

## مقاله 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

مرتضی پیری<sup>۱</sup>، محمد ناصحی<sup>۲</sup>، محمدرضا زرین دست<sup>۳</sup>

دریافت مقاله: ۸۸/۴/۱۸ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۸/۱۲/۲۵ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۹/۱/۲۴ پذیرش مقاله: ۸۹/۲/۴

### چکیده

**زمینه و هدف:** کانابینوئیدها اثرات متنوع و پیچیده‌ای بر روی اعمال شناختی سطح بالا اعمال می‌کنند. به دلیل همپوشانی بین گیرنده‌های نیکوتینی و کانابینوئیدی در برخی از ساختارهای مغزی نظیر هیپوکامپ پستی، احتمال وجود برهمکنش بین سیستم کانابینوئیدی و نیکوتینی در زمینه کنترل اعمال شناختی وجود دارد. در این مطالعه، اثر مکامیلاین بر یادگیری وابسته به وضعیت القاء شده با WIN55,212-2 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 پستی 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 اندازه‌گیری شد.

**یافته‌ها:** تزریق WIN55, 212-2 و AM251 پس از آموزش، باعث تخریب حافظه گردید. حافظه تخریب شده با تزریق WIN55, 212-2 به طور کامل با بکار بردن WIN55, 212-2 یا مکامیلاین در روز آزمون به حالت عادی برگشت.

**نتیجه‌گیری:** یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که گیرنده‌های نیکوتینی هیپوکامپ پستی نقش مهمی در فراموشی ایجاد شده با WIN55, 212-2 و یادگیری وابسته به وضعیت القاء شده با WIN55, 212-2 بازی می‌کنند.

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

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

تلفن: ۰۴۵۱-۷۷۲۷۹۰۵، دورنگار: ۰۴۵۱-۷۷۲۹۸۲۶، پست الکترونیکی: biopiri@yahoo.com

۲- استادیار گروه آموزشی زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، 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 می‌گیرد 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 ضد درد و ضد التهابی 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 [۶-۷].

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 استیل‌کولین 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 [۱۰]. در هیپوکامپ، کانابینوئیدها با اثر بر روی گیرنده‌های پیش‌سیناپسی CB1 رهایش میانجی‌های مختلف مانند گلوتامات، استیل‌کولین، 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 سیتوم و بازوی عمودی ناحیه مورب بروکا دریافت می‌کند و گیرنده‌های نیکوتینی متنوعی در نورون‌های اصلی و نورون‌های بینابینی هیپوکامپ وجود دارد [۱۳-۱۴]. برخی از گیرنده‌های نیکوتینی در روی نورون‌های پیش‌سیناپسی قرار دارند و تحریک این گیرنده‌ها باعث افزایش رهایش استیل‌کولین، دوپامین و گلوتامات می‌شود [۱۵، ۹]. فعال شدن این گیرنده‌ها با نیکوتین یا استیل‌کولین 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 (NMDA) N-methyl d- aspartate 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 می‌گردد [۱۳-۱۴].

میله‌های فلزی) قرار گرفته است که حیوانات هنگام انجام آزمایشات به آرامی در روی این سکو قرار داده می‌شوند.

**داروها:** در این تحقیق داروهای WIN55, 212-2, AM251 (تاکریس، آمریکا) و مکامیلامین (سیگما، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. مکامیلامین در سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹٪ حل شد، در حالی که WIN55, 212-2 و AM251 در محلول حاملی حل شدند که ۹۰٪ آن سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹٪ و ۱۰٪ باقیمانده دی‌متیل 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 گریلوزین (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:  $AP = -2$ ,  $ML = \pm 1/6$ ,  $V = -1/5$  [۱۷]. بعد از قرار 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 ۵ تا ۷ روز دوره بهبودی پس از جراحی را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردد.

**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

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 WIN55, 212-2، باعث کاهش رهاش نوروترانسمیترهای مختلف نظیر استیل‌کولین، دوپامین و گلوتامات می‌شود، این احتمال وجود دارد که مکامیلامین قادر به تقلید اثر WIN55, 212-2 در زمینه حافظه احترازی مهارى 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  $22 \pm 3$  درجه سانتی‌گراد، 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  $30 \times 30 \times 40$  سانتی‌متر می‌باشد. کف دستگاه دارای ۲۹ میله فولادی با قطر  $0/3$  سانتی‌متر است که به فاصله ۱ سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفته‌اند، این میله‌ها به دستگاه تحریک‌کننده متصل شده و شوک الکتریکی از طریق میله‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می‌شود. یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد  $4 \times 4 \times 4$  سانتی‌متر در قسمت میانی کف دستگاه (روی

**بافت‌شناسی:** پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم، ۰/۵ میکرولیتر رنگ متیلن بلو ۱٪ به داخل هر کانول تزریق شد، سپس مغز از درون مجسمه 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،  $p < 0/05$  معیار معنی‌دار بودن مقایسه بین گروه‌ها بود. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

**تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده:**

۱- بررسی تأثیر تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر روی حافظه احترازی غیرفعال: هشت گروه حیوان در این آزمایش به کار گرفته شدند. گروه اول بلافاصله پس از آموزش، سالیین و گروه دوم حامل را به صورت درون مغزی دریافت کردند. سه گروه باقی‌مانده مقادیر مختلف WIN55, 212-2 (۱، ۰/۵، ۰/۲۵ میکروگرم بر هر موش) را بلافاصله پس از آموزش به صورت درون مغزی دریافت

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

**مرحله آموزش:** در روز آموزش، هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار می‌گیرد و مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت می‌شود. در صورتی که هر موش بیش از ۲۰ ثانیه روی سکو بماند از مطالعه حذف می‌شود. بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای مؤثر بر روی میله‌های فولادی، شوک الکتریکی به مدت ۱۵ ثانیه (۱ هرتز، ۰/۵ ثانیه و ۴۵ ولت مستقیم) به حیوان داده می‌شود.

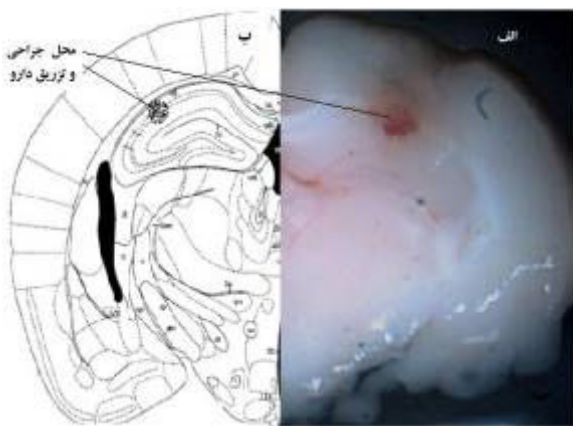
**مرحله آزمون یا بررسی حافظه:** جلسه آزمون ۲۴ ساعت بعد از آموزش با روندی مشابه آموزش انجام می‌شود، با این تفاوت که حیوانات مورد آزمایش در روز آزمون شوک دریافت نمی‌کنند. مدت زمان توقف موش بر روی سکو در روز آزمون به عنوان معیار حافظه در موش اندازه‌گیری می‌شود. حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف Cut-off) برابر با ۳۰۰ 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 میلی‌متر طول داشت و به کت‌دان تیوب نوزاد (شماره ۴) متصل بود، در داخل کانول راهنما قرار داده شد و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق شد. در حین تزریق به حیوان اجازه داده شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

به کار رفت. دو گروه از حیوانات در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش، سالین یا WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) و در روز آزمون سالین را دریافت کردند، چهار گروه دیگر در روز آموزش WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) را دریافت داشتند. در روز آزمون، یک گروه از موش‌ها WIN55, 212-2 (۰/۲۵ میکروگرم به هر موش) و سه گروه باقی مانده WIN55, 212-2 (۰/۲۵ میکروگرم به هر موش) به علاوه مقادیر مختلف مکامیلامین (۲ و ۰/۵، ۰/۲۵ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی دریافت کردند.

### نتایج

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



شکل ۱- مقطع بافتی مربوط به کاتول‌گذاری 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.

کردند، در روز آزمون، گروه‌های مختلف، سالین یا حامل (۱ میکروگرم 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 WIN55, 212-2 (۱، ۰/۵، ۰/۲۵ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی 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 (۰/۳۰، ۰/۱۵، ۰/۰۳ میکروگرم به هر موش) را به صورت درون مغزی دریافت کردند، در روز آزمون تمامی گروه‌ها قبل از آزمون، سالین (۱ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از تست دریافت داشتند.

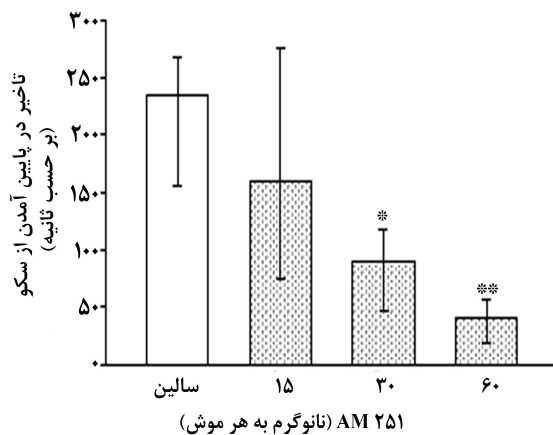
### ۳- بررسی تأثیر تزریق درون مغزی مکامیلامین بر

حافظه احترازی تخریب شده ناشی از WIN55, 212-2: در 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 (۰/۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۰۴ میکروگرم به هر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون دریافت کردند. پنج گروه باقی مانده بلافاصله بعد از آموزش WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) و در روز آزمون سالین یا مقادیر مختلف مکامیلامین (۰/۲۵، ۰/۰۵، ۰/۰۲، ۰/۰۰۴ 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 WIN55, 212-2 بر حافظه احترازی تخریب شده ناشی از WIN55, 212-2: در این آزمایش شش گروه حیوان

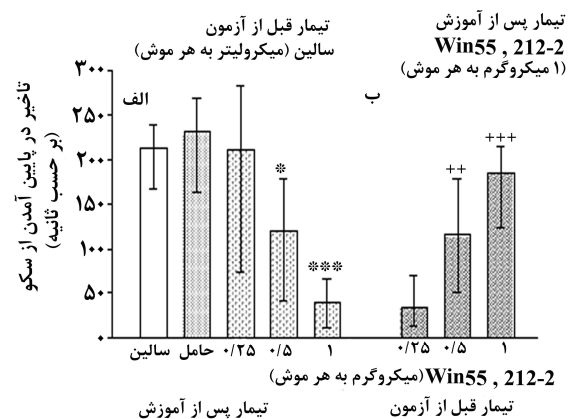
۲- نتایج تزریق پس از آموزش AM251 بر روی حافظه احترازی غیرفعال در موش‌های کوچک آزمایشگاهی: آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس نشان داد که تزریق پس از آموزش AM251 حافظه را تغییر می‌دهد ( $p < 0.01$ ,  $H(3) = 15/29$ , ANOVA). انجام آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که تزریق پس از آموزش AM251 (intra-CA1) ۶۰ نانوگرم به هر موش تأخیر در پایین رفتن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش می‌دهد (نمودار ۲).



نمودار ۲- اثر تزریق پس از آموزش AM251 بر حافظه احترازی غیرفعال در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. \*\*\* $p < 0.001$  در مقایسه با گروه سالیین/سالیین.

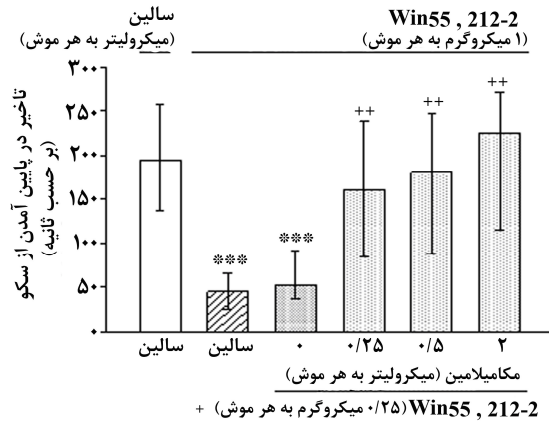
۳- نتایج تزریق درون مغزی مکامیلامین قبل از آزمون بر روی حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2: آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس نشان داد که تزریق مکامیلامین به تنهایی قبل از آزمون، تأثیری بر روی حافظه ندارد. ( $p > 0.05$ ,  $H(4) = 3/45$ , ANOVA)، (نمودار ۳-الف). تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس مشخص نمود که تزریق مکامیلامین قبل از آزمون می‌تواند حافظه تخریب شده توسط تزریق بعد از آموزش WIN55, 212-2

۱- نتایج تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر روی حافظه احترازی غیرفعال در موش‌های کوچک آزمایشگاهی: آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس نشان داد که تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 حافظه را تغییر می‌دهد ( $p < 0.01$ ,  $H(4) = 14/78$ , ANOVA). انجام آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 (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 (نمودار ۱-الف). به علاوه، تزریق WIN55, 212-2 قبل از آزمون، قادر به بهبود حافظه تخریب شده با WIN55, 212-2 روز آموزش می‌باشد (آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که WIN55, 212-2 (۱ و ۰/۵ میکروگرم به هر موش) قادر به بازگرداندن حافظه تخریب شده می‌باشد (نمودار ۱-ب)).



نمودار ۱- آثار تزریق پس از آموزش و پیش از آزمون WIN55, 212-2 بر حافظه احترازی غیرفعال در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. \*\*\* $p < 0.001$ ، \*\* $p < 0.05$  در مقایسه با گروه سالیین/سالیین و  $p < 0.01$ ،  $+++P < 0.001$  در مقایسه با سالیین/سالیین/سالیین/سالیین.

هر موش) می‌تواند حافظه تخریب شده با WIN55, 212-2 روز آموزش را اصلاح کند ( نمودار ۴).

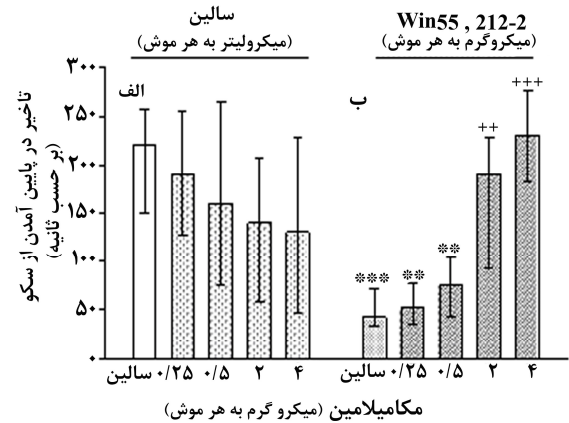


نمودار ۴- اثر تزریق همزمان مکامیلامین و WIN55, 212-2 در روز آزمون بر حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2 روز آموزش در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. \*\*\*:  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه سالمین/ سالمین و ++:  $p < 0.01$  در مقایسه با سالمین/ WIN55, 212-2.

### 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 WIN55, 212-2 مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات قبلی نشان می‌دهند تزریق پس از آموزش آگونیست غیراختصاصی کانابینوئیدها، WIN55, 212-2 به داخل ناحیه CA1، ۲۴ ساعت قبل از آزمون باعث تخریب حافظه و القای فراموشی به صورت وابسته به مقدار می‌شود. نتایج مطالعه حاضر با نتایج سایر مطالعاتی که نشان می‌دهند آگونیست گیرنده‌های CB1 باعث تخریب حافظه و القای فراموشی می‌شوند، هماهنگ می‌باشد [۱۹، ۱۱]. یکی از اعمال شناخته شده کانابینوئیدها، مهار تقویت دراز مدت سیناپسی و تخریب

را تغییر دهد ( $p < 0.001$ ,  $H(4) = 20.71$ , ANOVA). آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که مکامیلامین (۴ و ۲ میکروگرم به هر موش) می‌تواند حافظه تخریب شده با WIN55, 212-2 روز آموزش را اصلاح کند (نمودار ۳-ب).



نمودار ۳- اثر تزریق پیش از آزمون مکامیلامین بر حافظه احترازی غیرفعال (نمودار - الف) و بر حافظه احترازی تخریب شده با تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 در موش‌های کوچک آزمایشگاهی (نمودار - ب). \*\*\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.01$  در مقایسه با گروه سالمین/ سالمین و +++:  $p < 0.001$ , ++:  $p < 0.01$  در مقایسه با سالمین/ WIN55, 212-2.

۴- نتایج تزریق مقادیر غیر مؤثر مکامیلامین و WIN55, 212-2 همراه با هم بر روی حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2: آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه کروسکال والیس نشان داد که تزریق همزمان مقادیر غیر مؤثر مکامیلامین و WIN55, 212-2 قبل از آزمون، می‌تواند حافظه تخریب شده توسط تزریق بعد از آموزش WIN55, 212-2 را تغییر دهد ( $p < 0.001$ ,  $H(4) = 20.97$ , ANOVA). آزمون مکمل Mann-Whitney نشان داد که مقادیر غیر مؤثر مکامیلامین (۰/۵ و ۰/۲۵ میکروگرم به هر موش) همراه با WIN55, 212-2 (۰/۲۵ میکروگرم به

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

مطالعات نشان می‌دهند که سطح کانابینوئیدهای درون‌زاد در هیپوکامپ، بلافاصله بعد از آموزش افزایش می‌یابد و این کانابینوئیدهای درون‌زاد، فرآیند تثبیت حافظه را تسهیل می‌نمایند. کانابینوئیدهای درون‌زاد با اثر بر روی گیرنده‌های CB1 واقع در پایانه اکسونی نورون‌های گابائترژیک بینابینی واقع در هیپوکامپ پشتی، رهایش گابا از این نورون‌ها را کاهش می‌دهند. با توجه به این که نورون‌های گابائترژیک بینابینی همواره یک مهار تونیک روی نورون‌های هرمی هیپوکامپ پشتی اعمال می‌نمایند، کاهش فعالیت نورون‌های گابائترژیک باعث برداشته شدن مهار از روی نورون‌های گلوتاماترژیک هرمی می‌شود. آنتاگونیسست‌های گیرنده‌های CB1 به مانند AM251 با بر هم زدن این سیستم تعدیل‌کننده درون‌زاد، موجب تخریب حافظه و القاء فراموشی می‌شوند [۲۳-۲۴].

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

حافظه می‌باشد. گیرنده‌های CB1 در پایانه اکسونی 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 WIN55, 212-2 به 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 WIN55, 212-2، با تزریق مجدد همان مقدار WIN55, 212-2 در روز آزمون دوباره به حالت عادی برمی‌گردد. این اثر WIN55, 212-2 یادگیری وابسته به وضعیت نامیده می‌شود.

گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد آنتاگونیسست گیرنده‌های CB1 باعث بهبود حافظه می‌شود [۲۱] و یا بر حافظه تأثیری نمی‌گذارد [۲۲]. بیشتر این مطالعات آثار سیستمیک آنتاگونیسست‌های کانابینوئیدی را به طور کلی مورد مطالعه قرار داده‌اند، در حالی که آنتاگونیسست‌های مختلف کانابینوئیدی می‌توانند آثار شناختی متنوعی را در بخش‌های مختلف مغز ایجاد کنند و بر حسب نوع آنتاگونیسست به کار رفته، محل تزریق دارو در مغز و مقدار داروی تزریق شده، پاسخ‌های مختلف ایجاد می‌گردد [۲۳-۲۴]. نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد که تزریق بعد از آزمون AM251 (آنتاگونیسست اختصاصی گیرنده‌های CB1) به مانند WIN55, 212-2 (آگونیسست گیرنده‌های کانابینوئیدی) منجر به تخریب حافظه احترازی غیرفعال در روز آزمون می‌شود. نکته جالب توجه در این دو آزمایش



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 WIN55, 212-2، رهایش استیل‌کولین، دوپامین و گلوتامات را کاهش دهد و شرایط فیزیولوژیک یکسانی را در روز آموزش و آزمون ایجاد نماید.

### نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که آگونیسست و آنتاگونیسست گیرنده‌های کانابینوئیدی باعث تخریب حافظه احترازی مه‌ای می‌شوند که نشان‌دهنده نقش تعدیل‌کننده 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 WIN55, 212-2 روز آزمون قادر است حافظه تخریب شده با WIN55, 212-2 روز آموزش را به حالت عادی برگرداند.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات خانم مریم السادات شاهین که در تحقیق حاضر همکاری بی‌شائبه نموده‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

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

نتایج این مطالعه همچنین نشان می‌دهد که حافظه تخریب شده با تزریق بعد از آزمون WIN55, 212-2، با تجویز پیش از آزمون مکامیلامین، دوباره به حالت عادی برمی‌گردد. علاوه بر این، تزریق مقادیر غیر مؤثر WIN55, 212-2 و مکامیلامین همراه با هم، می‌تواند حافظه تخریب شده با WIN55, 212-2 روز آموزش را اصلاح نموده و آن را به حالت عادی برگرداند. یادگیری وابسته به وضعیت، پدیده‌ای است که در آن به خاطر آوری اطلاعات یادگیری شده فقط در شرایطی امکان‌پذیر می‌باشد که حیوان در همان شرایط فیزیولوژیک و حسی قرار بگیرد که در موقع آموزش قرار داشته است. این احتمال وجود دارد که WIN55, 212-2 و مکامیلامین شرایط فیزیولوژیک یکسان را با استفاده از سازوکارهای مختلف ایجاد نمایند. WIN55, 212-2 می‌تواند آزادسازی استیل‌کولین، دوپامین

## 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 state-dependent 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 GABAergic 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: acetylcholine 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 apomorphine-treated 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, Pedrosa 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. Endocannabinoids 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] Gately 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. Piri<sup>1</sup>, M. Nasehi<sup>2</sup>, M.R. Zarrindast<sup>3</sup>**

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*