م**قاله پژوهشی** مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان دوره نهم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۹، ۱۷۴–۱۶۲

برهمکنش سیستم کانابینوئیدی و نیکوتینی در یادگیری احترازی غیرفعال در موشهای کوچک آزمایشگاهی

مرتضى پيرى ، محمد ناصحي ، محمدرضا زرين دست

دریافت مقاله: ۸۸/٤/۱۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۸/۱۲/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۹/۱/۲۶ پذیرش مقاله: ۸۹/۲/٤

چکیده

زمینه و هدف: کانابینوئیدها اثرات متنوع و پیچیدهای بر روی اعمال شناختی سطح بالا اعمال می کنند. به دلیل همپوشانی بین گیرندههای نیکوتینی و کانابینوئیدی در برخی از ساختارهای مغزی نظیر هیپوکامپ پشتی، احتمال وجود برهمکنش بین سیستم کانابینوئیدی و نیکوتینی در زمینه کنترل اعمال شناختی وجود دارد. در این مطالعه، اثر مکامیلامین بر یادگیری وابسته به وضعیت القاء شده با 2-WIN55,212 مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، از ۲۸۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI استفاده شد. نمونهها پس از بیهوشی در دستگاه استریوتاکسی قرار گرفتند و کانولگذاری دوطرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی انجام شد. بعد از طی دوره بهبودی هفت روزه، آزمون رفتاری با استفاده از دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال مدل Step-down انجام شد و میزان تأخیر حیوان در پایین آمدن از سکو به عنوان معیار حافظه اندازه گیری شد.

یافته ها: تزریق 2-WIN55, 212 و AM251 پس از آموزش، باعث تخریب حافظه گردید. حافظه تخریب شده با تزریق 4M251 و WIN55, 212-2 یا مکامیلامین در روز آزمون به حالت عادی برگشت.

نتیجه گیری: یافته های این مطالعه نشان می دهد که گیرنده های نیکوتینی هیپوکامپ پشتی نقش مهمی در فراموشی ایجاد شده با WIN55, 212-2 بازی می کنند. شده با ۷۱۸55, 212-2 بازی می کنند.

واژههای کلیدی: 2-212 ,WIN55, 212، مکامیلامین، یادگیری احترازی غیرفعال، موش کوچک آزمایشگاهی

۱- (نویسنده مسئول) مربی گروه آموزشی زیستشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اردبیل

تلفن: ه ۱۰۵۱-۷۷۲۹-۱۰۵، دورنگار: ۷۷۲۹۸۲۹، پست الکترونیکی: ه ۱۰۵۱-۱۰۵۹، دورنگار: ۲۹۸۲۹-۱۰۵۱، پست الکترونیکی: biopiri@

٢- استاديار گروه أموزشي زيستشناسي، دانشگاه أزاد اسلامي، واحد گرمسار

۳- استاد گروه آموزشی فارماکولوژی، مرکز ملی مطالعات اعتیاد، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

مقدمه

رفتار یادگیری وابسته به وضعیت، پدیدهای است که در آن، به یادآوری اطلاعات تازه کسب شده تنها در شرایطی صورت می گیرد که فرد از لحاظ حسی و فیزیولوژیک در همان شرایطی قرار گیرد که اطلاعات کد شده است [۱]. مطالعات آشکار نمودهاند که داروهایی نظیر اپیوئیدها [۲]، لیتیم [۳] و هیستامین [۴] قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت میباشند. اثرات کانابینوئیدها از بسیاری جهات مشابه اپیوئیدها است، کانابینوئیدها مانند اپیوئیدها دارای اثرات ضددردی و ضدالتهابی میباشند و باعث سرکوب سیستم ایمنی بدن و القاء فراموشی میشوند [۵]. کانابینوئیدها دو گیرنده اصلی به نامهای CB1 و CB2 دارند [۵]، اخیراً گیرندههای کانابینوئیدی جدیدی موسوم به CB3 نیز در سیستم عصبی شناسایی و گزارش شده است. البته باید توجه داشت که کانابینوئیدهای درونزاد علاوه بر اثر بر روی گیرندههای کانابینوئیدی، میتوانند مستقیماً عملکرد برخی از گیرندههای غیرکانابینوئیدی نظیر گیرندههای اپیوئیدی و نیکوتینی را تحت تأثیر قرار دهند [٧-۶].

گیرندههای CB1 به مقدار زیاد در نواحی مختلف مغز که نقش مهمی در حافظه دارند نظیر هیپوکامپ، قشر مغز و آمیگدال بیان میشوند [۸]. بیان همزمان گیرندههای نیکوتینی استیل کولین و گیرندههای CB1 در برخی از ساختارهای مغز، نشاندهنده احتمال برهمکنش بین سیستم کانابینوئیدی و نیکوتینی در کنترل اعمال شناختی میباشد [۹]. مدارک زیادی وجود دارد که نشان میدهد کانابینوئیدها میتوانند به واسطه کاهش رهایش چندین میانجی عصبی در قسمتهای مختلف مغز، حافظه

و یادگیری را تخریب نمایند ۱۰۱]. در هیپوکامپ، کانابینوئیدها با اثر بر روی گیرندههای پیشسیناپسی CB1 رهایش میانجیهای مختلف مانند گلوتامات، استیل کولین، گاما آمینوبوتیریک اسید، دوپامین و نوراپینفرین را کاهش میدهند [۱۱]. مطالعات زیاد آزمایشگاهی و کلینیکی نشان میدهند که گیرندههای نیکوتینی نقش مهمی را در فرآیندهای حافظه، یادگیری و توجه بازی میکنند [۱۲]. هیپوکامپ، ورودیهای کولینرژیک مهمی را از بخش میانی سپتوم و بازوی عمودی ناحیه مورب بروکا دریافت می کند و گیرندههای نیکوتینی متنوعی در نورونهای اصلی و نورونهای بینابینی هیپوکامپ وجود دارد [۱۴–۱۳]. برخی از گیرندههای نیکوتینی در روی نورونهای پیش سیناپسی قرار دارند و تحریک این گیرندهها باعث افزایش رهایش استیل کولین، دوپامین و گلوتامات میشود [۱۵، ۹]. فعال شدن این گیرندهها با نیکوتین یا استیل کولین درونزاد، باعث تغییر شکل سیناپسی شده و تقویت دراز مدت سیناپسی (long-term potentiation) را در نواحی مختلف مغز تسهیل مینماید که این اثرات شاید به واسطه افزایش رهایش گلوتامات و فعال نمودن گیرندههای (N-methyll d- (NMDA) asparate receptor صورت گیرد [۱۶]. در بیماری آلزایمر که نوعی تخریب پیشرونده وابسته به سن میباشد، نورونهای کولینرژیک قسمت قاعدهای لوب پیشانی و گیرندههای نیکوتینی برخی از نواحی مغز مانند کورتکس و هیپوکامپ که در فرآیند یادگیری و حافظه نقش دارند، دچار آسیب میشوند و کاهش فعالیت سیستم کولینرژیک که ناشی از این آسیب میباشد، باعث اختلال در اعمال شناختی بیمار می گردد [۱۴–۱۳].

با توجه به همپوشانی گیرندههای کانابینوئیدی و نیکوتینی در سیستم عصبی مرکزی و در نظر گرفتن این نکته که مهار گیرندههای پیش سیناپسی نیکوتینی توسط مکامیلامین به مانند تحریک گیرندههای پیش سیناپسی CB1 توسط 2-212 ،WIN55, باعث کاهش رهایش نوروترانسمیترهای مختلف نظیر استیل کولین، دوپامین و گلوتامات میشود، این احتمال وجود دارد که مکامیلامین قادر به تقلید اثر 2-212 ،WIN55 کر زمینه حافظه احترازی مهاری باشد. بنابراین، در این مطالعه برای اولین بار برهمکنش گیرندههای کانابینوئیدی و نیکوتینی در زمینه یادگیری احترازی غیرفعال مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی، از موشهای کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI (وزن تقریبی ۳۰–۲۲ گرم) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد، استفاده گردید. حیوانها بعد از انتقال به حیوانخانه تحقیقاتی، در قفسهای دهتایی با دوره شبانه روزی طبیعی (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای ۳±۲۲ درجه سانتی گراد، با آب و غذای کافی نگهداری شدند. در هر سری آزمایش، ده سر موش استفاده شد. دستگاه یادگیری احترازی غیرفعال (Inhibitory (passive) avoidanse apparatus)، مدل Step-down، جعبه چوبی به ابعاد ۴۰×۳۰×۳۰ سانتیمتر می باشد. کف دستگاه دارای ۲۹ میله فولادی با قطر ۰/۳ سانتیمتر است که به فاصله ۱ سانتیمتر از یکدیگر قرار گرفتهاند، این میلهها به دستگاه تحریک کننده متصل شده و شوک الکتریکی از طریق میلهها به حیوانات مورد آزمایش وارد میشود. یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد ***× سانتیمتر در قسمت میانی کف دستگاه (روی

میلههای فلزی) قرار گرفته است که حیوانات هنگام انجام آزمایشات به آرامی در روی این سکو قرار داده میشوند. داروها: در این تحقیق داروهای 2-212 ،WIN55, 212 مطرد استفاده قرار گرفت. مکامیلامین در سرم فیزیولوژی مورد استفاده قرار گرفت. مکامیلامین در سرم فیزیولوژی استریل ۹/۰٪ حل شد، در حالی که 2-212 ،WIN55, 212 و مسرم فیزیولوژی استریل ۹/۰٪ و محلول حاملی حل شدند که ۹۰٪ آن سرم فیزیولوژی استریل ۹/۰٪ و ۱۰٪ باقیمانده دی متیل فیزیولوژی استریل ۹/۰٪ و ۱۰٪ باقیمانده دی متیل سولفوکسید به همراه یک قطره روغن توئین ۸۰ بود.

روش جراحی و کانولگذاری در ناحیه هیپوکامپ پشتی: موشهای کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ میلیگرم بر کیلوگرم) و گزیلزین (۱۰ میلیگرم بر کیلوگرم) بیهوش شدند. بعد از بیهوشی، حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند و دو کانول راهنما (اندازه ۲۲) یک میلیمتر بالاتر از محل تزریق، بر اساس اطلس پاکسینوس (۲۰۰۱) قرار داده شد. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی عبارت بود از: T - 4P، T = 1/8، T = 1/8 الای استفاده از سیمان دادن کانول در مختصات مورد نظر، با استفاده از سیمان دندان پزشکی کانولهای راهنما در جای خود محکم شدند. پس از جراحی و قبل از تزریق درون مغزی دارو، به حیوان اجازه داده شد T تا T روز دوره بهبودی پس از جراحی را جراحی و قبل از تزریق درون مغزی دارو، به حیوان به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود بر گردد.

آزمونهای رفتاری: یادگیری احترازی غیرفعال مدل Step-down روشی مورد قبول برای بررسی حافظه دراز مدت در موشهای کوچک آزمایشگاهی میباشد [۱۸]. در این روش، بررسی حافظه در دو روز متوالی و بین ساعت ۸

صبح تا ۲ بعد از ظهر انجام می شود. روز اول، روز آموزش دادن (training day) حیوانها در دستگاه می باشد و در روز دوم یا روز آزمون (testing day)، میزان حافظه حیوانهای آموزش دیده بررسی می شود.

مرحله آموزش: در روز آموزش، هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار می گیرد و مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت می شود. در صورتی که هر موش بیش از ۲۰ ثانیه روی سکو بماند از مطالعه حذف می شود. بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای مؤثر بر روی میلههای فولادی، شوک الکتریکی به مدت ۱۵ثانیه بر روی میلههای فولادی، شوک الکتریکی به مدت ۱۵ثانیه بر روی میشود.

مرحله آزمون یا بررسی حافظه: جلسه آزمون ۲۴ساعت بعد از آموزش با روندی مشابه آموزش انجام میشود، با این تفاوت که حیوانات مورد آزمایش در روز آزمون شوک دریافت نمی کنند. مدت زمان توقف موش بر روی سکو در روز آزمون به عنوان معیار حافظه در موش اندازه گیری میشود. حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف Cut-off ثانیه میباشد که به عنوان حافظه کامل در نظر گرفته میشود.

تزریق درون مغزی دارو: برای تزریق دارو پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن اندازه ۲۷ دندان پزشکی که ۹ میلی متر طول داشت و به کتدان تیوب نوزاد (شماره ۴) متصل بود، در داخل کانول راهنما قرار داده شد و در هر کانول 0/0 میکرولیتر دارو در مدت و ۶۰-۹۰ ثانیه تزریق شد. در حین تزریق به حیوان اجازه داده شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

بافتشناسی: پس از کشتن حیوانها توسط کلروفرم، ۵/۰ میکرولیتر رنگ متیلنبلو ۱٪ به داخل هر کانول تزریق شد، سپس مغز از درون جمجمه خارج گردیده و در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شد. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برشهایی داده شده و محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده میشد.

تجزیه و تحلیل آماری: در همه آزمایشها، زمان توقف حیوان روی سکو، به صورت میانه (Median) و چارک ثبت گردید. به علت تفاوتهای خاص زیادی که در پاسخهای یادگیری حیوانات وجود داشت، دادهها توسط آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) برای دادههای غیرپارامتریک (کروسکال والیس) و به دنبال آن برای بررسی جفت گروهها از روش Mann- withy, U-test استفاده گردید. در تمام ارزیابیهای آماری، p<-1/2 معیار معنیدار بودن تمام ارزیابیهای آماری، p<-1/2 معیار معنیدار بودن نرمافزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرمافزار Excel

تیمارهای دارویی و آزمایشهای انجام شده:

۱- بررسی تأثیر تزریق پس از آموزش 2-12-2 بررسی تأثیر تزریق پس از آموزش 2-20-20 در بر روی حافظه احترازی غیرفعال: هشت گروه حیوان در این آزمایش به کار گرفته شدند. گروه اول بلافاصله پس از آموزش، سالین و گروه دوم حامل را به صورت درون مغزی دریافت کردند. سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف دریافت کردند. سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف بالافاصله پس از آموزش به صورت درون مغزی دریافت بلافاصله پس از آموزش به صورت درون مغزی دریافت

کردند، در روز آزمون، گروههای مختلف، سالین یا حامل (۱ میکرولیتر بر هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمایش دریافت داشتند. سه گروه دیگر بلافاصله بعد از آموزش، WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به ازای هر موش) و در روز آزمون مقادیر مختلف 2-212 (۱، ۱/۵ ۱۰/۵ ۱۰/۵ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درونمغزی دریافت کردند.

۲- بررسی تأثیر تزریق پس از آموزش AM251 بر روی حافظه احترازی غیرفعال: چهار گروه حیوان در این آزمایش استفاده شد. گروه اول بلافاصله پس از آموزش، سالین و سه گروه باقی مانده مقادیر مختلف AM251 مغزی دریافت کردند، در روز آزمون تمامی گروهها قبل از آزمون، سالین (۱ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل آزمون، سالین (۱ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از تست دریافت داشتند.

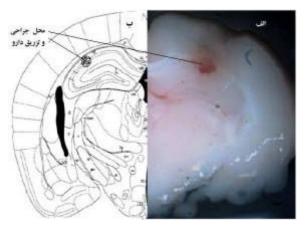
۳- بررسی تاثیر تزریق درون مغزی مکامیلامین بر حافظه احترازی تخریب شده ناشی از 2-212 (WIN55, 212-2: این آزمایش ده گروه حیوان استفاده شد. پنج گروه اول، سالین را بلافاصله بعد از آموزش، و در روز آزمون سالین یا مقادیر مختلف مکامیلامین (۴، ۲، ۱۰/۵، ۱۲۵ میکروگرم به هر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند. پنج گروه باقی مانده بلافاصله بعد از آموزش (۱۰ میکروگرم به هر موش) و در روز آزمون سالین یا مقادیر مختلف مکامیلامین (۴، ۲، ۱/۵، ۱/۵ میکروگرم به هر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی دریافت داشتند.

۴- بررسی تأثیر تزریق درون مغزی مکامیلامین به علاوه 2-212 WIN55, 212 بر حافظه احترازی تخریب شده ناشی از 2-212 WIN55, 212: در این آزمایش شش گروه حیوان

به کار رفت. دو گروه از حیوانات در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش، سالین یا 2-212, WIN55, 212 میکروگرم به هر موش) و در روز آزمون سالین را دریافت کردند، چهار گروه دیگر در روز آموزش 2-212, WIN55, 212 میکروگرم به هر موش) را دریافت داشتند. در روز آزمون، یک گروه از موشها 2-212, WIN55, 212 میکروگرم به موشها 2-212, WIN55, 212 میکروگرم به هر موش) به علاوه مقادیر مختلف مکامیلامین (۲ و 0/، میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی دریافت کردند.

نتايج

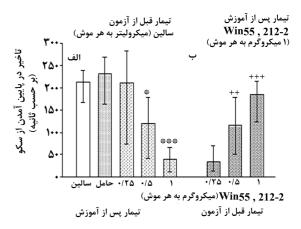
مقطع بافتی مربوط به ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی که نشاندهنده محل قرارگیری صحیح کانول در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس میباشد، در شکل ۱ نشان داده است.



شکل ۱- مقطع بافتی مربوط به کانول گذاری در ناحیه CA1 (الف) و شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس که ناحیه CA1 در آن مشخص شده است (ب).

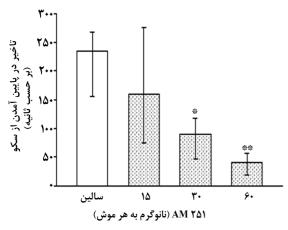
لازم به ذکر است که تنها دادههای مربوط به حیواناتی که محل جراحی آنها در مقایسه با اطلس پاکسینوس صحیح بود، در تجزیه و تحلیل آماری مورد استفاده قرار گرفت.

۱- نتایج تزریق پس از آموزش 2-WIN55, 212 بر روی حافظه احترازی غیرفعال در موشهای کوچک آزمایشگاهی: آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس نشان داد که تزریق پس از آموزش .p<٠/٠١) حافظه را تغيير ميدهد WIN55, 212-2 ANOVA ،H (۴) = ۱۴/۷۸). انجام اَزمون مکمل -Mann Whitney نشان داد که تزریق پس از آموزش ,WIN55 2-212 (۱ و ۰/۵ میکروگرم به هر موش) تأخیر در پایین رفتن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش میدهد (نمودار۱ـ الف). به تزريق2-212 WIN55, 212 قبل از آزمون، قادر به بهبود حافظه تخریب شده با 2-212, WIN55, وز أموزش میباشد (ANOVA ،H (۳) = ۱۸/۳۹ ،p<٠/٠٠١). آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که 212-2) WIN55 نشان داد که میکروگرم به هر موش) قادر به بازگرداندن حافظه تخریب شده میباشد (نمودار ۱ ـ ب).



WIN55, نمودار ۱- $\overline{1}$ ار تزریق پس از $\overline{1}$ موزش و پیش از $\overline{1}$ زمـون $\overline{1}$ 212-2 212-2 بسر حافظـه احتـرازی غیرفعـال در مـوشـهـای کوچـک $\overline{1}$ $\overline{1}$

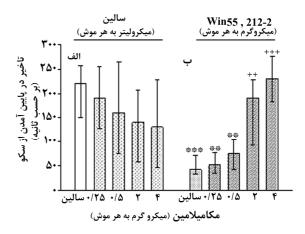
۲- نتایج تزریق پس از آموزش AM251 بر روی حافظه احترازی غیرفعال در موشهای کوچک آزمایشگاهی: آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس نشان داد که تزریق پس از آموزش AM251 حافظه را تغییر میدهد (۲۰/۰۱، ۱۵/۲۹ ۱۵/۳۱ (۳) ANOVA بانجام آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که تزریق پس از آموزش AM251 (۳) نانوگرم به هر پس از آموزش AM251 (۶۰ intra-CA1) موش) تأخیر در پایین رفتن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش میدهد (نمودار۲).



نمودار ۲- اثر تزریق پس از آموزش AM251 بر حافظه احتـرازی غیرفعال در موشهای حوچک آزمایشگاه.

***: p< ٠/٠٠١ در مقایسه با گروه سالین/ سالین.

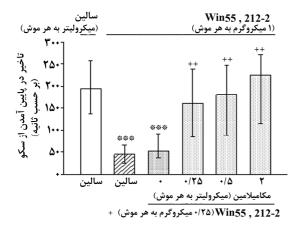
۳- نتایج تزریق درون مغزی مکامیلامین قبل از آزمون بر روی حافظه تخریب شده توسط آزمون بر روی حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2: ازمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس نشان داد که تزریق مکامیلامین به تنهایی قبل از آزمون، تأثیری بر روی حافظه ندارد میاب (ANOVA ،H (\mathfrak{f}) = \mathfrak{m} /۰/۰۵) تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس مشخص نمود که تزریق مکامیلامین قبل از آزمون می تواند حافظه تخریب شده توسط تزریق بعد از آموزش 212-2 WIN55, 212-2



نمودار T- اثر تزریق پیش از آزمون مکامیلامین بر حافظه احترازی غیرفعال (نمودار – الف) و بر حافظه احترازی تخریب شده با تزریق پس از آموزش 2-212 WIN55, 212-2 در موشهای کوچک آزمایشگاهی (نمودار – ب).**: $p<\cdot/\cdot$ ۱ به $p<\cdot/\cdot$ ۱ مقایسه با گروه سالین/ سالین و +++: $p<\cdot/\cdot$ ۱ به $p<\cdot/\cdot$ ۱ مقایسه با سالین/ $p<\cdot/\cdot$ 1 به WIN55, $p<\cdot/\cdot$ 1.

- نتایج تزریق مقادیر غیر مؤثر مکامیلامین و - نتایج تزریق مقادیر غیر مؤثر مکامیلامین و WIN55, 212-2 همراه با هم بر روی حافظه تخریب شده توسط 2-212: WIN55, 212-2 آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس نشان داد که تزریق همزمان مقادیر غیر مؤثر مکامیلامین و 2-212 (WIN55, 212-2 قبل از آموزش می تواند حافظه تخریب شده توسط تزریق بعد از آموزش + WIN55, 212-2 را تغییر دهد + WIN55, 212-2 را تغییر دهد (۸-۷۰۷ شمان داد که مقادیر غیر مؤثر مکامیلامین (۸-۷ و ۸-۷۵ میکروگرم به موراه با 2-212 (WIN55, 212-2 میکروگرم به موراه با 2-212 (WIN55, 212-2 میکروگرم به موراه با 2-212 (WIN55, 212-2 میکروگرم به

هر موش) مى تواند حافظه تخريب شده با 2-212, WIN55, 212 روز آموزش را اصلاح كند (نمودار ۴).



نمودار 3- اثر تزریق همزمان مکامیلامین و WIN55, 212-2 ور روز آزمون بر حافظه تخریب شده توسط $p<\cdot/\cdot$ 01 وز آموزش در موشهای کوچک آزمایشگاهی. ***: $p<\cdot/\cdot$ 01 در مقایسه با گروه سالین/ سالین و $p<\cdot/\cdot$ 1 در مقایسه با سالین/ $p<\cdot/\cdot$ 1. $p<\cdot/\cdot$ 02. $p<\cdot/\cdot$ 03. $p<\cdot/\cdot$ 1.

بحث

در بخش اول این مطالعه، اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده کانابینوئیدی بر یادگیری احترازی غیر فعال، و در بخش دوم اثر آنتاگونیست گیرنده نیکوتینی، مکامیلامین بر حافظه تخریب شده با 2-212 (WIN55, 212 مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات قبلی نشان می دهند تزریق پس از آموزش آگونیست غیراختصاصی کانابینوئیدها، (CA1 به داخل ناحیه CA1 ساعت قبل از آزمون باعث تخریب حافظه و القای فراموشی به صورت وابسته به مقدار می شود. نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر مطالعاتی که نشان می دهند آگونیست گیرنده های CB1 باعث تخریب حافظه و القای فراموشی می شوند، هماهنگ تخریب حافظه و القای فراموشی می شوند، هماهنگ می باشد [۱۹, ۱۹]. یکی از اعمال شناخته شده کانابینوئیدها، مهار تقویت دراز مدت سیناپسی و تخریب

حافظه میباشد. گیرندههای CB1 در پایانه آکسونی نورونهای پیش سیناپسی قرار دارند و فعال شدن این گیرندهها، رهایش میانجیهای عصبی را کاهش میدهد. نشان داده شده است که کانابینوئیدها میتوانند رهایش گلوتامات و استیلکولین را در هیپوکامپ کاهش دهند [۱۰]. با توجه به اهمیت این میانجیهای عصبی در یادگیری و حافظه، میتوان گفت 2-212, WIN55, 212 در واسطه کاهش رهایش گلوتامات و استیلکولین در هیپوکامپ باعث تخریب حافظه میشود [۲۰]. به علاوه، نتایج این مطالعه نشان میدهد که حافظه تخریب شده با تزریق بعد از آموزش 2-212, WIN55, 212 در روز آزمون دوباره به همان مقدار 2-212, WIN55, 212 در روز آزمون دوباره به حالت عادی برمی گردد. این اثر 2-212 WIN55, 212 یادگیری وابسته به وضعیت نامیده میشود.

گزارشهایی وجود دارد که نشان میدهد آنتاگونیست گیرندههای CB1 باعث بهبود حافظه میشود[۲۱] و یا بر حافظه تأثیری نمیگذارد [۲۲]. بیشتر این مطالعات آثار سیستمیک آنتاگونیستهای کانابینوئیدی را به طور کلی مورد مطالعه قرار دادهاند، در حالی که آنتاگونیستهای مختلف کانابینوئیدی میتوانند آثار شناختی متنوعی را در بخشهای مختلف کانابینوئیدی میتوانند آثار شناختی متنوعی را در آنتاگونیست به کار رفته، محل تزریق دارو در مغز و مقدار داروی تزریق شده، پاسخهای مختلف ایجاد میگردد آزمون آزمون AM251 آنتاگونیست اختصاصی گیرندههای بعد از آزمون AM251 آنتاگونیست اختصاصی گیرندههای کانابینوئیدی) منجر به تخریب حافظه احترازی غیرفعال در روز آزمون میشود. نکته جالب توجه در این دو آزمایش

این است که آگونیست و آنتاگونیست گیرندههای کانابینوئیدی هر دو منجر به تخریب حافظه شدهاند، با وجود شباهت پاسخ ایجاد شده توسط آگونیست و آنتاگونیست، باید به این نکته توجه داشت که تخریب حافظه توسط این دو دارو، با سازوکارهای کاملاً متفاوتی صورت می گیرد.

مطالعات نشان می دهند که سطح کانابینوئیدهای درونزاد در هیپوکامپ، بلافاصله بعد از آموزش افزایش می یابد و این کانابینوئیدهای درونزاد، فرآیند تثبیت حافظه را تسهیل می نمایند. کانابینوئیدهای درونزاد با اثر بر روی گیرندههای CB1 واقع در پایانه اکسونی نورونهای گابائرژیک بینابینی واقع در هیپوکامپ پشتی، رهایش گابا از این نورونها را کاهش می دهند. با توجه به این که نورونهای گابائرژیک بینابینی همواره یک مهار تونیک نورونهای هرمی هیپوکامپ پشتی اعمال می نمایند، کاهش فعالیت نورونهای گابائرژیک باعث برداشته شدن مهار از روی نورونهای گابائرژیک باعث برداشته شدن مهار از روی نورونهای گلوتاماترژیک هرمی می شود. آنتاگونیستهای گیرندههای CB1 به مانند AM251 با بر هم زدن این سیستم تعدیل کننده درونزاد، موجب تخریب حافظه و القاء فراموشی می شوند [۲۴–۲۳].

مطالعات نشان می دهند که کانابینوئیدهای درونزاد از طریق مهار برگشتی آزادسازی گابا، باعث تسهیل ایجاد تقویت دراز مدت سیناپسی در هیپوکامپ می شوند [۲۵]. در پدیده مهار برگشتی دو مرحله اصلی وجود دارد، در مرحله اول، تحریک نورونهای پس سیناپسی باعث تحریک ساخت و آزادسازی کانابینوئیدهای درونزاد می شود و در مرحله بعد، این کانابینوئیدها با اثر بر روی گیرندههای پیش سیناپسی گابائرژیک در هیپوکامپ، باعث

کاهش رهایش گابا می گردند. البته باید به این نکته مهم نیز توجه داشت که احتمال دارد AM251 به مانند (CB1 (آنتاگونیست دیگر گیرندههای SR141716A) به عنوان آگونیست معکوس عمل نماید و دارای اثرات متابولیکی مختص خود باشد [۲۶]. شباهت ساختاری این دو آنتاگونیست به یکدیگر [۲۷] و مهار فعالیت G پروتئینها [۲۸] توسط هر دو، باعث تقویت این احتمال پروتئینها [۲۸] توسط هر دو، باعث تقویت این احتمال میشود که SR141716A نیز به مانند SR141716A به عنوان آگونیست معکوس عمل نماید.

نتایج این مطالعه همچنین نشان می دهد که حافظه تخریب شده با تزریق بعد از آزمون 2-212 (WIN55, 212 عادی تجویز پیش از آزمون مکامیلامین، دوباره به حالت عادی برمی گردد. علاوه بر این، تزریق مقادیر غیر مؤثر (WIN55, 212 و مکامیلامین همراه با هم، می تواند حافظه تخریب شده با 2-212 و مکامیلامین همراه با هم، می تواند حافظه تخریب شده با 2-212 برگرداند. یادگیری وابسته به وضعیت، را به حالت عادی برگرداند. یادگیری وابسته به وضعیت، شده فقط در شرایطی امکان پذیر می باشد که حیوان در همان شرایط فیزیولوژیک و حسی قرار بگیرد که در موقع آموزش قرار داشته است. این احتمال وجود دارد که آموزش قرار داشته است. این احتمال وجود دارد که را با استفاده از سازوکارهای مختلف ایجاد نمایند. را با استفاده از سازوکارهای مختلف ایجاد نمایند، و WIN55, 212-2

و گلوتامات را در هیپوکامپ کاهش دهد [۱۱] و مکامیلامین، گیرندههای نیکوتینی استیلکولین را مهار مینماید. با توجه به این که تحریک گیرندههای نیکوتینی باعث آزادسازی استیلکولین، دوپامین و گلوتامات میشود [۹]، مهار گیرندههای نیکوتینی با مکامیلامین میتواند مانند 2-212 WIN55, 212 رهایش استیلکولین، دوپامین و گلوتامات را کاهش دهد و شرایط فیزیولوژیک یکسانی را در روز آموزش و آزمون ایجاد نماید.

نتيجهگيري

نتایج تحقیق حاضر نشان میدهد که آگونیست و آنتاگونیست گیرندههای کانابینوئیدی باعث تخریب حافظه احترازی مهای میشوند که نشاندهنده نقش تعدیل کننده کانابینوئیدهای درونزاد در یادگیری و حافظه میباشد. نتایج این تحقیق همچنین مشخص نمود که کانابینوئیدها، یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد مینمایند و تزریق مکامیلامین در روز آزمون، به مانند 2-212 WIN55, 212 روز آزمون قادر است حافظه تخریب شده با 2-212 WIN55, 212.2

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات خانم مریم السادات شاهین که در تحقیق حاضر همکاری بی شائبه نمودهاند، تشکر و قدردانی می گردد.

References

- [1] Shulz DE, Sosnik R, Ego V, Haidarliu S, Ahissar E. A neuronal analogue of state-dependent learning. *Nature* 2000; 403(6769): 549-53.
- [2] Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol* 2004; 497(2): 197-204.
- [3] Zarrindast MR, Madadi F, Ahmadi S.

 Repeated administrations of dopamine receptor agents affect lithium-induced state-dependent learning in mice. *J*Psychopharmacol 2009; 23(6): 645-51.
- [4] Zarrindast MR, Fazli-Tabaei S, Khalilzadeh A, Farahmanfar M, Yahyavi SH. Cross statedependent retrieval between histamine and lithium. *Physiol Behav* 2005; 86(1-2): 154-63.
- [5] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365(6441): 61-5.
- [6] Pugh G Jr, Smith PB, Dombrowski DS, Welch SP. The role of endogenous opioids in

- enhancing the antinociception produced by the combination of delta 9-tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 279(2): 608-16.
- [7] Oz M, Ravindran A, Diaz-Ruiz O, Zhang L, Morales M. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in Xenopus oocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306(3): 1003-10.
- [8] Hohmann AG, Herkenham M. Regulation of cannabinoid and mu opioid receptors in rat lumbar spinal cord following neonatal capsaicin treatment. *Neurosci Lett* 1998; 252(1): 13-6.
- [9] Picciotto MR. Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse. *Drug* Alcohol Depend 1998; 51(1-2): 165-72.
- [10] Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22(11): 565-72.

- [11] Al-Hayani A, Davies SN. Effect of cannabinoids on synaptic transmission in the rat hippocampal slice is temperature-dependent. *Eur J Pharmacol* 2002; 442(1-2): 47-54.
- [12] Francis PT, Palmer AM, Snape M, Wilcock GK. The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress. J Neurol Neurosurg Psychiatry 1999; 66(2): 137-47.
- [13] Rosato-Siri M, Cattaneo A, Cherubini E. Nicotine-induced enhancement of synaptic plasticity at CA3-CA1 synapses requires GABAergic interneurons in adult anti-NGF mice. J Physiol 2006; 576(Pt 2): 361-77.
- [14] Wanaverbecq N, Semyanov A, Pavlov I, Walker MC, Kullmann DM. Cholinergic axons modulate GAB Aergic signaling among hippocampal interneurons via postsynaptic alpha 7 nicotinic receptors. *J Neurosci* 2007; 27(21): 5683-93.
- [15] McGehee DS, Heath MJ, Gelber S, Devay P, Role LW. Nicotine enhancement of fast excitatory synaptic transmission in CNS by presynaptic receptors. *Science* 1995; 269(5231): 1692-6.

- [16] Hasselmo ME. Neuromodulation: acetyl choline and memory consolidation. *Trends Cogn Sci* 1999; 3(9): 351-9.
- [17] Paxinos G, Franklin, K.B.J. The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. 2nd Ed. Academic Press. 2001.
- [18] Kameyama T, Nabeshima T, Kozawa T. Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method. Suitability for experimental amnesia models. *J Pharmacol Methods* 1986; 16(1): 39-52.
- [19] Nasehi M, Sahebgharani M, Haeri-Rohani A, Zarrindast MR. Effects of cannabinoids infused into the dorsal hippocampus upon memory formation in 3-days apomorphinetreated rats. *Neurobiol Learn Mem* 2009; 92(3): 391-9.
- [20] Gifford AN, Tang Y, Gatley SJ, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. *Neurosci Lett* 1997; 238(1-2): 84-6.
- [21] Takahashi RN, Pamplona FA, Fernandes MS.
 The cannabinoid antagonist SR141716A
 facilitates memory acquisition and

- consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett* 2005; 380(3): 270-5.
- [22] da Silva GE, Morato GS, Takahashi RN.

 Rapid tolerance to Delta(9)-tetrahydrocannabinol and cross-tolerance between
 ethanol and Delta(9)-tetrahydrocannabinol in
 mice. Eur J Pharmacol 2001; 431(2): 201-7.
- [23] de Oliveira Alvares L, de Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanziotti VB, et al. Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiol Learn Mem* 2005; 83(2): 119-24.
- [24] de Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedroso MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA. AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res* 2006; 1075(1): 60-7.

- [25] Carlson G, Wang Y, Alger BE. Endo cannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. *Nat Neurosci* 2002; 5(8): 723-4.
- [26] Landsman RS, Burkey TH, Consroe P, Roeske WR, Yamamura HI. SR141716A is an inverse agonist at the human cannabinoid CB1 receptor. *Eur J Pharmacol* 1997; 334(1): R1-2.
- [27] Gatley SJ, Gifford AN, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. 123I-labeled AM251: a radioiodinated ligand which binds in vivo to mouse brain cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol* 1996; 307(3): 331-8.
- [28] Savinainen JR, Saario SM, Niemi R, Jarvinen T, Laitinen JT. An optimized approach to study endocannabinoid signaling: evidence against constitutive activity of rat brain adenosine A1 and cannabinoid CB1 receptors.
 Br J Pharmacol 2003; 140(8): 1451-9.

Interactions Between the Cannabinoid and Nicotinic Systems on Inhibitory Avoidance Learning in Mice

M. Piri¹, M. Nasehi², M.R. Zarrindast³

Received: 09/07/09 Sent for Revision: 16/03/10 Received Revised Manuscript: 13/04/10 Accepted: 24/04/10

Background and Objectives: Cannabinoid exerts have widespread and complex effects on higher cognitive functions. An overlapping distribution of nicotinic receptors with cannabinoid receptors has been reported in some brain structures such as dorsal hippocampus, thus the functional interactions between cannabinoid and nicotinic systems in cognitive control seem possible. In the present study, the effects of mecamylamine on WIN55, 212-2 induced state-dependent learning was examined.

Materials and Methods: In this experimental study, 280 adult male NMRI mice were anaesthetized and then were cannulae implanted bilaterally in the CA1 regions of the dorsal hippocampus using stereotaxic method. After a seven day recovery duration, behavioral testing was started in inhibitory avoidance task. The animals were trained in a step-down type inhibitory avoidance task, and tested 24h after training to measure the step-down latency for the assessment of memory retention. All experiments were conducted in accordance with "standard ethical guidelines for animal care and use".

Results: Post-training administration of WIN55, 212-2 and AM251 decreased the memory retrieval. The memory impairment induced by WIN55, 212-2 was completely reversed by pre-test administration of WIN55, 212-2 and/or mecamylamine, suggesting that WIN55, 212-2 induced state-dependent memory.

Conclusion: These results suggest that nicotinic receptors of the dorsal hippocampal may play an important role in Win55,212-2-induced amnesia and WIN55,212-2 state-dependent memory.

Key words: WIN55, 212-2, Mecamylamine, Inhibitory avoidance learning, Mice

Funding: This research was funded by Tehran University of Medical Sciences.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: The Ethics Committee of Tehran University of Medical Sciences approved the study.

¹⁻ Instructor, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Ardabil branch, Ardabil, Iran (Corresponding Author) Tel: (0451) 7727905, Fax: (0451) 7729826, E-mail: biopiri@yahoo.com

²⁻ Assistant Prof., Dept. of Biology, Islamic Azad University, Garmsar branch, Semnan, Iran

³⁻ Prof., Dept. of Pharmacology and Iranian National Center for Addiction Studies, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran