

## تداخل گیرنده های آلفا-۱- آدرنرژیک هیپوکامپ یشتی با اثرات WIN55,212-2 بر روی به خاطر آوری حافظه اجتنابی، مهاری

اعظم مشفق<sup>۱</sup>، پروین بابایی<sup>۲</sup>، مرتضی پیری<sup>۳\*</sup>، شهربانو عریان<sup>۱</sup>، بهرام سلطانی<sup>۴</sup>، محمدرضا زرین دست<sup>۴</sup>

گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران. <sup>۱</sup>مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، گیلان، ایران. <sup>۲</sup>گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران. <sup>۳</sup>گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز ملی مطالعات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۹/۱۸، تاریخ پذیرش: ۸۹/۲/۸

### Involvement of dorsal hippocampal $\alpha 1$ -adrenergic receptors in the effect of WIN55, 212-2 on memory retrieval in inhibitory avoidance task

Moshfegh A.<sup>1</sup>, Babaei P.<sup>2</sup>, Piri M.<sup>3\*</sup>, Oryan Sh.<sup>1</sup>, Soltani B.<sup>2</sup>, Zarrindast M.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Sciences and Research Campus, Islamic Azad University, Tehran, Iran. <sup>2</sup>Cellular and Molecular Research Center, Guilan University of Medical Sciences, Guilan, Iran. <sup>3</sup>Department of Biology, Islamic Azad University, Ardabil branch, Ardabil, Iran. <sup>4</sup>Department of Pharmacology, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 9 Dec. 2009, Accepted: 28 Apr. 2010

**Objective:** The present study evaluated the possible role of  $\alpha 1$ -adrenergic receptors of the dorsal hippocampus on WIN55, 212-2 induced amnesia and WIN55, 212-2 state-dependent memory in adult male Wistar rats. **Methods:** In this study Phenylephrine as agonist and prazosin as antagonist of  $\alpha 1$ -adrenergic receptor, WIN55, 212-2 as agonist of cannabinoid receptor was used. The animals were bilaterally implanted with chronic cannulae in the CA1 regions of the dorsal hippocampus, trained in a step-down type inhibitory avoidance task, and tested 24 h after training to measure step-down latency. **Results:** post-training intra-CA1 administration of WIN55, 212-2 (0.25 and 0.5  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) impaired the memory retrieval. Amnesia produced by post-training WIN55, 212-2 (0.5  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) was reversed by pre-test administration of the same dose of WIN55, 212-2 that is due to a state-dependent effect. Pre-test intra-CA1 injection of phenylephrine (0.5 and 0.75  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) improved post-training WIN55, 212-2 (0.5  $\mu\text{g}/\text{rat}$ )-induced retrieval impairment. On the other hand, pre-test injection of prazosin prevented the restoration of memory by pre-test WIN55, 212-2. It is important to note that pre-test intra-CA1 administration of the same doses of prazosin or phenylephrine, alone did not affect memory retrieval. **Conclusion:** These results suggest that  $\alpha 1$ -adrenergic receptors of the dorsal hippocampal CA1 regions may play an important role in WIN55, 212-2 state-dependent memory.

**Keywords:** WIN55, 212-2; Phenylephrine; Prazosin; Dorsal hippocampus; State dependent learning.

**زمینه و هدف:** در این مطالعه نقش گیرنده های آلفا-۱- آدرنرژیک هیپوکامپ یشتی در فراموشی القاء شده با WIN55,212-2 و یادگیری وابسته به وضعیت WIN55,212-2 در رت های نر بالغ مورد بررسی قرار گرفته است. **روشها:** در این مطالعه از فنیل افرین به عنوان آگونیست و پرازوسین به عنوان آنتاگونیست گیرنده آلفا-۱-آدرنرژیک و از WIN55,212-2 به عنوان آگونیست گیرنده های کانابینوئیدی استفاده شده است. کانونل گذاری دو طرفه در ناحیه CA1 هیپوکامپ یشتی انجام شد و موش ها در دستگاه یادگیری اجتنابی مدل step-down آموزش داده شدند. ۲۴ ساعت بعد از آموزش تأخیر حیوانات در پایین آمدن از سکو اندازه گیری شد. **یافته ها:** تزریق پس از آموزش WIN55,212-2 (۰/۰۲۵/۵  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) به هیپوکامپ یشتی باعث تخریب حافظه می شود. فراموشی القاء شده با تزریق پس از آموزش WIN55,212-2 (۰/۵  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) با تزریق همان مقدار WIN55,212-2 قبلاً از آزمون اصلاح شد، که به این دیده یادگیری وابسته به وضعیت گفته می شود. تزریق فنیل افرین (۰/۰۵/۷۵  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) در روز آزمون بازگشت حافظه تخریب شده با WIN55,212-2 روز آموزش را بهبود می بخشد، از سوی دیگر تزریق پرازوسین (۰/۵  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) در روز آزمون، جلوی بازگشت حافظه با WIN55,212-2 روز آزمون را می گیرد. توجه به این نکته حائز اهمیت می باشد که تزریق همپسین مقادیر فنیل افرین و پرازوسین به تنهایی اثری بر روی حافظه ندارد. **نتیجه گیری:** این مشاهدات نشان می دهد که گیرنده های آلفا-۱- آدرنرژیک هیپوکامپ یشتی نقش مهمی در یادگیری وابسته به وضعیت WIN55,212-2 بر عهده دارند.

**واژه های کلیدی:** WIN55,212-2، فنیل افرین، پرازوسین، هیپوکامپ یشتی، یادگیری وابسته به وضعیت.

\*Corresponding Author: Morteza Piri, Instructor, Medical faculty, Islamic Azad University, Basij Sq., Ardabil, Iran. Tel: +98-912-2543585; Fax: +98-451-7727905; E-mail: biopiri@iauardabil.ac.ir

\*نویسنده مسئول: مرتضی پیری، مربی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل، ایران، تلفن: ۰۴۵۱-۷۷۲۷۹۰۵، نمابر: ۰۹۱۲-۲۵۴۳۵۸۵

## ۱- مقدمه

عصب دهی می نماید، به صورت معنی داری اثرات کاتالپتیکی، کانابینوئیدها را کاهش می دهد (۱۵). بنابراین بر اساس یافته های فوق در این مطالعه برای اولین بار اثر تزریق دو طرفه ی آگونست ها و آنتاگونیست های گیرنده های آلفا-۱- آدرنژیک بر روی فراموشی القا شده با WIN55,212-2 و یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با WIN55,212-2 مورد بررسی قرار می گیرد. تا وجود برهمکنش بین کانابینوئیدها و گیرنده های آلفا-۱- آدرنژیک و نحوه این برهمکنش مشخص گردد. باید توجه داشت که فرآیند شکل گیری حافظه دارای مراحل به رمز در آوردن ۱، تثبیت ۲، ذخیره سازی ۳ و به خاطر آوری ۴ می باشد و در طی این مراحل مختلف میانجی های عصبی مختلف درگیر می باشد. در مطالعه حاضر چون تزریق داروهایی که باعث اصلاح حافظه تخریب شده با WIN55,212-2 شده اند، پنج دقیقه قبل از آزمون صورت گرفته است، بنابراین بررسی اثر داروها بر روی مرحله به خاطر آوری اطلاعات ذخیره شده در حافظه مد نظر بوده است.

## ۲- مواد و روشها

## ۲-۱: حیوان ها

در آزمایش ها از موش صحرایی نر نژاد ویستار ( وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم ) که از انستیتو پاستور ایران تهیه می شد استفاده گردید. در طول آزمایش ها آب و غذای کافی در اختیار موش ها قرار می گرفت و دمای حیوانخانه بین  $3 \pm 22$  درجه سانتیگراد متغیر بود. موش ها در گروه های هشت تایی قرار داده می شد.

## ۲-۲: دستگاه یادگیری اجتنابی مدل Step-down

دستگاه یادگیری اجتنابی مهارتی (غیر فعال)<sup>۵</sup>، مدل Step-down، از جعبه چوبی به ابعاد (۴۰ x ۳۰ x ۴۰ cm) می باشد. کف دستگاه دارای میله های فولادی با قطر ۰/۳ سانتی متر و به فاصله ۱ سانتی متر از یکدیگر می باشد. یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد (۷ x ۱۰ x ۱۲ cm) در گوشه چپ کف دستگاه (روی میله های فلزی) قرار گرفته است، این میله ها به دستگاه تحریک کننده متصل شده و شوک الکتریکی از طریق این میله ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می شود.

## ۲-۳: داروها

داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از WIN55,212-2 (تاکریس، آمریکا)، فنیل افرین و پرازوسین (سیگما، آمریکا)

کانابینوئیدها جزء ترکیبات مقلد حالات روانی می باشند که اثرات گسترده ای را در تعداد زیادی از گونه های حیوانی ایجاد می نماید. مطالعات نشان می دهد که کانابینوئیدها اثرات فیزیولوژیکی خود را با برهمکنش با گیرنده های کانابینوئیدی که شامل گیرنده های CB1، CB2 و CB3 می باشند، اعمال می نمایند. گیرنده CB1 به طور گسترده در نواحی مختلف مغز بیان می شود، هر چند در برخی از بافت های محیطی نیز یافت می شود. گیرنده CB2 به صورت اصلی در سیستم ایمنی بیان می شود، هر چند تحقیقات اخیر نشان می دهند که این گیرنده در مغز پستانداران نیز یافت می شود (۱). از طرف دیگر حضور گیرنده CB3 توسط آزمایشاتی که نشان می دهند برخی از اثرات کانابینوئیدها از طریق گیرنده های CB1 و CB2 میانجی گری نمی شود پیشنهاد شده است (۲،۳).

گیرنده های CB1 به صورت گسترده ای در نواحی از مغز که در حافظه و یادگیری نقش دارند نظیر هیپوکامپ، کورتکس، عقده های قاعده ای، آمیگدال و مخچه بیان می شود (۴،۵). مطالعات رفتاری نشان می دهند که کانابینوئیدها با برخی از سیستم های نوروترانسمیتری برهمکنش مستقیم نشان می دهند (۶،۷). مدارکی وجود دارد که نشان می دهد کانابینوئیدها رهائش چندین میانجی عصبی را در سرتاسر مغز کاهش می دهند (۸). مطالعاتی که بر روی هیپوکامپ صورت گرفته است نشان می دهد که کانابینوئیدها از طریق فعال نمودن گیرنده های پیش سیناپسی CB1 آزادسازی نوروترانسمیترهای مختلف مانند گلوتامات، استیل کولین، گابا، اویپوئیدها و نورآدرنالین را کاهش می دهند (۶،۹،۹۸). مدارک زیادی وجود دارد که نشان می دهد نورآدرنالین و گیرنده های نورآدرنژیک در یادگیری و حافظه نقش دارند به عنوان نمونه زمانی که نورآدرنالین به داخل نواحی مختلف مغز از جمله هیپوکامپ و کورتکس انتورینال (۱۰) و آمیگدال تزریق می شوند شکل گیری حافظه را تقویت می نمایند (۱۱). همچنین نورآدرنالین بر روی بسیاری از فرآیندهای مرکزی که تحت تأثیر کانابینوئیدها قرار می گیرد اثر می گذارد. مطالعات پیشین نشان می دهند که کانابینوئیدها بر روی عملکرد سیستم نورآدرنژیک اثر می گذارد (۱۲،۱۳). کانابینوئیدها باعث کاهش نورآدرنالین در هیپوکامپ می شود و این کاهش همراه با تضعیف عملکرد حیوان در ماز شعاعی می باشد. مطالعات نشان می دهد، در حیواناتی که در دوران جنینی در معرض کانابینوئیدها بوده اند، بیان آنزیم تیروزین هیدروکسیلاز در نورون ها در طی مراحل اولیه ی تکوین مغز جنین افزایش می یابد (۱۴). به علاوه مشخص شده است تخریب ناحیه لوکوس سرولئوس که نورون های نورآدرنژیک از آنجا منشأ گرفته و نواحی مختلف مغز را

1 - Encoding

2 - Consolidation

3 - Stroage

4 - Retrieval

5 - inhibitory (passive) avoidanse apparatus

در مرحله تزریق پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما ، سر سوزن ۲۷ G دندانپزشکی در داخل کانول راهنما ۲۲ G قرار داده شده ، در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۶۰ ثانیه تزریق می شد.

#### ۷-۲: بافت شناسی

پس از کشتن حیوان ها توسط کلروفورم با تزریق رنگ متیلن بلو ۱٪ (۰/۵ μl) به درون هر دو کانول ، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده ، درون فرمالین ۱۰ درصد قرار می گرفت. پس از یک هفته، محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوب مورد مطالعه قرار می گرفت .

#### ۸-۲: تجزیه و تحلیل آماری

نمره حافظه هر گروه به صورت میانگین و انحراف معیار استاندارد (Mean ± S.E.M) ثبت می گردید. به منظور تعیین وجود اختلاف معنا دار بین گروه ها آزمایش ، از روش تحلیل واریانس یک طرفه ۱۴ و آزمون توکی ۱۵ استفاده گردید . برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد .

#### ۹-۲: تیمارهای دارویی و آزمایش های انجام شده

#### ۹-۲-۱: آزمایش اول بررسی تأثیر تزریق WIN55, 212-2 بر روی حافظه اجتنابی مهاری.

هشت گروه حیوان در این آزمایش به کار رفت. گروه اول و دوم بلافاصله پس از آموزش سالیین یا حامل را به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کردند. سه گروه دیگر مقادیر مختلف WIN55, 212-2 (۰/۵ ، ۰/۲۵ ، ۰/۱ μg/rat) را بلافاصله پس از آموزش به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کردند، در روز آزمون این گروه ها ، ۵ دقیقه قبل از آزمون سالیین (۱ μl/rat) یا حامل (۱ μl/rat) را به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت داشتند ( شکل ۱ - پانل چپ). سه گروه باقیمانده بلافاصله بعد از آموزش WIN55, 212-2 (۰/۵ μg/rat) را دریافت کردند و در روز آزمون مقادیر مختلف WIN55, 212-2 (۰/۵ ، ۰/۲۵ ، ۰/۱ μg/rat) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت کردند ( شکل ۱ - پانل راست ).

#### ۹-۲-۲: آزمایش دوم بررسی تأثیر تزریق درون مغزی فنیل افرین بر حافظه اجتنابی تخریب شده ناشی از WIN55, 212-2.

در این آزمایش هشت گروه حیوان به کار رفت. چهار گروه اول سالیین را بلافاصله بعد از آموزش دریافت داشتند و در روز آزمون مقادیر مختلف فنیل افرین (۰/۷۵ ، ۰/۵ ، ۰/۲۵ ، ۰) را پنج دقیقه قبل از آزمون دریافت داشت ( شکل ۲ - پانل چپ ).

که بلافاصله قبل از آزمایش ها داروهای فنیل افرین و پرازوسین در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹ درصد حل گردید و داروی WIN55, 212-2 در محلول حاملی ۶ حل شد که ۹۰ درصد آن سرم فیزیولوژیک استریل و ۱۰ درصد باقی مانده آن دی متیل سولفوکسید ۷ بود که سرانجام به محلول فوق یک قطره روغن توئین ۸۰ اضافه می شد.

#### ۴-۲: روش جراحی و کانول گذاری در ناحیه پستی هیپوکامپ (CA1)

موش های صحرائی توسط تزریق کتامین هیدروکلراید ۹ (mg/kg) ۸۰ (۱۵ mg/kg) بی هوش می شدند . بعد از بی هوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شده و دو کانول راهنمای (۲۲ G) ۱۱ به صورت دو طرفه بر اساس اطلس پاکسینوس و واتسون ( ۱۹۹۷ ) در هیپوکامپ پستی قرار داده می شد. مختصات ناحیه CA1 هیپوکامپ پستی برابر ( AP = -۳/۲ ، ML = ±۲ ، V = -۳ ) می باشد (۱۶) .

#### ۵-۲: آزمون رفتاری

روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه در موش های صحرائی در دو روز متوالی انجام می شود. روز اول یا روز آموزش ۱۲ شامل آموزش دادن حیوان ها در دستگاه بوده ، در روز دوم یا روز آزمون ۱۳ میزان حافظه حیوان های آموزش دیده بررسی می شود در مرحله 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 . بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای موثر بر روی میله های فولادی به مدت ۵ ثانیه شوک الکتریکی با شدت یک میلی آمپر توسط حیوان دریافت می شود. جلسه آزمون ۲۴ ساعت بعد از آموزش ، مشابه آموزش انجام می شود به جز اینکه شوکی در این روز دریافت نمی گردد. مدت زمان توقف موش بر روی سکو به عنوان معیار حافظه در موش اندازه گیری می شود که حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف cut-off) برابر با ۳۰۰ ثانیه می باشد .

#### ۶-۲: تزریق درون مغزی دارو

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

14- ANOVA

15- Tukey's test

آزمون آماری تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد تفاوت معنی داری بین اثرات فنیل افرین ( $0.75 \mu\text{g}/\text{rat}$ ،  $0.5$ ،  $0.25$ ) در حضور و عدم حضور WIN55, 212-2 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) در زمینه به خاطر آوری حافظه اجتنابی مهاری وجود دارد [ برای داروی WIN55, 212-2  $p < 0.001$ ،  $F(1, 56) = 124.38$  ]؛ برای مقادیر مختلف فنیل افرین  $p > 0.05$ ،  $F(3, 56) = 1.86$ ، و برای برهمکنش بین داروی WIN55, 212-2 و مقادیر مختلف فنیل افرین  $p < 0.05$ ،  $F(3, 28) = 3.07$  می باشد. بعلاوه تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بکار بردن فنیل افرین به تنهایی قبل از آزمون تأثیری بر روی حافظه ندارد [ $p > 0.05$ ،  $F(3, 28) = 0.25$ ]، در حالیکه در حیواناتی که حافظه آنها با تزریق بعد از آموزش WIN55, 212-2 تخریب شده بود، تزریق فنیل افرین ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) قبل از آزمون می تواند به صورت معنی داری باعث بازگشت حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2 می گردد [ $p < 0.001$ ،  $F(3, 28) = 24.94$ ].

**۳-۳: آزمایش سوم نتایج تزریق درون مغزی پرازوسین قبل از آزمون بر روی حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2**

آزمون آماری تحلیل واریانس دو طرفه نشان داد، تفاوت معنی داری بین اثرات پرازوسین ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ،  $0.25$ ،  $0.125$ ) در حضور و عدم حضور WIN55, 212-2 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) در زمینه به خاطر آوری حافظه اجتنابی مهاری وجود دارد [ برای داروی WIN55, 212-2  $p < 0.001$ ،  $F(1, 56) = 23.48$  ]؛ برای مقادیر مختلف پرازوسین  $p > 0.01$ ،  $F(3, 56) = 6.53$ ، و برای برهمکنش بین داروی WIN55, 212-2 و مقادیر مختلف پرازوسین [ $p < 0.01$ ،  $F(3, 28) = 4.57$ ]. بعلاوه تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق پیش از آزمون فنیل افرین به تنهایی تأثیری بر روی حافظه ندارد [ $p > 0.05$ ،  $F(3, 28) = 0.38$ ]، در حالیکه تزریق پیش از آزمون پرازوسین، به حیواناتی که در روز آموزش و آزمون تحت تأثیر WIN55, 212-2 قرار داشتند، بازگشت حافظه القاء شده با WIN55, 212-2 روز آزمون را مهار می نماید [ $p < 0.001$ ،  $F(3, 28) = 8.93$ ].

چهارگروه باقی مانده بلافاصله بعد از آموزش WIN55, 212-2 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) را دریافت کردند و در روز آزمون مقادیر مختلف فنیل افرین ( $0.75 \mu\text{g}/\text{rat}$ ،  $0.5$ ،  $0.25$ ،  $0$ ) را پنج دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت داشت (شکل ۲- پانل راست).

**۳-۹-۲: آزمایش سوم بررسی تأثیر تزریق درون مغزی پرازوسین بر یادگیری وابسته به وضعیت WIN55, 212-2.**

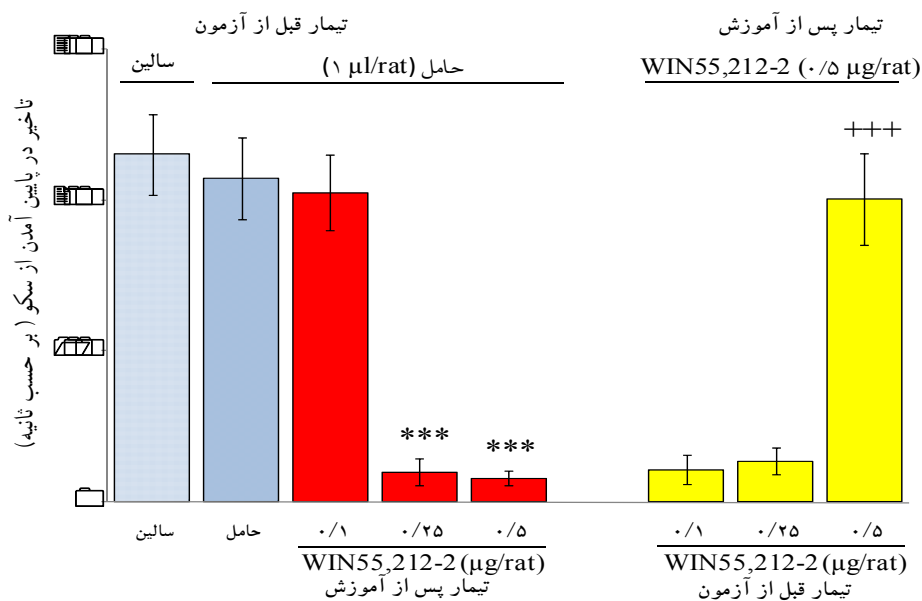
در این آزمایش هشت گروه حیوان به کار رفت. چهار گروه اول سالیان را بلافاصله بعد از آموزش دریافت داشتند و در روز آزمون مقادیر مختلف پرازوسین ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ،  $0.25$ ،  $0.125$ ) را پنج دقیقه قبل از آزمون دریافت داشت (شکل ۳- پانل چپ). چهار گروه باقی مانده بلافاصله بعد از آموزش WIN55, 212-2 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) را دریافت کردند و در روز آزمون، مقادیر مختلف پرازوسین ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ،  $0.25$ ،  $0.125$ ) را دو دقیقه قبل از WIN55, 212-2 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) به صورت درون مغزی (intra-CA1) دریافت داشت و پنج دقیقه بعد از آخرین تزریق تست شدند (شکل ۳- پانل راست).

### ۳- نتایج

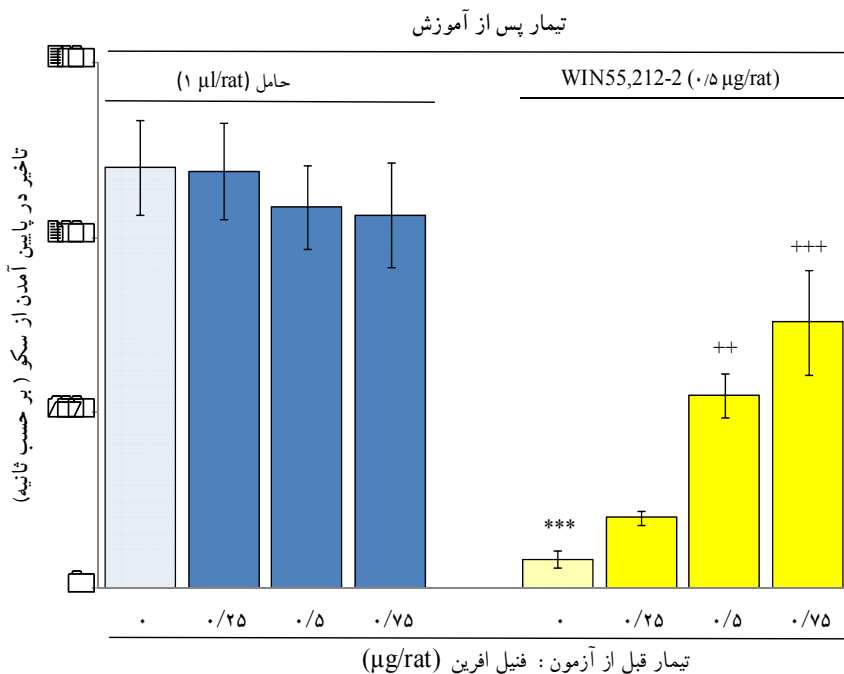
**۳-۱: آزمایش اول اثر WIN55, 212-2 بر روی حافظه اجتنابی مهاری**

آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 حافظه را تغییر می دهد [ $p < 0.001$ ،  $F(4, 35) = 27.45$ ]. انجام آزمون مکمل توکی نشان داد که تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 (intra-CA1)  $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$  و ( $0.25$ ) تاخیر پایین آمدن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش داد. بعلاوه بکار بردن WIN55, 212-2 قبل از آزمون قادر به بهبود حافظه تخریب شده با WIN55, 212-2 روز آموزش می باشد [ $p < 0.001$ ،  $F(3, 28) = 28.45$ ]. آزمون مکمل توکی نشان داد که WIN55, 212-2 ( $0.5 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) قادر به بازگرداندن حافظه تخریب شده می باشد.

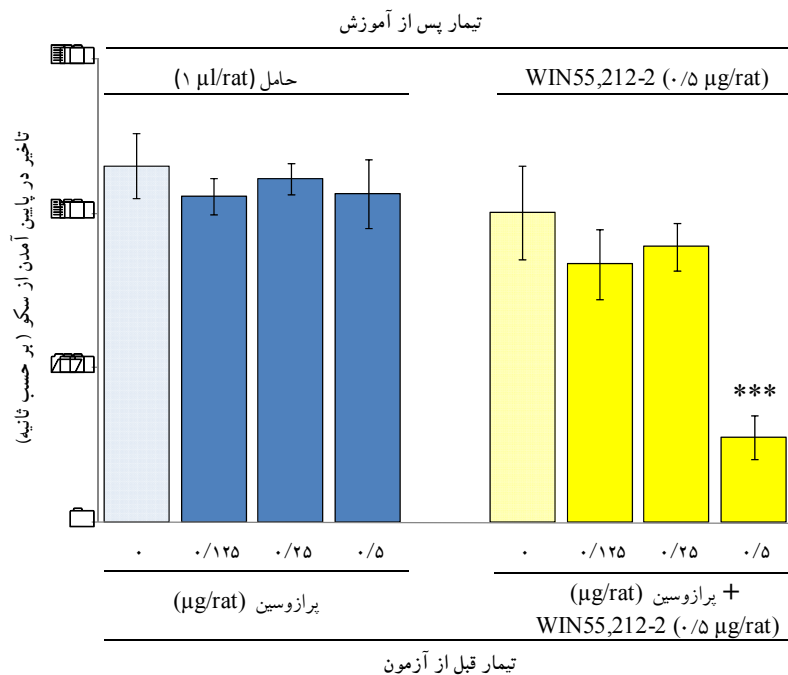
**۳-۲: آزمایش دوم نتایج تزریق درون مغزی فنیل افرین قبل از آزمون بر روی حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2**



شکل ۱. اثر تزریق پس از آموزش آگونیست گیرنده کانابینوئیدی WIN55, 212-2 بر روی حافظه اجتنابی مهاری (پانل راست) و اثر تزریق پس از آموزش و پیش از آموزش WIN55, 212-2 بر حافظه اجتنابی مهاری.  $***P < 0.001$  در مقایسه با گروه سالین/سالین و  $++++P < 0.0001$  در مقایسه با حامل/ WIN55, 212-2 می باشد.



شکل ۲. اثر فنیل افرین آگونیست گیرنده آلفا - 1- آدرنژیک بر روی به خاطر آوری حافظه اجتنابی مهاری (پانل راست) و بر حافظه اجتنابی تخریب شده با آگونیست گیرنده کانابینوئیدی WIN55, 212-2 (پانل چپ).  $***P < 0.001$  در مقایسه با گروه سالین/حامل و  $++++P < 0.0001$ ،  $++P < 0.01$  در مقایسه با سالین/ WIN55, 212-2 می باشد.



شکل ۳. اثر پرازوسین آنتاگونیست گیرنده آلفا - ۱- آدرنرژیک بر روی به خاطر آوری حافظه اجتنابی مهاری (پانل راست) و یادگیری وابسته به وضعیت القاء شده با آگونیست گیرنده کانابینوئیدی WIN55,212-2 (پانل چپ).  $***P < 0.001$ ،  $**P < 0.01$  در مقایسه با گروه WIN55,212-2/WIN55,212-2 می باشد.

#### ۴- بحث

نتایج ما همچنین نشان می دهد که حافظه ی تخریب شده با تزریق پس از آموزش WIN55,212-2 به داخل هیپوکامپ پستی به طور کامل با تزریق همان مقدار دارو قبل از آزمون به هیپوکامپ پستی مهار شده و حافظه به حالت عادی بر می گردد. مطالعات قبلی ما نشان داده بود که تزریق WIN55,212-2 به صورت درون بطنی در روز آزمون باعث بهبود حافظه ی تخریب شده با تزریق درون بطنی WIN55,212-2 در روز آموزش می شود (۲۰). مشابه با کانابینوئیدها بعضی دیگر از داروها مانند مورفین (۲۱)، لیتیم (۲۲) و هیستامین (۲۳) نیز اگر به تنهایی در روز آموزش به کار برده شوند باعث تخریب حافظه می گردند اما به کار بردن آنها در روز آموزش و آزمون باعث ایجاد حافظه ی کامل می گردد که به این پاسخ اصطلاحاً یادگیری وابسته به وضعیت گفته می شود. یادگیری وابسته به وضعیت فرآیندی است که در آن به یادآوری اطلاعات تازه کسب شده تنها در شرایطی ممکن می باشد که جاندار در روز آموزش و آزمون شرایط فیزیولوژیک و حسی یکسانی داشته باشد. این شرایط یکسان می تواند با به کار بردن دارو در روز آموزش و آزمون ایجاد گردد (۲۱).

بر همکنش بین اوپیوئیدها و کانابینوئیدها در مطالعات مختلف نشان داده شده است، به گونه ای که تزریق قبل از آزمون مورفین قادر به اصلاح حافظه ی تخریب شده با WIN55,212-

یادگیری اجتنابی مهاری به صورت گسترده ای در مطالعات فارماکولوژیکی برای سنجش حافظه ی دراز مدت استفاده می شود. یافته های ما در این مطالعه نشان می دهد که تزریق پس از آموزش آگونیست غیر انتخابی گیرنده های کانابینوئیدی، WIN55,212-2 به داخل هیپوکامپ پستی باعث تخریب حافظه در روز آزمون می شود. نتایج بدست آمده در این مطالعه هماهنگ با گزارشاتی می باشند که نشان می دهند تزریق WIN55,212-2 یا مهار کننده ی ناقل غشایی آندوکانابینوئیدها، VDM-11 بلافاصله بعد از آموزش باعث کاهش حافظه ی دراز مدت می شود (۶). گزارشاتی وجود دارند که نشان می دهند آگونیست گیرنده های CB1 مراحل مختلف پردازش حافظه مانند اکتساب<sup>۱۶</sup> و تثبیت<sup>۱۷</sup> حافظه را تحت تأثیر قرار می دهد (۴، ۱۷، ۱۸). با توجه به اینکه تراکم بالایی از گیرنده های CB1 در هیپوکامپ وجود دارد (۱۹) و فعال شدن این گیرنده های پیش سیناپسی موجب مهار رهایش میانجی های عصبی مختلف می شود (۸)، این احتمال وجود دارد که کانابینوئیدها به واسطه ی مهار آزادسازی گلوتامات، استیل کولین و نور آدرنالین باعث تخریب حافظه می شوند.

آزمون (۲۹) یا پس از آموزش (۳۰) پرازوسین باعث تضعیف حافظه می گردد. اما تزریق قبل از آزمون پرازوسین در مقادیر به کار رفته در این مطالعه به تنهایی اثری بر روی حافظه ی اجتنابی مهاری ندارد. انتخاب مقادیری از دارو که به تنهایی اثری بر روی حافظه ندارد بر اساس مطالعات نمونه صورت گرفت.

نتایج ما همچنین نشان می دهد که در حیواناتی که مقادیر مؤثر WIN55,212-2 را بعد از آموزش و قبل از آزمون دریافت کرده اند، تزریق قبل از آزمون پرازوسین مانع بهبود حافظه توسط WIN55,212-2 روز آزمون می شود. به عبارتی دیگر پرازوسین به صورت معنی داری قادر به مهار یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با WIN55,212-2 می باشد. این نتایج شاید نشان دهنده ی این باشد که پاسخ ایجاد شده توسط WIN55,212-2 روز آزمون از طریق گیرنده های آلفا-۱-آدرنژیک میانجی گری می شود. کاهش حافظه ای که توسط پرازوسین به کار رفته قبل از WIN55,212-2 روز آزمون ایجاد شده است موافق با مطالعاتی می باشد که نشان می دهند پرازوسین اکتساب حافظه را کاهش می دهد. مطالعات همچنین نشان می دهند که تزریق قبل از آموزش یا پس از آموزش پرازوسین به استریا ترمینالیس باعث تخریب حافظه ی فضایی می شود (۳۱).

#### ۵- نتیجه گیری

با در نظر گرفتن اثرات تقویت کننده آگونیست های گیرنده های آلفا-۱-آدرنژیک بر روی حافظه و اثرات مخرب آنتاگونیست های آلفا-۱-آدرنژیک بر روی حافظه زمانی که همراه با WIN55,212-2 به کار برده می شوند، این احتمال مطرح می شود که یادگیری وابسته به وضعیت WIN55,212-2 با فعال شدن گیرنده های آلفا-۱-آدرنژیک در ناحیه CA1 هیپوکامپ پستی در ارتباط می باشد. هر چند آزمایشات بیشتری برای روشن شدن مکانیسم واقعی بر هم کنش WIN55,212-2 و گیرنده های آلفا-۱-آدرنژیک لازم می باشد.

#### ۶- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات خانم مریم السادات شاهین که ما را در بهبود تحقیق حاضر یاری نموده اند، تشکر و قدردانی می گردد.

۲ روز آموزش می باشد (۲۰). همچنین گزارشاتی وجود دارند که نشان می دهند گیرنده های آلفا-۱-آدرنژیک در بروز علائم ترک مورفین نقش دارد (۲۴). این مطالعات نشان می دهند آنتاگونیست گیرنده های آلفا-۱، پرازوسین علائم سیستمیک ترک اوپیوئیدها را کاهش می دهد. با در نظر گرفتن تمامی شواهد فوق این احتمال وجود دارد که اثرات WIN55,212-2 بر روی حافظه از طریق گیرنده های آلفا-۱-آدرنژیک میانجی گری شود. بنابراین در این مطالعه ما اثرات تزریق قبل از آزمون آگونیست های گیرنده های آلفا-۱-آدرنژیک را بر روی حافظه ی اجتنابی مهاری تخریب شده با WIN55,212-2 و همچنین اثر آنتاگونیست های آلفا-۱-آدرنژیک را بر روی یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با WIN55,212-2 مورد بررسی قرار داده ایم.

یافته های ما نشان می دهد که تزریق قبل از آزمون آگونیست گیرنده ی آلفا-۱، فنیل افرین باعث بازگشت حافظه ی تخریب شده با تزریق پس از آموزش WIN55,212-2 می شود. مطالعات قبلی نشان می دهد که تزریق پس از آموزش آگونیست های آدرنژیک نظیر اپی نفرین (۲۵)، آمفتامین (۲۶) و فنیل افرین (۲۸،۲۷) باعث تقویت حافظه ای که قبلاً توسط روش های مختلف تخریب شده، می شود. همچنین مطالعات نشان می دهد که گیرنده های آلفا-۱-آدرنژیک فرآیند ذخیره ی حافظه را به واسطه ی اثر بر روی عملکرد گیرنده های بتا-آدرنژیک تحت تأثیر قرار می دهد (۲۷،۲۸). مکانیسمی که از طریق آن سیستم آدرنژیک فرآیند حافظه را تحت تأثیر قرار می دهد کاملاً مشخص نمی باشد اما به نظر می رسد، به توانایی این سیستم در تعدیل انتقال پیام های گلوتاماتی در محل سیناپس مربوط باشد. که این تعدیل از طریق G پروتئین های جفت شده با گیرنده های آدرنژیک صورت می گیرد. به علاوه در این مطالعه اثر تزریق قبل از آزمون آنتاگونیست گیرنده های آلفا-۱، پرازوسین در حضور و عدم حضور WIN55,212-2 بر روی حافظه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ما نشان می دهد در حیواناتی که در روز آموزش، سالین و در روز آزمون، پرازوسین دریافت کرده اند هیچ تغییر معنی داری در حافظه ی اجتنابی مهاری مشاهده نمی شود. مطالعات قبلی نشان می دهند که تزریق قبل از

#### References:

1. Onaivi E.S. Neuropsychobiological evidence for the functional presence and expression of cannabinoid CB2 receptors in the brain. *Neuropsychobiology*, 2006, 54: 231-46.
2. Al-Hayani A., Davies S.N. Cannabinoid receptor mediated inhibition of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal slice is developmentally regulated. *Br. J. Pharmacol.*, 2000, 131: 663-5.
3. Hoffman A.F., Macgill A.M., Smith D., Oz M., Lupica C.R. Species and strain differences in the expression of a novel glutamate-modulating cannabinoid receptor in

- the rodent hippocampus. *Eur. J. Neurosci.*, 2005, 22: 2387-91.
4. Mackowiak M., Chocyk A., Dudys D., Wedzony K. Activation of CB1 cannabinoid receptors impairs memory consolidation and hippocampal polysialylated neural cell adhesion molecule expression in contextual fear conditioning. *Neuroscience.*, 2009, 158: 1708-16.
  5. Wilson R.I., Nicoll R.A. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science.*, 2002, 296: 678-82.
  6. Clarke J.R., Rossato J.I., Monteiro S., Bevilacqua L.R., Izquierdo I., Cammarota M. Posttraining activation of CB1 cannabinoid receptors in the CA1 region of the dorsal hippocampus impairs object recognition long-term memory. *Neurobiol. Learn Mem.*, 2008, 90: 374-81.
  7. Gobbi G., Bambico F.R., Mangieri R., Bortolato M., Campolongo P., Solinas M., Cassano T., Morgese M.G., Debonnel G., Duranti A., Tontini A., Tarzia G., Mor M., Trezza V., Goldberg S.R., Cuomo V., Piomelli D. Antidepressant-like activity and modulation of brain monoaminergic transmission by blockade of anandamide hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2005, 102: 18620-5.
  8. Schlicker E., Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2001, 22: 565-72.
  9. Al-Hayani A., Davies S.N. Effect of cannabinoids on synaptic transmission in the rat hippocampal slice is temperature-dependent. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 442: 47-54.
  10. Izquierdo L.A., Vianna M., Barros D.M., Mello e Souza T., Ardenghi P., Sant'Anna M.K., Rodrigues C., Medinam J.H., Izquierdo I. Short- and long-term memory are differentially affected by metabolic inhibitors given into hippocampus and entorhinal cortex. *Neurobiol. Learn Mem.*, 2000, 73: 141-9.
  11. Clayton E.C., Williams C.L. Adrenergic activation of the nucleus tractus solitarius potentiates amygdala norepinephrine release and enhances retention performance in emotionally arousing and spatial memory tasks. *Behav Brain Res.*, 2000, 112: 151-8.
  12. Hernandez-Tristan R., Arevalo C., Canals S., Leret M.L. The effects of acute treatment with delta9-THC on exploratory behaviour and memory in the rat. *J. Physiol. Biochem.*, 2000, 56: 17-24.
  13. Schlicker E., Timm J., Zentner J., Gothert M. Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 1997, 356: 583-9.
  14. Bonnin A., de Miguel R., Hernandez M.L., Ramos J.A., Fernandez-Ruiz J.J. The prenatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol affects the gene expression and the activity of tyrosine hydroxylase during early brain development. *Life Sci.*, 1995, 56: 2177-84.
  15. Kataoka Y., Ohta H., Fujiwara M., Oishi R., Ueki S. Noradrenergic involvement in catalepsy induced by delta-9-tetrahydrocannabinol. *Neuropharmacology.*, 1987, 26: 55-60.
  16. Nasehi M., Sahebgharani M., Haeri-Rohani A., Zarrindast M.R. Effects of cannabinoids infused into the dorsal hippocampus upon memory formation in 3-days apomorphine-treated rats. *Neurobiol. Learn Mem.*, 2009, 92: 391-9.
  17. Adam A.S., Wenger T., Csillag A. The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant dose-dependently inhibits memory recall in the passive avoidance task in domestic chicks (*Gallus domesticus*). *Brain Res. Bull.*, 2008, 76: 272-4.
  18. Kobilto T., Hazvi S., Dudai Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *Eur J Neurosci.*, 2007, 25: 3417-21.
  19. Pettit D.A., Harrison M.P., Olson J.M., Spencer R.F., Cabral G.A. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J. Neurosci. Res.*, 1998, 51: 391-402.
  20. Zarrindast M.R., Kangarlu-Haghighi K., Khalilzadeh A., Fazli-Tabaei S. Influence of intracerebroventricular administration of cannabinergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Behav. Pharmacol.*, 2006, 17: 231-7.
  21. Zarrindast M.R., Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 2004, 497: 197-204.
  22. Zarrindast M.R., Madadi F., Ahmadi S. Repeated administrations of dopamine receptor agents affect lithium-induced state-dependent learning in mice. *J. Psychopharmacol.*, 2009, 23: 645-651.
  23. Zarrindast M.R., Fazli-Tabaei S., Khalilzadeh A., Farahmanfar M., Yahyavi S.H. Cross state-dependent retrieval between histamine and lithium. *Physiol. Behav.*, 2005, 86: 154-63.
  24. van der Laan J.W. Effects of alpha 2-agonists on morphine withdrawal behaviour: potentiation of jumping mediated by alpha 2-receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 1985, 329: 293-8.
  25. Introini-Collison I.B., Castellano C., McGaugh J.L. Interaction of GABAergic and beta-noradrenergic drugs in the regulation of memory storage. *Behav. Neural Biol.*, 1994, 61: 150-5.
  26. Martinez J.L., Jr., Vasquez B.J., Rigter H., Messing R.B., Jensen R.A., Liang K.C., McGaugh J.L. Attenuation of amphetamine-induced enhancement of learning by adrenal demedullation. *Brain Res.*, 1980, 195: 433-43.
  27. Ferry B., Roozendaal B., McGaugh J.L. Involvement of alpha1-adrenoceptors in the basolateral amygdala in modulation of memory storage. *Eur. J. Pharmacol.*, 1999, 372: 9-16.
  28. Ferry B., Roozendaal B., McGaugh J.L. Basolateral amygdala noradrenergic influences on memory storage are mediated by an interaction between beta- and alpha1-adrenoceptors. *J. Neurosci.*, 1999, 19: 5119-23.
  29. Zarrindast M.R., Bakhsha A., Rostami P., Shafaghi B. Effects of intrahippocampal injection of GABAergic drugs on memory retention of passive avoidance learning in rats. *J. Psychopharmacol.*, 2002, 16: 313-9.
  30. Zarrindast M.R., Khodjastehfar E., Oryan S., Torkaman-Boutorabi A. Baclofen-impairment of memory retention in rats: possible interaction with adrenoceptor mechanism(s). *Eur. J. Pharmacol.*, 2001, 411: 283-8.
  31. Chen H.C., Chen D.Y., Chen C.C., Liang K.C. Pre- and post-training infusion of prazosin into the bed nucleus of the stria terminalis impaired acquisition and retention in a Morris water maze task. *Chin J. Physiol.*, 2004, 47: 49-59.