرات کانابیدیول را در مدل حیوانی سکتته مغزی مورد بررسی قرار دهیم. بدین صورت که با تجویز مکرر کانابیدیول به مدت پنج روز در سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم، پارامترهای ارزیابی آسیب‌های ایسکمی را که شامل نقص‌های نورولوژیک، حجم سکتته و ادم مغزی می‌باشد، 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 ادم مغزی بررسی نشده است.

مواد و روش‌ها

گروه بندی حیوانات

موش‌های صحرایی بالغ نر از نژاد ویستار به تعداد $n=66$ به وزن ۲۵۰ تا ۳۵۰ گرم از مرکز تحقیقات علوم اعصاب دانشگاه شهید بهشتی خریداری و در شرایط استاندارد (دمای $22 \pm 2^{\circ}C$ 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 تعداد موش‌های

ایسکمی، کمبود اکسیژن و ATP اختلال در عملکرد پمپ‌های وابسته به ATP به ویژه پمپ سدیم-کلسیم را در غشای نورون موجب می‌شود که تعادل هوموستاز سلولی را دچار اختلال کرده و به‌دنبال آن آب فراوان در پارانشیم مغزی تجمع می‌یابد و ورم سلولی رخ می‌دهد که به عنوان ادم سیتوتوکسیک شناخته می‌شود (۵). ادم وازوژنیک نیز در فاز تأخیری ایسکمی قابل مشاهده است که به علت شکسته شدن سد خونی-مغزی اتفاق افتاده و آسیب مغزی را تشدید می‌کند (۶). ادم وازوژنیک در واقع نشت ملکول‌های بزرگ از رگ‌های خونی به واسطه‌ی اختلال در انسجام سد خونی-مغزی (BBB) است که این ملکول‌های بزرگ طی فرآیند اسموز آب را به بافت مغزی هدایت می‌کنند. در واقع ارتباط نزدیکی بین خروج پروتئین‌های پلاسمایی و میزان نفوذ آب در بافت مغزی وجود دارد (۷). بنابراین، هر عاملی که بتواند هوموستاز یونی و یکپارچگی سد خونی-مغزی را حفظ کند، نقش به‌سزایی در کاهش آسیب‌های حاصل از ایسکمی خواهد داشت. در بیست سال گذشته تلاش‌های اساسی به منظور درک مکانیسم‌های مولکولی و بیوشیمیایی دخیل در آسیب مغزی ناشی از ایسکمی به منظور توسعه‌ی داروها انجام گرفته است. تاکنون با مطالعات بالینی در انسان‌ها، بیش از ۵۰ عامل نوروپروتکتیو شناخته شده است که هیچ کدام از آنها به طور کامل، کارآمد نیستند (۸). شاهدانه (Cannabis) نوعی گیاه گلدار است که دارای برگ‌های انبوه دراز و کنگره‌دار بوده و بومی آسیای مرکزی و جنوبی است. گیاه شاهدانه حاوی ترکیبات کانابینوئیدی زیادی است که مجموع آنها توانسته است اثراتی را از این گیاه رقم بزند (۹). مهمترین ترکیبات کانابینوئیدی موجود در کانابیس، Δ^9 -تترا هیدروکانابینول (THC) و کانابیدیول (Cannabinoid یا CBD) است که بسیاری از اثرات مضر کانابیس به THC نسبت داده شده است (۱۰). از نگاهی دیگر، عدم وجود خصوصیات روان‌گردانی در کانابیدیول بر خلاف THC (ترکیب اصلی روان‌گردان کانابیس)، جنبه‌ی مثبت گیاه شاهدانه را آشکار می‌کند (۱۱). در سال‌های اخیر، خواص درمانی کانابیدیول توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌ی آزمایشگاهی و بالینی انجام گرفته است (۱۲). به‌طوری‌که این ترکیب در کشورهای آمریکا و کانادا به صورت دارو به مرحله‌ی تجاری‌سازی رسیده است. به عنوان مثال، داروی Sativex که ترکیبی از CBD و THC با نسبت ۱:۱ می‌باشد، در کانادا برای کاهش درد در بیماران MS مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳). بنابراین از میان ترکیبات

طولی روی پوست سر ایجاد شد. به دنبال آن، بافت‌های زیر جلدی کنار زده شده تا استخوان جمجمه در معرض دید قرار گیرد. سپس مختصات بطن جانبی مغز با استفاده از اطلس پاکسینوس (۱۹) مشخص گردید و مکان مورد نظر علامت‌گذاری شد (AP: -0.58 mm; ML: ±1.4 mm; DV: -1.6 mm). پس از آن و با استفاده از مته، محل مورد نظر روی استخوان جمجمه سوراخ گردید و کانولی از جنس فولاد ضد زنگ که از سر سوزن شماره‌ی ۲۳ تهیه شده بود، در جمجمه و 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 گشت. پس از اتمام جراحی، همه‌ی حیوانات یک هفته دوره‌ی 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.

تأیید محل قرارگیری کانول در بطن جانبی مغز

کانول بر طبق اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۹) تعبیه گردید. بعد از انجام تست رفتاری، موش‌های صحرائی با دوز بالای کلروفورم کشته شدند. مغزهای جدا شده در فرمالین ۱۰٪ برای ۴۸ ساعت تثبیت شدند و برش‌گیری از مناطق مغزی ورود کانول انجام گرفت.

ایجاد مدل سکته‌ی مغزی (انسداد شریان میانی مغزی)

موش‌های صحرائی پس از بیهوشی با کلرال هیدرات با دوز ۴۰۰ mg/kg (۲۰)، تحت عمل جراحی انسداد شریان میانی مغزی (Middle cerebral artery occlusion) قرار گرفتند. بدین صورت که یک نخ بخیه نایلون ۳-۰ از طریق تنه‌ی شریان کاروتید مشترک (Commen carotid artery) وارد شریان کاروتید داخلی (Internal carotid artery) گردید و تا رسیدن به شریان کاروتید قدامی (Anterior carotid artery) از میان شریان کاروتید داخلی ادامه داده شد. در اثر ورود نخ بخیه و مسدود کردن مسیرهای شریان‌های خون رسان، جریان خون از هر طرف به شریان میانی مغز (MCA) بسته شد. این بسته شدن از طریق احساس مقاومت در پیشروی نخ و ورود حدود ۲۰ میلی‌متر طول نخ از تنه CCA مشخص می‌گردد (۲۱).

بعد از ۶۰ دقیقه ایسکمی، برقراری مجدد جریان خون صورت گرفت. دمای بدن از طریق رکتوم با کمک دماسنج دیجیتالی اندازه‌گیری شد و با استفاده از پد حرارتی در حدود ۳۷ درجه سانتی‌گراد حفظ گردید.

صحرائی استفاده گردد. تمامی مراحل آزمایش نیز بر اساس پروتکل تأیید شده کمیته اخلاق دانشگاه شهید بهشتی اجرا شد. این تحقیق به روش تجربی انجام شد. موش‌های صحرائی به صورت 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 ایسکمی قرار گرفتند. موش‌های گروه دوم یا شم، بدون دریافت تیماری، استرس جراحی روی آنها اعمال شد. بدین صورت که مراحل مشابه جراحی استریوتکسی و ایسکمی را متحمل شدند بدون اینکه کانولی در سر آنها تعبیه شود و یا 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 می‌باشد که به سه زیرگروه ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم تقسیم بندی شده است. در این زیرگروه‌ها، موش‌های صحرائی 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 ساعته شریان میانی مغزی، خون‌رسانی مجدد برقرار گردید. بیست و چهار ساعت بعد برای سنجش نقایص نورولوژیکی، حجم سکته و ادم مغزی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در گروه‌هایی که تحت عمل جراحی ایسکمی قرار گرفتند، زیرگروه‌های مجزا برای تعیین حجم سکته و ادم مغزی در نظر گرفته شد.

ترکیبات دارویی

کانابیدیول (Tocris, UK) در محلولی از ۱۰٪ DMSO و ۹۰٪ PBS حل گردید (۱۸). تزریق کانابیدیول پیش از انجام جراحی ایسکمی مغزی در سه دوز ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم صورت گرفت (۱۸). تزریق به صورت یک طرفه به بطن جانبی راست مغز در حجم دو مایکرولیتر انجام گرفت (۱۸). به ازای تزریق هر مایکرولیتر، 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 گرفت و موی سر آنها تراشیده شد. سپس سر آنها به وسیله‌ی دستگاه استریوتاکس ثابت گردید تا امکان اعمال جراحی روی آن وجود داشته باشد. پس از ضدعفونی کردن ناحیه‌ی سر، به کمک تیغ بیستوری یک برش

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 روی سطح صاف به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت که در جدولی به صورت اختصار توضیح داده شده است (جدول ۱). مجموعه امتیازهای به‌دست آمده از هر تست به عنوان امتیاز کل نورولوژیکی محاسبه گردید که با حداکثر امتیاز ۲۸ و با حداقل امتیاز صفر در موش‌های نرمال اعلام گردید (۲۲).

جدول ۱. امتیازبندی ارزیابی نقایص نورولوژیکی برای موش‌های آزمایشگاهی، ۲۴ ساعت بعد از جراحی ایسکمی (۲۲).

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

ارزیابی حجم سگته‌ی مغزی

بیست و چهار ساعت بعد از خون‌رسانی مجدد، موش‌های صحرایی با دوز بالای داروی بیهوشی کلرال هیدرات کشته شدند و مغزشان خارج گردید و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه در سالیین سرد استراحت داده شد. 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 درجه (بن ماری) در محلول دو درصد ۵،۳،۲- تری فیل تترازولین کلراید (TTC) (مرک، آلمان) برای رنگ‌آمیزی انکوبه شدند. رنگ سفید نشانگر نواحی ایسکمیک و رنگ قرمز یا صورتی، همان نواحی سالم هستند (۲۳). سپس این برش‌ها به ترتیب در کنار کاغذ

نسبت به گروه تحت جراحی MCAO ظاهر شده است که این نتیجه، کاملاً قابل انتظار بوده است ($P=0/000$). مقایسه‌ی گروه دریافت‌کننده‌ی حلال نیز نسبت به گروه کنترل، اختلاف معناداری را نشان نداد (نمودار ۱).

اثر نوروپروتکشن ایجاد شده توسط کانابیدیول بر حجم آسیب بافتی

تأثیر کانابیدیول بر آسیب بافتی (Infarction volume)، بیست و چهار ساعت پس از خون‌سانی مجدد مورد سنجش قرار گرفت. در گروه حلال، کل حجم آسیب بافتی $230/04 \pm 16 \text{ mm}^3$ بود. نتایج نشان داد که استفاده از دوز ۱۰۰ نانوگرم کانابیدیول باعث کاهش در حجم کل آسیب مغزی ($81/61 \pm 18 \text{ mm}^3$) به صورت معناداری شده است ($P=0/000$). همچنین، در گروه دریافت‌کننده‌ی دوز ۲۰۰ نانوگرم کانابیدیول، حجم کل آسیب بافتی در این گروه برابر با $51/110 \pm 24 \text{ mm}^3$ بوده است که این کاهش از نظر آماری معنادار بوده است ($P=0/03$). این در حالی است که دوز ۵۰ نانوگرم کانابیدیول نتوانسته است اثر قابل توجهی در کاهش حجم آسیب بافتی در مقایسه با گروه حلال ایجاد کند. در ضمن، تغییری در گروه دریافت‌کننده‌ی حلال کانابیدیول در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نگردید (نمودار ۲). نکته‌ی قابل توجه این است که اثر کانابیدیول بر حجم انفارکتوس به صورت پاسخی وابسته به دوز بوده است.

اثر نوروپروتکشن ایجاد شده توسط کانابیدیول بر ادم مغزی

محتوای آب مغزی (ادم مغزی) ارتباط تنگاتنگی با از بین رفتن یکپارچگی سد خونی-مغزی دارد. مدل ایسکمی مغزی ایجاد شده در موش‌ها، به طور قابل توجهی موجب افزایش محتوای آب مغزی در نیمکره ایسکمی نسبت به نیمکره‌ی سالم شده است، در حالی که اختلاف محتوای آب مغزی بین دو نیمکره‌ها در گروه‌های شام و دریافت‌کننده‌ی کانابیدیول ۱۰۰ نانوگرم، معنادار نبوده است. کانابیدیول با دوز ۱۰۰ نانوگرم ($78/96 \pm 2/66$ درصد) کاهش معناداری در محتوای آب مغزی نسبت به گروه حلال ($83/92 \pm 3/9$ درصد) نشان داد ($P=0/000$). اثر محافظتی کانابیدیول بر ادم مغزی در دوز ۲۰۰ نانوگرم نیز معنادار بوده است ($79/08 \pm 4/68$ درصد، $P=0/01$). این در حالی است که در دوز پایین‌تر ۵۰ نانوگرم ($81/88 \pm 2/7$ درصد) تأثیر چندانی بر محتوای آب مغزی نداشته است (نمودار ۳). نکته‌ی قابل ذکر این است که تأثیر مثبت کانابیدیول بر ادم مغزی در دوزهای پایین دیده نشده است، به طوری که با

شظرنجی دارای مقیاس، چیده شدند و عکس برداری با یک دوربین دیجیتال انجام گرفت. در نهایت، مساحت ناحیه‌ی ایسکمی هر برش توسط برنامه‌ی Image j (version 1/46r) مورد سنجش قرار گرفت. مساحت حاصل، در ضخامت دو میلی‌متر ضرب و اعداد همه‌ی برش‌ها جمع شده و با روش Swanson طبق فرمول زیر محاسبه گردید (۲۴): حجم تصحیح شده ناحیه آسیب دیده (CIV) = حجم نیمکره چپ - (حجم نیمکره راست - حجم ناحیه آسیب دیده). در واقع با محاسبه‌ی حجم تصحیح شده‌ی ناحیه‌ی آسیب دیده (Corrected Infarct Volum: CIV)، دخالت ادم مغزی در اندازه‌گیری حجم سکنه تصحیح گردید.

سنجش ادم مغزی. بعد از کشتن حیوان، مغز حیوان خارج گردید. جداسازی مخچه، پل مغزی و پیازهای بویایی انجام گرفت. وزن خیس (WW) دو نیمکره به طور جداگانه اندازه‌گیری شد. سپس وزن خشک نیمکره‌ها (DW) بعد از قرار گرفتن ۲۴ ساعت در آون با دمای ۱۲۰ درجه، اندازه‌گیری گردید. در نهایت، محتوی آب مغز بر اساس فرمول $100 \times [(WW-DW)/WW]$ محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

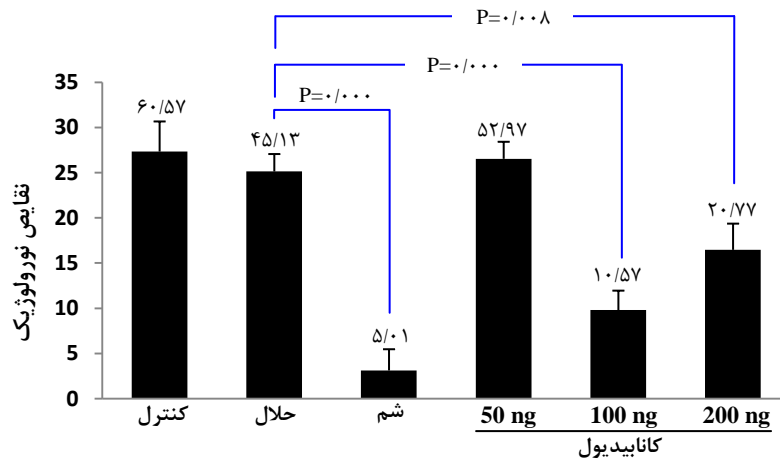
تمام آنالیزها با کمک نرم افزار SPSS (version ۲۲) انجام شد. داده‌های حاصل از امتیازهای نقص رفتاری نورولوژیک با استفاده از آنالیز غیر پارامتریک Kruskal-Wallis و آزمون تعقیبی Dunn و نتایج به دست آمده از حجم سکنه و ادم مغزی با استفاده از تست یک طرفه ANOVA محاسبه گردید. نتایج به صورت $\text{mean} \pm \text{SEM}$ گزارش شده است. معیار معناداری برای هر گروه، $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

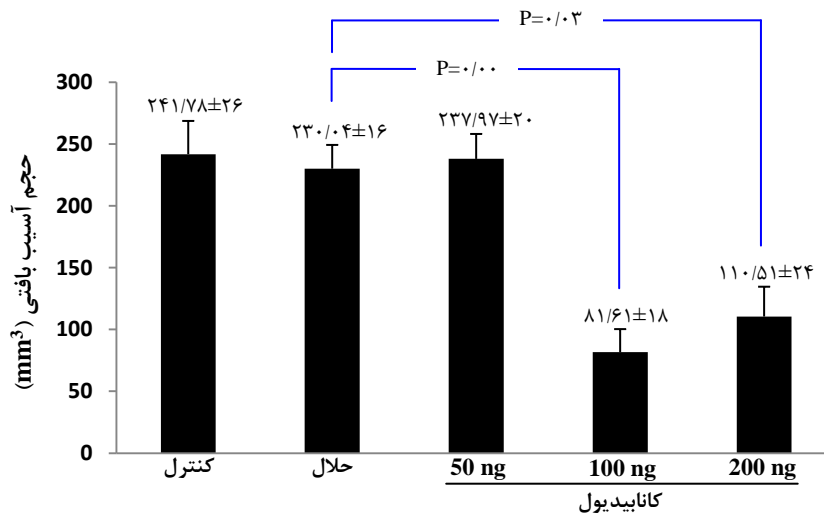
اثر نوروپروتکشن ایجاد شده توسط کانابیدیول بر

نقایص نورولوژیکی

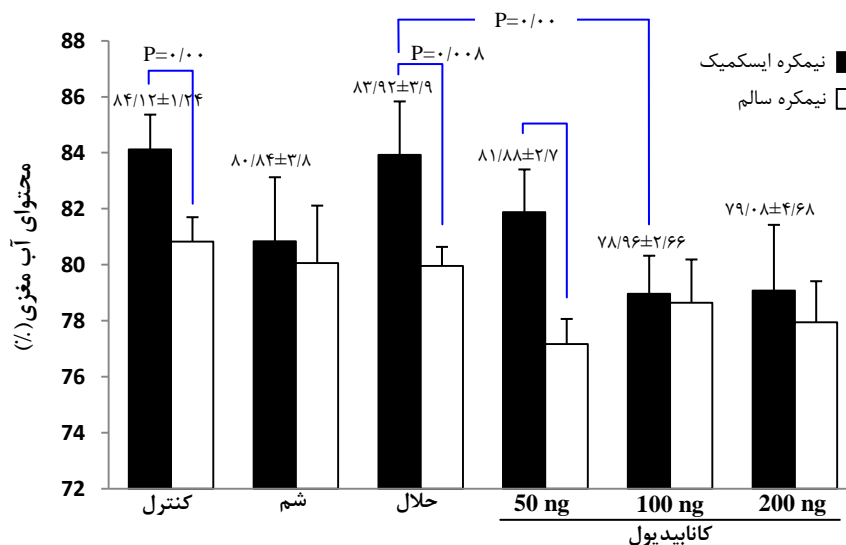
در تحقیقات مرتبط با تأثیر عوامل نوروپروتکتیو و داروها بر آسیب‌های ایسکمی، ارزیابی تست‌های رفتاری بسیار حایز اهمیت می‌باشد. پیش‌تیمار کانابیدیول با دوز ۱۰۰ نانوگرم به مدت پنج روز توانست نقایص نورولوژیکی ایجاد شده را در مقایسه با گروه حلال ایسکمیک به طور معناداری کاهش دهد ($P=0/000$). در گروه دریافت‌کننده‌ی کانابیدیول با دوز ۲۰۰ نانوگرم نیز این کاهش به صورت معنادار بوده است ($P=0/008$). در حالی که دوز ۵۰ نانوگرم کانابیدیول نتوانست تغییر قابل توجهی در نقایص نورولوژیکی ایجاد کند. امتیازهای حاصل از گروه شام در تمامی تست‌ها، با کاهش قابل توجهی



نمودار ۱. اثر تزریق کانابیدیول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر نقایص نورولوژیکی، ۲۴ ساعت بعد از خونرسانی مجدد در جراحی MCAO در موش صحرایی. نتایج نشان می‌دهد که کانابیدیول در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم موجب بهبود نقایص نورولوژیکی شده است. هر ستون نمایانگر $\text{mean} \pm \text{SEM}$ می‌باشد (n=۱۵).



نمودار ۲. تزریق درون بطن مغزی کانابیدیول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم بر حجم آسیب بافتی، ۲۴ ساعت بعد از خونرسانی مجدد در جراحی MCAO در موش صحرایی. کانابیدیول در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم باعث کاهش معناداری در حجم انفارکتوس شده است. هر ستون نمایانگر $\text{mean} \pm \text{SEM}$ می‌باشد (n=۶).



نمودار ۳. محتوای آب مغزی در گروه‌های مختلف شامل کنترل، شم، دریافت‌کننده حلال و دریافت‌کننده کانابیدیول در دوزهای ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم. این ارزیابی در نیمکره‌های ایسکمیک و سالم انجام گرفته است. نتایج، بیانگر اثر کاهنده‌ی کانابیدیول بر ادم مغزی در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم می‌باشد. هر ستون نمایانگر $\text{mean} \pm \text{SEM}$ می‌باشد (n=۶).

حاضر نشان داده است که کانابیدیول در یک رفتار وابسته به دوز توانسته است باعث کاهش حجم سگته شود، به طوری که در دوز پایین، این اثرات مشاهده نگردید ولی با افزایش دوز، اثرات مفید و مثبت آن در کاهش انفارکتوس آشکار گردید. تورم بافت ایسکمیک ناشی از ادم مغزی ممکن است موجب نمایش اغراق‌آمیز حجم انفارکتوس شود که در نهایت، موجب بزرگنمایی بیش از واقعیت حجم سگته تا میزان ۲۲٪ می‌گردد (۲۷). برای کم کردن خطای موجود، از فرمول Swanson استفاده شده است.

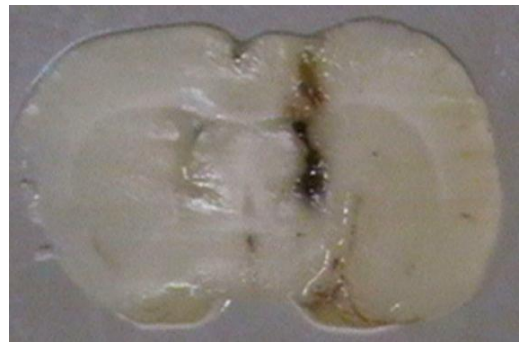
هم‌راستا با پژوهش حاضر، گزارش‌هایی از اثرات کاهنده‌ی کانابیدیول بر حجم انفارکتوس موجود می‌باشد (۳۱، ۲۹، ۲۸) ولی نکته‌ی قابل توجه این است که تحقیقات پیشین بر درمان ایسکمی مغزی تمرکز داشته‌اند، در حالی که هدف ایجاد تحمل به ایسکمی به صورت پیش‌درمان و تزریق درون مغزی کانابیدیول، جزو نوآوری‌های این پژوهش می‌باشد.

انفارکتوس در واقع برآیندی از فرآیندهای پاتوفیزیولوژی است که به صورت مرگ نورونی خود را نشان می‌دهد. این فرآیندها شامل افزایش تحریک‌پذیری سلول به واسطه‌ی عدم توازن یونی، التهاب، استرس اکسیداتیو و کاهش جریان خون مغزی می‌باشد (۲). بنابراین هر عاملی که بتواند باعث کاهش اثرات این فرآیندها شود، به نوعی خواهد توانست باعث کاهش انفارکتوس، حجم سگته و آسیب‌های حاصله از آن شود. Pazos و همکاران در سال ۲۰۱۳ اعلام کردند که ایسکمی مغزی باعث افزایش چهار برابری نورون‌های نکروتیک در کورتکس گردیده است. این در حالی است که کانابیدیول، حجم این نورون‌های نکروتیک را به میزان گروه شم کاهش داده است (۱۶). همچنین در تحقیقی دیگر، ارزیابی هیستولوژی، افزایش حیات نورونی منطقه CA1 هیپوکمپ را بواسطه کانابیدیول تأیید کرده است (۲۸). بنابراین کانابیدیول احتمالاً از طریق کمک به حفظ حیات نورونی و کاهش مرگ نورونی توانسته است در کاهش حجم انفارکتوس ایفای نقش کند. در ضمن، یکی از علت‌های پایه‌ای آسیب ایسکمی، کاهش جریان خون مغزی است که بیان شده است که این کاهش به واسطه‌ی نقص در گردش جریان خون مغزی ایجاد می‌شود (۳۰). در پژوهشی در سال ۲۰۰۵ اعلام گردید که کانابیدیول در مدل حیوانی ایسکمی مغزی باعث افزایش جریان خون در مغز، به ویژه در کورتکس شده است (۳۱). این اثر کانابیدیول را به توانایی آن در گشاد کردن شریان‌های مغزی نسبت داده‌اند که با دخالت گیرنده‌های سروتونینی و وانیلوئیدی صورت گرفته است (۳۲، ۱۳). از سوی دیگر،

افزایش دوز، این اثر بروز کرده است که نشان از رفتار وابسته به دوز کانابیدیول دارد.

تأیید جایگاه قرارگیری کانول

برای حصول اطمینان از اینکه کانابیدیول وارد بدن جانبی مغز شده است، تصاویر بدن جانبی مغز بعد از کانول‌گذاری و برش‌گیری، با مختصات و تصویر بدن جانبی مغز از اطلس پاكسينوس انطباق داده شد (شکل ۱).



شکل ۱. محل قرارگیری کانول در بدن جانبی مغز.

بحث

نتایج مطالعه‌ی حاضر، تأثیر مثبت کانابیدیول را در کاهش آسیب‌های حاصل از ایسکمی مغزی در موش صحرایی بیان می‌دارد. بررسی نورولوژیکی در صورت زنده ماندن حیوان و مراقبت‌های ویژه، ۲۴ ساعت بعد از ایجاد مدل سگته‌ی مغزی در حیوان صورت گرفت. نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داد که کانابیدیول به طور قابل توجهی توانسته است در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم، باعث بهبود در نقایص نورولوژیکی شود. امتیازبندی نقایص نورولوژیکی بر اساس تست‌های ارزیابی رفتارهای حسی - حرکتی انجام گرفته است. بنابراین، کانابیدیول به خوبی قابلیت ایجاد تحمل به ایسکمی را نشان داده است. همان‌طور که اشاره شد، در تحقیقات برای مطالعه‌ی عوامل نوروپروتکتیو و داروها، سنجش رفتارهای حسی و حرکتی بسیار حایز اهمیت می‌باشد. نتایج مطالعات حاضر با پژوهش لافونته و همکاران در سال ۲۰۱۱ همخوانی دارد. در این مطالعه گزارش شده است که کانابیدیول به خوبی توانسته است نقص نورولوژیکی ایجاد شده توسط ایسکمی را بهبود بخشد (۲۵). همچنین در گزارشی دیگر اعلام گشته است که کانابیدیول توانسته است نقایص نورولوژیکی القا شده توسط ایسکمی را تا چهار هفته بعد از ایجاد ایسکمی بهبود بخشد (۲۶).

همچنین اثر نوروپروتکتیو کانابیدیول با ارزیابی حجم سگته در این پژوهش بار دیگر تأیید شد. یافته‌های حاصل از تحقیق

آزادسازی سریع رادیکال آزاد و واسطه‌گرهای التهابی (سیتوکین و کموکین) از بافت آسیب دیده همراه است. این واسطه‌گرها، بیان ملکول‌های چسبنده مانند ملکول چسبنده‌ی درون سلولی-۱ (ICAM-1) و چسبندگی لوکوسیت به سلول‌های اندوتلیال و مهاجرت آنها را به خارج از رگ‌ها تشدید کرده و در نهایت موجب شکسته شدن سد خونی-مغزی می‌شوند. یکی از واسطه‌گرهای التهابی به نام فاکتور نکروز تومور (TNF- α) در آسیب به سلول‌های اندوتلیال مغزی و بدنال آن افزایش نفوذ پذیری سد خونی-مغزی نقش برجسته‌ای دارد (۳۹، ۴۰)، بنابراین در ایجاد ادم مغزی نیز شرکت می‌کند. ما حدس می‌زنیم که کانابیدیول با کاهش TNF- α می‌تواند اثرات حفاظتی سد خونی-مغزی و کاهنده‌ی ادم مغزی را به خوبی ایفا کند (۴۱). در ضمن، گزارش‌هایی موجود است که IL-1 و NF- κ B نیز در پاتوژنز ادم مغزی نقش دارند (۴۲، ۴۳). ممکن است نقش مفید کانابیدیول، بخشی، نتیجه‌ی اثرات کاهشی بر این واسطه‌گرها و مسیر سیگنالی مرتبط با آنها باشد (۱۴، ۳۵). با استناد به گزارش‌های علمی، نقش رادیکال‌های آزاد در تخریب سد خونی-مغزی و به‌دنبال آن ادم مغزی، غیر قابل انکار است (۴۴). بنابراین ترکیبی مانند کانابیدیول با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی، بدون شک خواهد توانست در سرکوب رادیکال‌های آزاد و ادم مغزی ایفای نقش کند. در همین ارتباط نشان داده شده است که CBD از آسیب‌های اکسیداتیو القا شده توسط پراکسید هیدروژن (H₂O₂) بهتر از آسکوربات (ویتامین C) و توکوفرول (ویتامین E) جلوگیری کرده است (۱۵). گزارش شده است که در بیماری دیابت، نیتریک اکساید سنتتاز منبع اصلی افزایش رادیکال آزاد ROS می‌باشد که مانند ایسکمی مغزی آسیب‌های نورونی و از بین رفتن یکپارچگی سد خونی-مغزی را به‌دنبال دارد، به‌طوری‌که ثابت شده است مهارکننده‌های NOS، آسیب‌های حاصله از ایسکمی مغزی را بلوکه می‌کنند (۴۵). CBD به‌طور مستقیم، با به دام انداختن رادیکال‌های آزاد و یا مهار NOS می‌تواند نقش آنتی‌اکسیدانی خود را نشان دهد و در حفظ سد خونی-مغزی و کاهش ادم مغزی مؤثر باشد (۱۴، ۱۵).

به‌طور کلی، توجه به نتایج پژوهش حاضر یک نکته قابل تأمل را برجسته می‌کند که کانابیدیول در دوز ۱۰۰ نانوگرم بهترین اثر حفاظتی را در برابر آسیب‌های ایسکمی نشان داده است، درحالی‌که دوز کمتر تأثیری نداشته و دوز بالاتر تأثیر کمتری داشته است. این یافته‌ها رفتار وابسته به دوز کانابیدیول را در یک منحنی زنگوله‌ای شکل پاسخ-دوز تأیید

بیان شده است که التهاب و آپوپتوز نورونی حاصل از ایسکمی مغزی، تا حدودی با فعال شدن پروتئین‌کیناز فعال‌کننده‌ی میتوزن p38 (MAPK p38) راه‌اندازی می‌گردد. این کیناز در انتقال سیگنال از سطح سلول به هسته نقش داشته و مرگ و حیات نورونی را تنظیم می‌کند (۳۳). فاکتور هسته‌ای کاپا (NF- κ B)، به وسیله‌ی MAPK p38 فعال می‌شود و مسیرهای راه‌اندازی التهاب و مرگ نورونی را پیش می‌برد (۳۴). گزارش شده است که کانابیدیول در مدل تجربی آلزایمر توانسته است با مهار MAPK p38 مسیرهای التهابی و استرس اکسیداتیو را بلوکه کند (۳۵). بنابراین، این فرضیه قوت پیدا می‌کند که کانابیدیول به‌واسطه‌ی مهار MAPK p38 می‌تواند مرگ نورونی و بدنال آن، حجم انفارکتوس را کاهش دهد.

در ضمن، نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان داده است که کانابیدیول در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم، موجب کاهش معناداری در ادم مغزی گردیده است. اگرچه تاکنون مطالعه‌ی مشابه‌ای در این زمینه انجام نشده است ولی برخی شواهد نشان داده‌اند که کانابیدیول بعد از اعمال هیپوکسی-ایسکمی به خوک‌های تازه به دنیا آمده، ادم مغزی را کاهش داده است. در این پژوهش، معیار ارزیابی استفاده از مطالعات EEG و مقاومت به عنوان شاخص ادم مغزی بوده است که کانابیدیول احتمالاً با کاهش مقاومت ادم مغزی را کاهش داده است (۳۶). همان‌طور که اشاره شد، ادم مغزی نتیجه‌ی اختلال در هوموستاز یونی و شکسته شدن سد خونی-مغزی بوده و توسعه‌ی ادم به‌دنبال ایسکمی مغزی می‌تواند ضایعه‌ی ایسکمیک اولیه را تشدید کند. بنابراین هر ترکیبی که بتواند این تعادل را مجدداً برقرار کند، احتمالاً خواهد توانست ادم مغزی را کاهش دهد. یکی از فرآیندهای مخرب در ایسکمی مغزی، افزایش کلسیم درون سلولی است که راه‌اندازی آبشاری از فرآیندهای تخریبی را در نورون موجب می‌شود و تعادل یونی را به هم می‌ریزد (۳۷). در مطالعه‌ی اعلام شده است که کانابیدیول در شرایطی با تحریک‌پذیری بالا، از نوسانات کلسیم جلوگیری کرده و کلسیم درون سلولی را کاهش می‌دهد (۳۸). در نتیجه، این احتمال وجود دارد که کانابیدیول با احیای هوموستاز یونی به‌ویژه کلسیم، در کاهش محتوای آب مغزی نیز ایفای نقش کند. در واقع، کاهش نفوذپذیری عروق مغزی در طول ایسکمی می‌تواند عاملی بر کاهش ادم مغزی باشد. طی فرآیند ایسکمی مغزی، تغییرات التهابی در نورون‌ها می‌تواند سبب تخریب سد خونی-مغزی و تشکیل ادم گردد. بدین صورت که اختلال در یکپارچگی سد خونی-مغزی، با

نقش نوروپروتکتیو خود را بازی کند. بنابراین نتوانسته است مرگ و میر حاصل از آسیب‌های شدید ایسکمی را کاهش دهد. همچنین در دوز ۲۰۰ نانوگرم، شاهد بروز اسهال و کاهش وزن در بعضی از موش‌ها در دو روز اول تزریق بودیم که روند بهبودی در بعضی از آنها با گذشت زمان با مراقبت‌های ویژه مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری

بنابراین با توجه به نتایج حاضر، تا حدودی می‌توان بیان داشت که کانابیدیول در ایسکمی مغزی نیز نقش نوروپروتکتیوی خود را به خوبی ایفا کرده است، به طوری که این ترکیب با کاهش آسیب‌های حاصله از ایسکمی به ویژه ادم مغزی، افق‌های روشنی را در جهت کاهش صدمات ناشی از ایسکمی مغزی، ایجاد کرده است. اگرچه تحقیقات بیشتری برای شفاف سازی مکانیسم‌های درگیر لازم است صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی ستاد توسعه علوم و فناوری‌های شناختی (طرح حمایت از پایان‌نامه‌ها به شماره ۱۸۴۳) انجام شد. نویسندگان مقاله از همکاری و مساعدت آقای دکتر همایون خزعلی استاد فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم زیستی دانشگاه شهید بهشتی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

می‌کند. گزارش‌هایی نیز در راستای تصدیق این یافته موجود است که رفتار وابسته به دوز کانابیدیول را با یک اثر مطلوب (optimal effect) ۵ mg/kg, i.p. گزارش کرده‌اند (۳۲،۳۱،۲۹).

کانابیدیول بر خلاف دیگر ترکیبات مضر گیاه شاهدانه، به دلیل عدم خاصیت روان‌گردانی و نوروپروتکتیوی، به عنوان ترکیبی منحصر به فرد از این گیاه شناخته شده است. یافته‌ها بیان داشته‌اند که کانابیدیول تغییری در متغیرهای فیزیولوژیکی مانند pH، pCO₂، pO₂، ضربان قلب و فشار شریانی ایجاد نکرده است (۳۰). از نکاتی که قابل ذکر است آن است که استعمال کانابیدیول در حیوان و انسان به شکل‌های متفاوت، عوارض جانبی جدی به دنبال نداشته و سمیت آن حتی در دوزهای بالا نیز مشاهده نگردیده است. در برخی مقالات نیز اشاره‌هایی به بعضی از عوارض جانبی این ترکیب مانند مهار متابولیسم دارویی در کبد و کاهش ظرفیت تولید مثل، شده است (۴۶). در این پژوهش نیز تا حدودی عوارض جانبی کمی از این ترکیب مشاهده شده است. بدین صورت که در دوز پایین کانابیدیول ۵۰ نانوگرم مرگ و میر بسیار بالا (بیشتر از ۵۰ درصد) بود. در گروه کنترل و دریافت‌کننده‌ی حلال نیز شاهد مرگ و میر بالای ۵۰ درصد بوده‌ایم، در حالی که در دوز ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم، مرگ و میر به طور قابل توجهی به کمتر از ۲۰ درصد کاهش یافت. این طور می‌توان توجیه کرد که کانابیدیول در دوز پایین نتوانسته است

REFERENCES

1. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. Lancet 2008;371(9624):1612–23.
2. Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: Lesson from animal models. Metab Brain Dis 2004;19:151–67.
3. Rong J, Guo Y, Guohong L. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. J Leukoc Biol 2010;87(5):779–89.
4. Moro M, Almeida A, Bolaños JP, Lizasoain I. Mitochondrial respiratory chain and free radical generation stroke. Free Radic Biol Med 2005;40:1291–304.
5. Rosenberg G. Ischemic Brain Edema. Prog Cardiovasc Dis 1999;42(3):209–16.
6. Petit C, Pulsinelli W, Jacobson G, Plum F. Edema and vascular permeability in cerebral ischemia. J Neurophysiol 1982;41:423–37.
7. Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. Acta Neuropathol 1987;72 (3):236–9.
8. Ovbiagele B, Kidwell CS, Starkman S, Saver J. Potential role of neuroprotective agents in the treatment of patients with acute ischemic stroke. Curr Treat Options Cardiovasc Med 2003;5:367–75.
9. Clarke RC, Watson DP. Cannabis and Natural Cannabis Medicines. In: MA E, editor. Marijuana and the Cannabinoids. New Jersey: Humana Press; 2007. p. 8.
10. El Sohli M. The chemical constituents of cannabis and cannabinoids. In: Grotenhermen F, Russo E, editors. Cannabis and Cannabinoids: Pharmacology, Toxicology, and Therapeutic Potential. New York: Haworth Press; 2002. p. 27–35.
11. Izzo A, Borrelli F, Capasso R, Di Marz V, Mechoulam V. Non-psychoactive plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. Trends Pharmacol Sci 2009;30(10):515–27.

12. 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.
13. Hayakawa K, Mishima K, Fujiwara M. Therapeutic potential of non-psychotropic cannabidiol in ischemic stroke. *Pharmaceuticals* 2010;3:2197–212.
14. Esposito G, Scuderi C, Savani C, Steardo L, Filippis D, Cottone P. Cannabidiol in vivo blunts beta-amyloid induced neuroinflammation by suppressing IL-1beta and iNOS expression. *Br J Pharmacol* 2007;151:1272–9.
15. Hampson AJ, Grimaldi M, Axelrod J, Wink D. Cannabidiol and (-)Delta9-tetrahydrocannabinol are neuroprotective antioxidants. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:8268–73.
16. Pazos M, Demerdash N, Lafuente H, Santos M, Martínez-Pinilla E, Guillén E. Mechanisms of cannabidiol neuroprotection in hypoxiceischemic newborn pigs: Role of 5HT1A and CB2 receptors. *Neuropharmacology* 2013; 71:282–91.
17. McHugh D, Tanner C, Mechoulam R, Pertwee R, Ross R. Inhibition of human neutrophil chemotaxis by endogenous cannabinoids and psytocannabinoids: evidence for a site distinct from CB1 and CB2. *Mol Pharmacol* 2008;73:441–50.
18. 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.
19. Paxinos G, Watson CR. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2005.
20. Braida D, Pegorini S, Arcidiacono MV, Consalez GG, Croci L, Sala M. Post-ischemic treatment with cannabidiol prevents electroencephalographic flattening, hyperlocomotion and neuronal injury in gerbils. *Neurosci Lett* 2003; 346:61–4.
21. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84–91.
22. Reglodi D, Tamás A, Lengvári I. Examination of sensorimotor performance following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Bull* 2003;59:459–66.
23. Lin T, Yong YH, Grace W, Myrna K, Chung YH. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke* 1993;24(1):117–21 .
24. Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos R, Davidson C, Sharp F. A semiautomated method for measuring braininfarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 1990;10:290–3.
25. Lafuente H, Alvarez FJ, Pazos MR, Alvarez A, Rey-Santano M, Mielgo V, *et al*. Cannabidiol reduces brain damage and improves functional recovery after acute hypoxiaeischemia in newborn pigs. *Pediatr. Res* 2011;70:272–7.
26. Pazos MR, Cinquina V, Gómez A, Layunta R, Santos M, Fernández-Ruiz J, *et al*. Cannabidiol administration after hypoxiaeischemia to newborn rats reduces long-term brain injury and restores neurobehavioral function. *Neuropharmacology* 2012;63:776–83.
27. Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsin W. Focalbrain ischemia in the rat: Methods for reproducible neocorticalinfarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral andipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988;8:474–85.
28. Hayakawa K, Mishima K, Abe K, Hasebe N, Takamatsu F, Yasuda H, *et al*. Cannabidiol prevents infarction via the non-CB1 cannabinoid receptor mechanism. *Neuroreport* 2004;15(15):2381–5.
29. Hayakawa K, Mishima K, Irie K, Hazekawa M, Mishima S, Fujioka M, *et al*. Cannabidiol prevents a post-ischemic injury progressively induced by cerebral ischemia via a high-mobility group box1-inhibiting mechanism. *Neuropharmacology* 2008;55:1280–6.
30. Hayakawa K, Mishima K, Nozako M, Hazekawa M, Irie K, Fujioka M, *et al*. Delayed treatment with cannabidiol has a cerebroprotective action via a cannabinoid receptor-independent myeloperoxidaseinhibiting mechanism. *J Neurochem* 2007;102:1488–96.
31. Mishima K, Hayakawa K, Abe K, Ikeda T, Egashira N, Iwasaki K, *et al*. Cannabidiol prevents cerebral infarction via a serotonergic 5-hydroxytryptamine1A receptor-dependent mechanism. *Stroke* 2005;36:1077–82.
32. Pertwee R. The pharmacology and therapeutic potential of cannabidiol. In: Di Marzo V, editor. *Cannabinoids*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2004. p. 32–83.
33. Nozaki K, Nishimura M, Hashimoto N. Mitogen-activated protein kinases and cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2001;23(1):1–19.
34. Esposito G, De Fi, Carnuccio R, Izzo A, Iuvone T. The marijuana component cannabidiol inhibits beta-amyloid-induced tau protein hyperphosphorylation through Wnt/beta-catenin pathway rescue in PC12 cells. *J Mol Med* 2006; 84(3):253–8.

35. Esposito G, De Fi, Maiuri MC, De Stefano D, Carnuccio R, Iuvone T. Cannabidiol inhibits inducible nitric oxide synthase protein expression and nitric oxide production in beta-amyloid stimulated PC12 neurons through p38 MAP kinase and NF- κ B involvement. *Neurosci Lett* 2006;399:91–5.
36. Alvarez FJ, Lafuente H, Carmen Re, Mielgo V, Gastiasoro E, Rueda M, *et al.* Neuroprotective Effects of the Nonpsychoactive Cannabinoid Cannabidiol in Hypoxic-Ischemic Newborn Piglets. *Pediatr Res* 2008;64(6):653–8.
37. Obrenovitch TP, Richards DA. Extracellular neurotransmitter changes in cerebral ischaemia. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1995;7:1–54.
38. Ryan D, Drysdale AJ, Lafourcade C, Pertwee R, Platt B. Cannabidiol targets mitochondria to regulate intracellular Ca²⁺ levels. *J Neurosci* 2009;29:2053–63.
39. Yang G, Gong C, Qin Z, Liu X, 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(1):135–43.
40. Kimura H, Gules I, Meguro T, Zhang J. Cytotoxicity of cytokines in cerebral microvascular endothelial cell. *Brain Res* 2003;990(1-2):148–56.
41. Castillo A, Tolón MR, Fernández-Ruiz J, Romero J, Martínez-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* 2010;37:434–40.
42. Rama Rao K, Jayakumar A, Tong X, Alvarez V, Norenberg M. Marked potentiation of cell swelling by cytokines in ammonia-sensitized cultured astrocytes. *J Neuroinflammation* 2010;7:66.
43. Bemeur C, Qu H, desjardins P, Butterworth R. IL-1 or TNF receptor gene deletion delays onset of encephalopathy and attenuates brain edema in experimental acute liver failure. *Neurochem Int* 2010;56(2):213–5.
44. Kondo T, Reaume A, Huang T, Murakami K, Carlson E, Chen S, *et al.* Edema formation exacerbates neurological and histological outcomes after focal cerebral ischemia in CuZn-superoxide dismutase gene knockout mutant mice. *Acta Neurochir Suppl* 1997;70:62–4.
45. Eliasson M, Huang Z, Ferrante R, Sasamata M, Molliver M, Snyder S, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. *J Neurosci* 1999;19(14):5910–8.
46. Bergamaschi M, Queiroz R, Zuardi A, Crippa J. Safety and Side Effects of Cannabidiol, a Cannabis sativa Constituent. *Curr Drug Saf* 2011;6(4):237–49.