اثر تزریق درون هیپوکامپی سیستم کانابینوئیدی بر حافظه موش های صحرایی پیش تیمار شده با مورفین

مجید نوائیان[۱]، بهاره پاکپور[۲] ، محمد رضا زرین دست[۳] ، شهربان عریان[٤]

چکیده

در این پژوهش آثار تزریق دو طرفه آگونیست ها و آنتاگونیست های کانابینوئیدی در هیپوکامپ پشتی (CA1) بر حافظه موش های صحرایی پیش تیمارشده با مورفین بررسی شد. روش: روش اجتنابی مهاری (غیر فعال) با مدل Step-through برای بررسی حافظه در موش های صحرایی نژاد ویستار بکار گرفته شد و حافظه حیوان ۲٤ ساعت بعد از آموزش مورد بررسی قرار گرفت. یافته ها: نتایج تزریق درون مغزی آگونیست گیرنده های کانابینوئیدی WIN55, 212-2 (۰/۵ ، ۰/۲۵ g/rat) و آنتاگونیست اختصاصی CB1، AM251 (۱۰۰ ، ۵۰ ، ۲۵ ng/rat) به موش های صحرایی به تخریب حافظه حیوانات در روز آزمون منجر شد. تزریق درون مغزی AM251، ۲ دقیقه قبل از تزریق درون مغزی WIN55, 212-2 (۰/۵ µg/rat) تخریب حافظه ناشی از WIN55, 212-2 (۰/۵ µg/rat) را از بین برد. اثر تخریبی WIN55, 212-2 (۰/۵ µg/rat) بر روی حافظه بدنبال تزریق سه روزه مقدار های مختلف مورفین (۱۰ ، ۵ ، ۲/۵ mg/kg, S.C)، پنج روز قبل از تزریق WIM55, 212-2 کاملا از بین رفت. سیستم کانابینوئیدی در هیپوکامپ پشتی سبب فراموشی شده و تزریق سه روزه مورفین ممکن است منجر به حساسیت رفتاری شده و از این طریق فراموشی ناشی از داروهای کانابینوئیدی را مهار نماید.

کلمات کلیدی: کانابینوئید، مورفین، هیپوکامپ پشتی، حساسیت رفتاری، یادگیری اجتنابی مهاری

مقدمه

کانابینوئیدها ترکیبات موجود در گیاه شاهدانه و آنالوگ های ساخته شده از مشتقات اسیدهای چرب به ویژه اسید آراشیدونیک می باشند. آثار اصلی کانابینوئیدها عبارتند از: کاهش حرکت۱، سختی حرکتی۲، کاهش دمای بدن۳، آثار ضد دردی٤. هزاران سال است که حشیش و ماری جوانا که هر دو از گیاه شاهدانه هندی با نام علمی Cannabis sativa بدست می‌آیند به علت آثار دارویی و حالات روانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. تا کنون دو گیرنده کانابینوئیدی CB1 وCB2 شناسایی شده اند که اغلب گیرنده های CB1 در سیستم عصبی مرکزی قرار دارند اما در بافت های محطیی نیز یافت می شود، در حالیکه گیرنده های CB2 فقط در بافت های محیطی قرار دارند

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

۲- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز

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

٤- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم ، دانشگاه تربیت معلم تهران

1 - hypolocomotion
2 - rigid immobility
3 - hypothermia
4 - antinociception

Archive of SID
www.SID.ir

(Chaperon , 1999). گیرنده های CB1 جزء گیرنده های متابوتروپیک سیستم عصبی مرکزی می باشد که به مقدار زیادی در نواحی از مغز که در یادگیری و حافظه نقش دارند مانند هیپوکامپ، کورتکس، عقده های قاعده ای و مخچه وجود دارند(Al-Hayani , 2002). (Wilson , 2002). کانابینوئیدها می توانند رهایش چندین میانجی عصبی را در قسمت های مختلف مغز مهار نمایند. در هیپوکامپ کانابینوئیدها با اثر بر روی گیرنده های کانابینوئیدی رهایش میانجی های مختلف مانند گلوتامات، استیل کولین، گاما آمینوبوتیریک اسید، دوپامین و نوراپی نفرین را کاهش می دهند(Al-Hayani, 2002) .

مطالعات کلینیکی و آزمایشگاهی نشان می دهد که مورفین نقش مهمی در یادگیری، حافظه و فرآیند توجه دارد (Bodnar and Hadjimarkou 2002). تزریق سیستمیک آگونیست گیرنده های اپیوئیدی باعث تخریب حافظه و یادگیری می شوند (Eidi, 2003; Zarrindast, Degroot, 20012002)، در حالی که آنتاگونیست گیرنده های اپیوئیدی باعث بهبود حافظه و یادگیری می شود (Bacciottini , 2001 ; Zarrindast , 2002).

مورفین، کوکائین و آمفتامین ها بعنوان داروهای محرک روانی مد نظر می باشند. تجویز مکرر این داروها و سپس قطع مصرف آنها به مدت چند روز باعث افزایش مزمن فعالیت حرکتی و خصوصیات انگیزشی می شود که این پدیده حساسیت رفتاری نامیده می شود و شامل افزایش پاسخ حرکتی و دیگر پاسخ های ناشی از گرفتن داروها می باشد (Robinson, 1993; Kaltvas 1991).

سیستم دوپامینی مزولیمبیک نورونهای دوپامینرژیک به ناحیه تگمنتوم شکمی هسته آکومبنس، آمیگدال، هیپوکامپ و کورتکس پره فرونتال می فرستد که سبب افزایش سطح دوپامین در هسته اکومبنس و ایجاد حساسیت رفتاری و پاداش می شود(Carelyzone and Wise 1996, Kelly and bridge 2002). در موش های صحرای تخریب هسته آکومبنس یا ناحیه تگمنتوم شکمی توسط داروی ٦- هیدروکسی دوپامین باعث مهار جلوگیری از ایجاد حساسیت رفتاری می شود ; (Clarke , 1988 Panagis , 1996 ; Louis & Clarke, 1998).اتانول نیکوتین و مورفین باعث افزایش سطح فعالیت نورونهای دوپامینرژیک مزولیمبیک می شود در نتیجه سطح دوپامین در هسته آکومبنس افزایش می یابد. (Benwell , 1992) و به کار بردن آنتاگونیست ها دوپامین قبل از تزریق داروی حساس کننده می تواند جلوی القای حساسیت را بگیرد(Clarke, 1988; Maldonado, 2006).

در این پژوهش آثار تزریق داروهای کانابینوئیدی به هیپوکامپ پشتی در موش های صحرایی که به طور مکرر با مورفین پیش تیمار شده اند مورد بررسی قرار گرفته است .

مواد و روش کار

در آزمایش ها از موش موش صحرایی نر نژاد ویستار به وزن تقریبی۲۵۰-۲۰۰ گرم که از انستیتو پاستور ایران تهیه می شد استفاده گردید. حیوان ها به حیوانخانه تحقیقاتی منتقل شده، در هر قفس ۵ سر موش قرار داده و آب و غذای کافی در اختیار موش ها قرار می گرفت و هر سه روز یکبار قفس موشها تمیز می شد. دمای در حیوانخانه بین۳ ± ۲۲ درجه سانتیگراد متغیر بود. قبل از جراحی به مدت یک هفته به موش ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوانخانه تطبیق دهند. در طول یک هفته به منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوانها Handling می شدند. هر حیوان فقط یک بار استفاده شده و در گروه هشت تایی قرار داده می شد. همه آزمایش ها در طول روز انجام می شد.

دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری (غیر فعال)[5] ، مدل Step-Through، از جعبه ایست که به وسیله دیواره ای به دو قسمت با اندازه یکسان (با ابعاد ۲۰×۲۰×۳۰ سانتی متر) تقسیم می شود. درون دیواره بین دو قسمت درب کشویی به ابعاد ۹× ۷ سانتی متر تعبیه شده است که می توان در موقع لزوم آن

[5] - inhibitory (passive) avoidanse apparatus

Archive of SID

www.SID.ir

را باز کرد. این دستگاه دارای بخش سفید رنگی می باشد که کف و دیواره های آن از جنس پلکسی گلاس غیرشفاف ساخته شده، فاقد هر گونه سقف بوده و توسط نور غیر مستقیم فلورسنت آفتابی روشن می شود. بخش دیگر دستگاه سیاه رنگ است در کف دارای میله های فولادی با فاصله یک سانتی متر بوده، که این میله ها توسط سیم رابطی به دستگاه تحریک کننده متصل می شوند و به این طریق عمل انتقال شوک الکتریکی به حیوانات مورد آزمایش را ممکن می سازند. باید آزمایش در اتاق باید نسبتا تاریک و بدون سر و انجام شود.

داروها

داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از WIN55, 212-2 و AM251 (تاکریس، آمریکا) و مورفین سولفات (تماد، ایران) که بلافاصله قبل از آزمایش ها داروی مورفین ٦ در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹درصد استریل حل گردید و داروهای WIN55, 212-2 و AM251 در محلول حاملی ۷ حل شدند که ۹۰ درصد آن سرم فیزیولوژیک استریل ۹/ درصد استریل و۱۰ درصد باقی مانده آن دی متیل سولفوکسید ۸ بود که سرانجام به محلول فوق یک قطره روغن توئین ۸۰ ۹ اضافه می شد.

جراحی وکانول گذاری در هیپوکامپ پشتی(CA1)

موش های صحرایی توسط تزریق کتامین هیدروکلراید ۱۰(۵۰ mg/kg) بعلاوه زیلزین۱۱ (٤ mg/kg) بی هوش می شدند. سپس در دستگاه استریوتاکسی قرار داده می شدند. دو کانول راهنمای (G ۲۲)۱۲ به صورت دو طرفه یک میلی متر بالاتر از محل تزریق بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون (۱۹۹۷) قرار داده می شود. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی برابر (V = -۳ ، ML = ±۲ ، AP = -۳/۲) می باشد (Paxinos , 1997). بعد از قرار دادن کانول ها در مختصات مورد نظر با استفاده از سیمان دندان پزشکی کانول های راهنما در جای خود محکم می شوند. برای جلوگیری از بسته شدن کانول های راهنما در طی آزمایش در داخل کانولهای راهنما کانول های(G ۲۷) قرار داده می شود. پس از جراحی و قبل از تزریق درون مغزی دارو به حیوان اجازه داده می شود ۵ تا ۷ روز دوره بهبودی پس از جراحی ۱۳ را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده به حالت عادی خود برگردد.

آزمون های رفتاری

روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه در موشهای صحرایی در دو روز متوالی هم انجام می شود. روز اول یا روز آموزش١٤ شامل آموزش دادن حیوان ها در دستگاه بوده، روز دوم یا روز آزمون۱۵ میزان حافظه حیوان های آموزش دیده بررسی می شود.

مرحله آموزش

در روش اجتنابی مهاری مدل Step-through، هر حیوان به آرامی در بخش روشن دستگاه قرار می گیرد، به مدت ۵ ثانیه به آن اجازه داده می شود به منظور آشنایی با محیط در این قسمت بماند. سپس به حیوان اجازه داده می شود وارد قسمت سیاه دستگاه شود بلافاصله بعد از ورود حیوان به خانه سیاه درب کشویی بسته شده و حیوان از دستگاه خارج شده و به آرامی به قفس برگردانده می شود. موش هایی که در این مرحله بیشتر از ۱۲۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک تاخیر داشته باشند حذف می شدند. پس از گذشت ۳۰ دقیقه

6- morphine
7- vehicle
8- dimethylsulfoxide
9- tween80
10- ketamine hydrochloride
11- xylazine
12- gauge
13- recovery
14- training day
15- testing day

Archive of SID
www.SID.ir

این حیوان دوباره به بخش سفید دستگاه منتقل شده و بعد از ۵ ثانیه درب کشویی باز می شد تا حیوان وارد بخش تاریک شود. با ورود حیوان به بخش تاریک، درب کشویی پشت سرحیوان بسته شده، حیوان تحریک الکتریکی با شدت یک میلی آمپر و به مدت ۳ ثانیه، که توسط دستگاه تحریک کننده به میله های فولادی کف بخش تاریک منتقل می شود، را دریافت می کرد. ۲۰ ثانیه پس از پایان تحریک حیوان از دستگاه خارج شده، به قفس مربوطه منتقل می شود. پس از گذشت ۲ دقیقه مرحله دوم آموزش روی حیوان شوک گرفته انجام شده در این مرحله نیز موش مانند دفعات قبل به خانه سفید دستگاه منتقل شده و درب کشویی باز شده و میزان تاخیر ورودش به بخش تاریک دستگاه ثبت می گردد. تاخیر ۱۲۰ ثانیه ای در ورود به بخش سیاه دستگاه که به عنوان یادگیری موفق[16] برای حیوان ثبت می گردد، حیوان از دستگاه خارج شده، بلافاصله تزریق پس از آموزش[17] را دریافت می کند. در صورت تاخیر کمتر از۱۲۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک پس از ورود درب کشویی دستگاه بسته پشت سرش بسته شده، حیوان برای بار دوم شوک دریافت می کند. پس از خارج کردن حیوان از دستگاه و سپری شدن ۲ دقیقه حافظه حیوان همانند دوره قبل دوباره مورد امتحان قرار می گیرد. در صورت کسب یادگیری موفق حیوان از دستگاه خارج شده، تزریق بعد از آموزش را دریافت می کند. حداکثر آموزش برای هر موش سه بار در نظر گرفته شد.

مرحله آزمون یا بررسی حافظه

در جلسه آزمون که ۲٤ ساعت پس از مرحله آموزش انجام می شود در جلسه آزمون تحریک الکتریکی اعمال نمی شود. برای بررسی حافظه، هر موش پس از دریافت تزریق قبل از آزمون، همانند روز اول، در بخش روشن دستگاه قرار گرفته، درب کشویی بعد از ۵ ثانیه باز شده، زمان تاخیر حیوان در ورود به بخش تاریک دستگاه به عنوان معیاری برای بررسی میزان حافظه در نظر گرفته می شود. بیشترین مقدار تاخیر برای ورود به بخش تاریک که به عنوان حافظه کامل شناخته می شود ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می شود.

تزریق درون مغزی دارو

برای تزریق دارو از کانول(G ۲۷) دندانپزشکی به طول ۱۱ میلی متر، (یک میلی متر بزرگ تر از کانول راهنما) به منظور دسترسی دقیق به CA1 و جلوگیری از آسیب آن استفاده شد. این سر سوزن به کت دان تیوپ[18] نوزاد (شماره ٤) متصل می باشد. برای تزریق از سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتر استفاده شد. در مرحله تزریق پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن G ۲۷ دندانپزشکی در داخل کانول راهنما G ۲۲ قرار داده شده، در هر کانول ۰/۵ ۰میکرولیتر دارو در مدت ۹۰-٦۰ ثانیه تزریق می شد. این زمان به منظور کسب اطمینان از ورود دارو به مغز و جلوگیری از خروج آن از کانول راهنما در نظر گرفته می شود. مجموع حجم تزریق درون مغزی به هر موش ۱ میکرولیتر است. در طول تزریق به حیوان اجازه داده می شود بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

بافت شناسی

پس از کشتن حیوان ها توسط کلروفرم با تزریق رنگ متیلن بلو ۱ ٪ (۰/۵ µl) به درون هر دو کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده، به منظور جلوگیری و سفت شدن بافت ها درون فرمالین ۱۰ درصد قرار می گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش هایی داده شده، محل ورود کانول به مغز به وسیله لوپ مورد مطالعه قرار می گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس و واتسون استفاده می شد.

[16]- successful learning
[17]- post-training
[18]- cat down tupe

Archive of SID
www.SID.ir

تجزیه و تحلیل آماری

در همه آزمایش های توضیح داده شده میزان تاخیر ورود حیوان به خانه سیاه در روز آزمون به عنوان ملاک حافظه در نظر گرفته شده، نمره هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد(Mean ± S.E.M)ثبت می گردید. هم چنین تعداد آموزش هر حیوان نیز در روز آموزش نیز ثبت گردید. به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه ها آزمایش، از روش تحلیل واریانس۱۹یکطرفه و آزمون توکی20 استفاده گردید. اختلاف در سطح$P<0.05$ به عنوان تفاوت معنا دار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد .

تیمارهای دارویی و آزمایشهای انجام شده

۱- آزمایش اول:بررسی تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر روی حافظه اجتنابی مهاری

پنج گروه حیوان در این آزمایش بکار رفت. گروه اول و دوم بلافاصله پس از آموزش سالین و حامل را به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کردند. سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف WIN55, 212-25 (۰/۵ µg/rat ، ۰/۲۵ ، ۰/۱) را بلافاصله پس از آموزش به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کردند. ۲٤ ساعت پس از آموزش در روز آزمون میزان حافظه مهاری اجتنابی گروه های مختلف حیوانی مورد مطالعه و اندازه گیری قرار گرفت.

۲- آزمایش دوم: بررسی تاثیر تزریق پس از آموزش AM251 بر روی حافظه اجتنابی مهاری.

در این آزمایش چهار گروه حیوان بکار رفت. گروه اول بلافاصله پس از آموزش حامل را به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کرد. سه گروه باقی مانده مقادیر مختلف AM251 (۱۰۰ ng/rat و ۵۰، ۲۵) را بلافاصله پس از آموزش به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کردند.۲٤ ساعت بعد از آموزش در روز آزمون میزان حافظه مهاری اجتنابی گروههای مختلف حیوانی مورد مطالعه و اندازه گیری قرار گرفت.

۳- آزمایش سوم : بررسی تاثیر تزریق درون مغزی AM251 بر حافظه اجتنابی تخریب شده ناشی از WIN55, 212-2.

در این آزمایش پنج گروه حیوان به کار رفت. گروه اول بلافاصله پس از آموزش حامل را به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کرد. چهار گروه باقی مانده حامل و مقادیر مختلف AM251 (۱۰۰ ng/rat و ۵۰، ۲۵ ، ۰) را بلافاصله پس از آموزش به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کردند. ۲ دقیقه پس از تزریق اول این چهار گروه مقدار موثر WIN55, 212-2 (۰/۵ µg/rat) را به صورت درون مغزی دریافت کردند. ۲٤ ساعت پس از آموزش در روز آزمون میزان حافظه مهاری اجتنابی گروههای مختلف حیوانی مورد مطالعه و اندازه گیری قرار گرفت.

٤- آزمایش چهارم: بررسی تاثیر پیش تیمار مکرر با مورفین بر حافظه اجتنابی تخریب شده ناشی از WIN55, 212-2.

در این آزمایش، مطابق حساسیت القاء شده توسط مورفین، حیوانات سالین (۱ ml/kg) یا مورفین (۲/۵ mg/kgو ۵، ۱۰) را روزانه یکبار، در سه روز متوالی به صورت زیر جلدی (SC) دریافت کردند. پنج روز بعد، حیوانات بلافاصله پس از آموزش حامل (۱ µl/rat) یا WIN55,212-2 (۰/۵ µg/rat) را به صورت درون مغزی دریافت کردند. ۲٤ ساعت پس از آموزش در روز آزمون میزان حافظه مهاری اجتنابی گروههای مختلف حیوانی مورد مطالعه و اندازه گیری قرار گرفت.

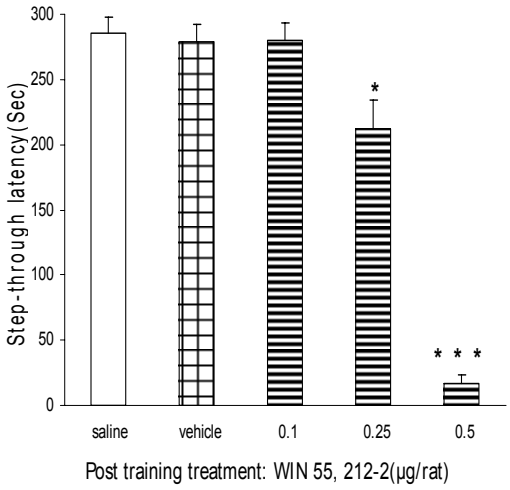
نتایج

۱-آزمایش اول: نتایج تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر روی حافظه اجتنابی مهاری

در شکل ـ ۱ ارائه شده است. آزمون واریانس یکطرفه نشان داد WIN55, 212-2 حافظه اجتنابی مهاری را تغییر می دهد [$F_{(٤،٣٥)}=٦٣/٣$، $p<٠/٠٠١$] تحلیل توکی نشان داد که WIN55, 212-2 (۰/۵ µg/rat, intra-CA1 و ۰/۲۵) میزان حافظه را کاهش داد.]

[19]- ANOVA
[20]- Tukey ś test

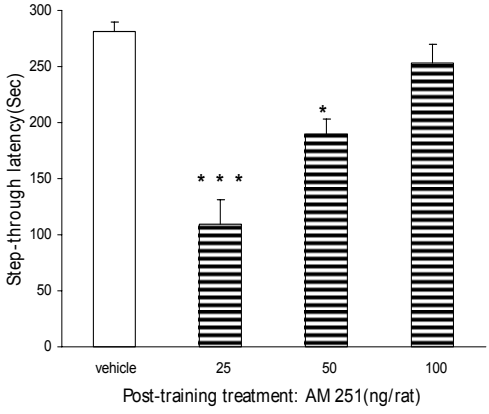
Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۱ : آثار تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر حافظه اجتنابی مهاری . ۰/۰۵ >P*و ۰/۰۰۱ >P* در مقایسه با گروه سالین می باشد**

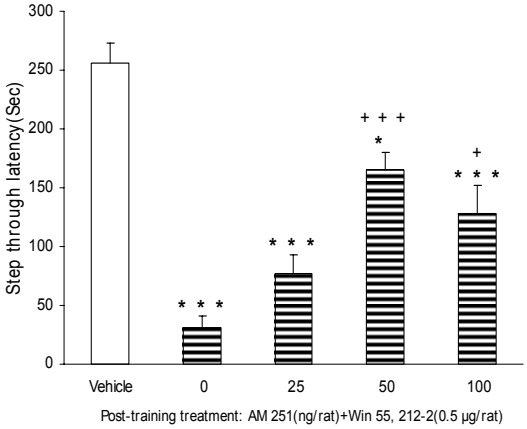
۲-آزمایش دوم : نتایج تزریق پس از آموزش AM251 بر روی حافظه اجتنابی مهاری

در شکل-۲ ارائه شده است. آزمون واریانس یکطرفه نشان داد که تزریق AM251 (ng/rat, intra-CA1 ۱۰۰ و ۵۰، ۲۵) حافظه اجتنابی مهاری را تغییر می دهد [p < ۰/۰۰۱ =۲۲/۹، F (۳،۲۸)]. تحلیل توکی نشان داد که AM251 (ng/rat, intra-CA1 ۵۰ و ۲۵) میزان حافظه را کاهش داد.



شکل ۲ : آثار تزریق پس از آموزش AM251 بر روی حافظه اجتنابی مهاری . ۰/۰۵ >P*و ۰/۰۰۱ >P* در مقایسه با گروه حامل می باشد**

۳- آزمایش سوم : نتایج تزریق درون مغزی AM251 بر حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2 در شکل -۳ ارایه شده است. تحلیل توکی نشان داد که تزریق مقادیر مختلف AM251 (ng/rat ۱۰۰ و ۵۰، ۲۵)، ۲ دقیقه قبل از تزریق مقدار موثر WIN55, 212-2 (µg/rat ۰/۵) در هیپوکامپ پشتی (CA1) اثر تخریبی WIN55, 212-2 بر روی حافظه اجتنابی را مهار نمی کند [۰/۰۰۱ < p، ۲۵/٦ = F (٤،۳۵)].



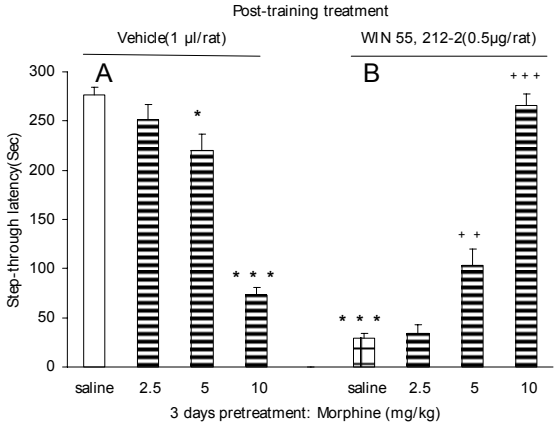
شکل ۳: اثر تزریق AM251 بر حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2. ۰/۰۵ >P*، ۰/۰۰۱ >P* در مقایسه با گروه حامل و ۰/۰۵ >P+، ۰/۰۰۱ >P+++ در مقایسه با گروه WIN55, 212-2**

٤- آزمایش چهارم: نتایج تزریق سه روزه مورفین بر حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2 در شکل -٤ ارایه شده است. تحلیل مکمل توکی نشان داد تزریق روزانه مورفین(mg/kg ۲/۵ و ۵ ، ۱۰) طی سه روز متوالی و پنج روز قطع دارو سبب تخریب حافظه اجتنابی می شود. همه حیوانات بلافاصله پس از آموزش حامل (ml/rat ۱) را به صورت درون مغزی دریافت کردند [۰/۰۰۱ > p، ۵۱/۲٤ = F (۲۸،۳)](شکل A).

تحلیل واریانس یکطرفه نشان داد که حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2 در موش هایی که تزریق روزانه یکبار مورفین (mg/kg ۲/۵ و ۵ ، ۱۰) را به مدت سه روز متوالی دریافت کردند و پنج روز هیچ دارویی دریافت نکردند به طور معناداری کاهش یافته است [۰/۰۰۱ > p

Archive of SID
www.SID.ir

، ۹٤/٤ = (۲۸،۳) F]. آزمون توکی نشان داد که مقادیر مختلف مورفین (۲/۵ mg/kg و ۵ ، ۱۰) قادر به اصلاح حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2 می باشند (شکل B).



شکل ٤ : اثر پیش تیمار با مورفین بر حافظه اجتنابی مهاری در غیاب (شکل A ٤) و حضور WIN55, 212-2 (شکل B ٤) . ۰/۵ >P*، ۰/۰۰۱ >P* در مقایسه با گروه سالین و ۰/۰۱ >P++، ۰۰۱ ۰/ >P+++ در مقایسه با گروه WIN55, 212-2**

بحث

در این پژوهش آثار تزریق داروهای کانابینوئیدی در هیپوکامپ پشتی (CA1) برروی حافظه موش های صحرایی حساس شده با مورفین به روش اجتنابی مهاری (غیر فعال) بااستفاده از مدل Step-through بررسی شد. روش اجتنابی مهاری با استفاده از مدل Step-through یک روش مورد قبول برای بررسی حافظه دراز مدت می باشد (Vianna , 1999). مطابق با مطالعات گذشته نتایج مطالعات ما نیز نشان می دهد که تزریق درون مغزی مقادیر مختلف WIN55, 212-2 بلافاصله بعد از آموزش به صورت وابسته به مقدار به کاهش حافظه اجتنابی مهاری در روز آزمون منجر می شود(Hernandez , 2000) .

مطالعات نشان می دهند که آگونیست گیرنده های کانابینوئیدی باعث مهار تقویت طولانی (LTP) ۲۱ و تخریب حافظه می شوند.

مطالعات زیادی نشان می دهند که مورفین در مغز نقش مهمی در یادگیری و حافظه دارد (Ye , 2001). مورفین در مزولیمبیک و تداخل اثر آن با سیستم دوپامینی و استطاله هایی که نورونهای اپیوئیدرپژیک به هیپوکامپ می فرستند نیز نقش مهمی در اعمال شناختی دارد. در حالی که نورون های موجود در شبکه داخلی هیپوکامپ یعنی نورون های بین شکنج دندانه ای و ناحیه CA1 هیپوکامپ پشتی و از ناحیه CA1 به CA3 گلوتاماتی می باشند اما نورون هایی که از ناحیه مزولیمبیک به هیپوکامپ می آیند اپیوئیدرژیک می باشند ،تحریک رهایش دوپامین انتقال پیام عصبی به هیپوکامپ را کاهش داده و به واسطه مهار رهایش گلوتامات در هیپوکامپ انتقال پیام عصبی در هیپوکامپ را کاهش می دهد (Davies , 2002). بنابراین ممکن است که WIN55, 212-2 به واسطه کاهش رهایش استیل کولین و گلوتامات در هیپوکامپ باعث تخریب حافظه شود.

علاوه بر موارد گفته شده احتمالا WIN55, 212-2 از طریق مکانیسم های زیر باعث کاهش حافظه می شود : (۱)- گیرنده های CB1 در غشاء پیش سیناپسی پایانه های آکسونی نورون های گابائرژیگ به کاهش آزادسازی گابا منجر شده، این امر باعث فعالیت بیش از حد نورون ها شده ، تداخل نورونی به وجود می آید(Katona , 1999). (۲)- کاهش رهایش گابا به موازات کاهش رهایش کوله سیستوکینین۲۲ است (Beinfeld , 2001). مطالعات گسترده نشان می دهند که مهار کردن گیرنده کوله سیستو کینین به خرابی حافظه منجر می شود(Harro , 1993).(۳)- فعال شدن گیرنده CB1 احتمالاً از طریق مهار انتقال پیام های تحریکی باعث تخریب حافظه می شود (Bloom

21- long term potentiation
22 - Colecystokinine(cck)

Archive of SID
www.SID.ir

(1997, (٤)- تزریق حاد مواد کانابینوئیدی در هیپوکامپ فعالیت عمومی نورون ها را کاهش می دهد(Bloom ,1997) . تعیین نقش واقعی این مکانیسم ها در تخریب حافظه نیازمند تحقیقات بیشتری است.

گزارش هایی وجود دارد که نشان می دهد که آنتاگونیست گیرنده های CB1 باعث بهبود حافظه می شود (Lichtman , 2000 ; Takahashi , 2005) . بیشتر این مطالعات آثار سیستمیک آنتاگونیست های کانابینوئیدی را به طور کلی مورد مطالعه قرار داده اند در حال که آنتاگونیست های مختلف کانابینوئیدی آثار شناختی متنوعی را در بخش های مختلف مغز می توانند ایجاد کنند (de Oliveira Alvares , 2005). در مطالعه حاضر تزریق درون مغزی آنتاگونیست اختصاصی CB1، AM251 در هیپوکامپ پشتی بلافاصله بعد از آموزش به کاهش حافظه اجتنابی مهاری در روز آزمون منجر شد. نتایج بدست آمده در این تحقیق موافق با نتایج تحقیقاتی می باشد که بیان می دارند که کاربرد AM251 به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ باعث فراموشی می شود (de Oliveira Alvares , 2005). بعلاوه تحقیقات نشان داده است که AM251 قادر به مهار تقویت طولانی مدت (LTP) در هیپوکامپ می باشد (Carlson , 2002; Chevaleyre , 2003; Alvares , 2005)، مهار LTP توسط AM251 به واسطه اثر بر روی نورون های گابائرژیک صورت می گیرد، این نورون های گابائرژیک نیز بر روی عملکرد نورون های گلوتاماتی اثر می نمایند. از طرف دیگر به نظر می رسد که اندوکانابینوئیدها به عنوان یک تنظیم کننده طبیعی در هیپوکامپ پشتی عمل می نماید و در تغییر شکل سیناپسی نقش دارد و فراموشی القاء شده توسط AM251 به نظر می رسد ناشی از حذف عملکرد این تنظیم کننده طبیعی در هیپوکامپ می باشد (de Oliveira Alvares , 2005).

در آزمایش دیگر آثار تزریق درون مغزی مقادیر مختلف AM251 برروی تخریب حافظه توسط WIN55, 212-2 بررسی شد. نتایج ما نشان داد که تزریق درون مغزی مقادیر مختاف AM251 بلافاصله بعد از آموزش و ۲ دقیقه قبل از تزریق درون مغزی مقدار موثر WIN55, 212-2 قادر به اصلاح حافظه تخریب شده با WIN55, 212-2 نیست. این نتایج نشان دهنده این مطلب می باشند که WIN55, 212-2 بخشی از آثار خود را در القای فراموشی از طریق گیرنده هایی غیر از گیرنده CB1 اعمال می نماید . در تایید این موضوع مطالعات دیگری بیان کننده وجود احتمال گیرنده کانابینوئیدی جدیدی است که آنتاگونیست انتخابی CB1 بر روی آن اثری ندارد (Hoffman , 2000 ; Hajos , 2000 ; Hajos , 2001).

در آزمایش بعدی نشان داده شده است که پیش تیمار مکرر موش های صحرای با مورفین که توسط تزریق روزانه یکبار مورفین(mg/kg ۱۰و ۵ ، ۲/۵) به مدت سه روز و سپس پنج روز عدم دریافت دارو صورت گرفته بود، به تنهایی سبب کاهش حافظه اجتنابی مهاری می شود. اما پیش تیمار حیوانات با مورفین(mg/kg ۱۰و ۵ ، ۲/۵)می تواند حافظه تخریب شده توسط تزریق درون مغزی WIN55, 212-2 به داخل هیپوکامپ پشتی را اصلاح نموده و به حالت عادی برگرداند. بنابراین تزریق مزمن مورفین می تواند بازخوانی حافظه در موش های صحرایی که بلافاصله بعد از آموزش به صورت درون مغزی در داخل هیپوکامپ پشتی WIN55, 212-2 را دریافت نموده اند تقویت نمایند. مطالعات نشان می دهند که تزریق مکرر بعضی از داروها می تواند باعث ایجاد حساسیت رفتاری شود (Benwell , 1992) . مطالعات زرین دست و همکارانش نشان می دهد فراموشی القاء شده توسط مورفین توسط حساسیت با مورفین برگردانده می شود (Zarrindast , 2004). مطالعه حاضر نشان می دهد که پیش تیمار موش های صحرایی با مورفین احتمالاً به واسطه ایجاد حساسیت به مورفین تخریب حافظه ایجاد شده توسط WIN55, 212-2 را اصلاح نموده و به حالت عادی برمی گرداند . در این فرآیند بازگشت حافظه توسط پیش تیمار مکرر مورفین مکانیسم های دوپامینرژیک و یا اپیوئیدرژیک می تواند دخیل باشد. در مجموع می توان گفت که پیش تیمار با مورفین به صورت مزمن می تواند اثر داروهای کانابینوئیدی

Archive of SID

www.SID.ir

در هیپوکامپ پشتی را تغییر می دهد، پیش تیمار مکرر با مورفین ممکن است به واسطه ایجاد حساسیت رفتاری باعث تغییر اثر داروهای کانابینوئیدی در هیپوکامپ پشتی شود .

تشکر

بدین وسیله از زحمات همه افرادی که به نوعی ما را در انجام این تحقیق همکاری کرده اند ، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

Al-Hayani, A., & Davies, S. N. (2002). Effect of cannabinoids on synaptic transmission in the rat hippocampal slice is temperature-dependent. Eur J Pharmacol, 442(1-2), 47-54.

Bacciottini, L., Passani, M. B., Mannaioni, P. F., & Blandina, P. (2001). Interactions between histaminergic and cholinergic systems in learning and memory. Behav Brain Res, 124(2), 183-194.

Beinfeld, M. C., & Connolly, K. (2001). Activation of CB1 cannabinoid receptors in rat hippocampal slices inhibits potassium-evoked cholecystokinin release, a possible mechanism contributing to the spatial memory defects produced by cannabinoids. Neurosci Lett, 301(1), 69-71.

Benwell, M. E., & Balfour, D. J. (1992). The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. Br J Pharmacol, 105(4), 849-856.

Bloom AS, Tershner S, Fuller SA, Stein EA (1997) Cannabinoid-induced alterations in regional cerebral blood flow in the rat. Pharmacol Biochem Behav 57: 625-31

Bodnar RJ, Hadjimarkou MM, (2001) endogeneous opiates and behavior. Peptides, 23: 2307-2365

Carlezon Jr., W.A., Wise, R.A., 1996. Microinjections of phencyclidine (PCP) and related drugs into nucleus accumbens shell potentiate medial forebrain bundle brain stimulation reward. Psychopharmacology (Berl.) 128, 413–420.

Carlson, G., Wang, Y., & Alger, B. E. (2002). Endocannabinoids facilitate the induction of LTP in the hippocampus. Nat Neurosci, 5(8), 723-724.

Chaperon, F., & Thiebot, M. H. (1999). Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. Crit Rev Neurobiol, 13(3), 243-281.

Chevaleyre, V., & Castillo, P. E. (2003). Heterosynaptic LTD of hippocampal GABAergic synapses: a novel role of endocannabinoids in regulating excitability. Neuron, 38(3), 461-472.

Clarke, P. B., Fu, D. S., Jakubovic, A., & Fibiger, H. C. (1988). Evidence that mesolimbic dopaminergic activation underlies the locomotor stimulant action of nicotine in rats. J Pharmacol Exp Ther, 246(2), 701-708.

de Oliveira Alvares, L., de Oliveira, L. F., Camboim, C., Diehl, F., Genro, B. P., Lanziotti, V. B., et al. (2005). 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, 83(2), 119-124.

de Oliveira Alvares, L., de Oliveira, L. F., Camboim, C., Diehl, F., Genro, B. P., Lanziotti, V. B., et al. (2005). 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, 83(2), 119-124.

Degroot, A., & Parent, M. B. (2001). Infusions of physostigmine into the hippocampus or the entorhinal cortex attenuate avoidance retention deficits produced by intra-septal infusions of the GABA agonist muscimol. Brain Res, 920(1-2), 10-18.

Archive of SID

www.SID.ir

terminals of specific hippocampal interneurons. J Neurosci, 19(11), 4544-4558.

Lichtman, A. H. (2000). SR 141716A enhances spatial memory as assessed in a radial-arm maze task in rats. Eur J Pharmacol, 404(1-2), 175-179.

Louis, M., & Clarke, P. B. (1998). Effect of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on the locomotor stimulant action of nicotine in rats. Neuropharmacology, 37(12), 1503-1513.

Maldonado, R., Valverde, O., Berrendero, F., 2006. Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. Trends Neurosci. 29, 225–232.

Panagis, G., Nisell, M., Nomikos, G. G., Chergui, K., & Svensson, T. H. (1996). Nicotine injections into the ventral tegmental area increase locomotion and Fos-like immunoreactivity in the nucleus accumbens of the rat. Brain Res, 730(1-2), 133-142.

Paxinos, G., & Watson, C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates
San Diego: Academic Press.

Robinson, T. E., & Berridge, K. C. (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. Brain Res Brain Res Rev, 18(3), 247-291.

Takahashi, R. N., Pamplona, F. A., & Fernandes, M. S. (2005). The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. Neurosci Lett, 380(3), 270-275.

Vianna, M. R., Izquierdo, L. A., Barros, D. M., Medina, J. H., & Izquierdo, I. (1999). Intrahippocampal infusion of an inhibitor of protein kinase A separates short- from long-term memory. Behav Pharmacol, 10(2), 223-227.

Eidi, M., Zarrindast, M. R., Eidi, A., Oryan, S., & Parivar, K. (2003). Effects of histamine and cholinergic systems on memory retention of passive avoidance learning in rats. Eur J Pharmacol, 465(1-2), 91-96.

Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1997). Central cholinergic systems and cognition. Annu Rev Psychol, 48, 649-684.

Gifford, A. N., Tang, Y., Gatley, S. J., Volkow, N. D., Lan, R., & Makriyannis, A. (1997). Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. Neurosci Lett, 238(1-2), 84-86.

Hajos, N., Katona, I., Naiem, S. S., MacKie, K., Ledent, C., Mody, I., et al. (2000). Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations. Eur J Neurosci, 12(9), 3239-3249.

Hajos, N., Ledent, C., & Freund, T. F. (2001). Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus. Neuroscience, 106(1), 1-4.

Harro, J., Westerling, P., & Oreland, L. (1993). CCKB receptor activation reduces glutamate-induced depolarization in slices of rat cerebral cortex. J Neural Transm Gen Sect, 93(1), 61-66.

Hoffman, A. F., & Lupica, C. R. (2000). Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. J Neurosci, 20(7), 2470-2479.

Kalivas, P. W., & Stewart, J. (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. Brain Res Brain Res Rev, 16(3), 223-244.

Katona, I., Sperlagh, B., Sik, A., Kafalvi, A., Vizi, E. S., Mackie, K., et al. (1999). Presynaptically located CB1 cannabinoid receptors regulate GABA release from axon

Archive of SID
www.SID.ir

Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. Science, 296(5568), 678-682.

Ye, L., Qi, J. S., & Qiao, J. T. (2001). Long-term potentiation in hippocampus of rats is enhanced by endogenous acetylcholine in a way that is independent of N-methyl-D-aspartate receptors. Neurosci Lett, 300(3), 145-148.

Zarrindast, M. R., Bakhsha, A., Rostami, P., & Shafaghi, B. (2002). Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. J Psychopharmacol, 16(4), 313-319.

Zarrindast, M. R., & Rezayof, A. (2004). Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. Eur J Pharmacol, 497(2), 197-204.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir