

## بررسی اثر عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa*) بر دانسیته نورونی مناطق سه گانه هیپوکامپ اصلی در موش صحرایی نر

دکتر مریم طهرانی پور، مریم کهتر پور\*، بی بی زهرا جواد موسوی، دکتر ناصر مهدوی شهری

گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد، مشهد، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۹/۱۲/۱۵ اصلاح نهایی: ۹۰/۹/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۱۵

### چکیده:

زمینه و هدف: در گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa*) بیش از ۶۱ ماده شیمیایی یافت شده که کانابینوئید نامیده می شود. کانابینوئیدها در تمام مراحل حافظه نقش دارند. هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه بر دانسیته نورونی نواحی CA1, CA2, CA3 (Cornu Ammonis, CA) هیپوکامپ می باشد. روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۲۴ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۳۰۰-۳۵۰ گرمی، به سه گروه تجربی ۱ و تجربی ۲ و گروه شاهد تقسیم شدند. عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه با روش سوکسله تهیه شد و در دو گروه تجربی به ترتیب با دوزهای ۲۵ و ۵۰ میلی گرم به کیلوگرم به روش داخل صفاقی برای مدت ۳ هفته (هر هفته یکبار) و به گروه شاهد نرمال سالین تزریق شد. پس از یک ماه حیوانات با رامپون و کتامین بیهوش و مغز به آرامی از جمجمه خارج و در فرمالین نمکی ۱۰٪ قرار گرفت. پس از طی مراحل پاساژ بافتی از مغز برش های سریال ۷ میکرونی تهیه شد و با همتوکسیلین، انوزین رنگ آمیزی شد. از نواحی CA1, CA2, CA3 عکسبرداری و به طریقه دایسکتور دانسیته نورونی محاسبه و نتایج گروه ها با استفاده از آزمون های آماری t، ANOVA و توکی با هم مقایسه شدند.

یافته ها: میانگین دانسیته نورونی ناحیه CA1 در گروه کنترل و تجربی ۱ و ۲ به ترتیب  $37396 \pm 553$ ،  $10081 \pm 233$  و  $10986 \pm 382$ ، ناحیه CA2  $33045 \pm 449$ ،  $14648 \pm 284$  و  $17147 \pm 378$  و در ناحیه CA3  $26324 \pm 437$ ،  $10679 \pm 215$  و  $13829 \pm 359$  بود. آنالیز های آماری کاهش معنی داری را در دانسیته نورونی نواحی CA1, CA2, CA3 گروه تجربی (دوز ۲۵ و ۵۰ mg/kg عصاره آبی) نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.001$ ).

نتیجه گیری: احتمال می رود عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه با داشتن ترکیبات کانابینوئیدی آزادسازی دوپامین را افزایش داده و تولید ایمپالس های مهاری می کند و از این طریق باعث تخریب نورونی شده بنحوی که دانسیته نورونی این ناحیه کاهش یافته است.

واژه های کلیدی: حافظه، کانابینوئید، شاهدانه، هیپوکامپ.

### مقدمه:

هیپوکامپ و ارتباطاتش صورت می گیرد (۳،۲). هیپوکامپ دارای ارتباطات متعددی با ساختمان های اصلی دستگاه لیمبیک می باشد و بطور فطری در فرایندهای حافظه و یادگیری درگیر است (۳). تقریباً هر گونه تجربه حسی باعث فعال شدن حداقل بخشی از هیپوکامپ می شود (۳،۲) و نقش هیپوکامپ

تغییر در سیناپس، اساس عصبی یادگیری می باشد در طی شکل گیری یادگیری و حافظه ارتباطات بین نورون ها (سیناپس) از نظر قدرت تغییر می یابد. کلید ایجاد حافظه تغییر در قدرت ارتباطات سیناپسی می باشد (۱). روند به رمز در آوردن حافظه با بهره وری از

\*نویسنده مسئول: خراسان رضوی- مشهد- اداره آموزش و پرورش شهرستان مشهد- ناحیه ۶- آموزشگاه حضرت زینب (س)، تلفن: ۸۱۲۸۱۷-۰۵۱۱.

کشف و شناسایی این رسپتورها، اندوکانبینوئیدها نیز کشف شدند (۱۱).

مطالعات حضور رسپتور CB1 را در نواحی از مغز از جمله هیپوکامپ، کورتکس و مخچه (۱۲) و سیستم لیمبیک، تالاموس، هیپوتالاموس و حضور رسپتور CB2 در سلول های سیستم ایمنی و اخیراً در تنه مغزی (۱۳) نشان داده است. بنابراین احتمال اثر کانابینوئیدها بر این سلول ها وجود دارد (۱۲).

همچنین مطالعات نشان داده حذف ژنتیکی رسپتورهای کانابینوئیدی در مراحل اولیه تولد موش، اختلال حافظه و کاهش عملکردهای شناختی را به دنبال دارد و این کاهش سریع در رسپتورهای کانابینوئیدی با از بین رفتن نورونها در نواحی CA1, CA3 هیپوکامپ همراه است (۱۴).

تاکنون مطالعاتی پیرامون شناسایی عملکرد رسپتورهای کانابینوئیدی در ساختارهای سیستم عصبی به انجام رسیده و با توجه به شناسایی و توسعه آگونیست ها و آنتاگونیست ها درک عمیق تری از نقش فیزیولوژیک سیستم اندوکانبینوئیدی پیدا خواهد شد که در نهایت پیشرفت هایی در زمینه داروهای خواب آور، حفاظت عصبی، ضد تشنج، یادگیری، تقویت حافظه و کاهش اثرات آلزایمر در افراد مسن نیز شناسایی شده است (۱۳).

با توجه به اهمیت عملکرد کانابینوئیدها در گیاه شاهدانه و پتانسیل درمانی آن به شیوه های مختلف و از طرفی شیوع بیماری هایی چون آلزایمر، پارکینسون و عواملی از قبیل افزایش سن، صدمات مغزی و ایجاد تومور و اثرگذاری آن بر حافظه و ایجاد اختلالات یادگیری که معضل بزرگی در جامعه شناخته شده، سعی شده تحقیقات بیشتری در زمینه استفاده از نوع عصاره برگ گیاه شاهدانه، میزان دوز مصرفی و مدت زمان استفاده از آن برای درمان بیماری ها به انجام رسد. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر عصاره آبی برگ گیاه کانابیس ساتیوا بر دانسیته نورونی مناطق CA1, CA2, CA3 هیپوکامپ موش صحرایی نر انجام شده است.

در تثبیت حافظه کاملاً شناخته شده است چنانچه هیپوکامپ آسیب ببیند شخص از ذخیره اطلاعات عاجز می ماند اما اطلاعات قدیمی تر که قبلاً تثبیت شده اند دست نخورده و قابل استفاده باقی می ماند (۴).

گیاه شاهدانه در زبان انگلیسی کانابیس و در زبان اسپانیایی ماری جوانا نامیده می شود. این گیاه یک ساله و لیفی است و معمولاً به طور خودرو در مناطق گرمسیری می روید (۵). از سال ۱۹۶۰ از شاهدانه بصورت تفریحی استفاده می شد و یلیام سیر و همکارانش برای اولین بار ارزش درمانی شاهدانه را به صورت علمی ارزیابی کردند و استفاده کلینیکی از شاهدانه در درمان بسیاری از بیماری ها شروع شد (۶). سه ماده اصلی که از کانابیس تهیه می شود ماری جوانا و حشیش و روغن حشیش می باشد (۵).

از گیاه کانابیس تاکنون بیش از ۶۱ ماده شیمیایی به دست آمده که همه کانابینوئید نامیده می شوند. اصلی ترین ماده کانابینوئید دلتا ۹ یا تتراهیدروکانابینول (THC) می باشد. THC با اتصال به گیرنده های کانابینوئیدی در مغز به عنوان مسئول بیشتر آثار روانگردانی کانابیس به شمار می رود (۷). مصرف شاهدانه باعث اثرات گوناگون فیزیولوژیکی و روانی در انسان، از جمله از دست دادن حافظه می شود (۸). این آسیب از طریق ماده موثره این گیاه اعمال می شود که می تواند آپتوتوز سلولی و سمیت عصبی را در هیپوکامپ القاء کند. پس کانابینوئیدها نمی توانند داروهایی بی ضرر باشند (۹، ۸).

مقدار THC در بخش های مختلف گیاه متفاوت است. مقدار THC در سرشاخه های گلدار گیاه در بالاترین حد است و به ترتیب در برگ ها، برگ های تحتانی ساقه و دانه های گیاه کاهش می یابد (۱۰).

تاثیرات مواد کانابینوئیدی بر بدن به عوامل متعددی از جمله مقدار مصرف دارو و مدت زمان مصرفی آن بستگی دارد (۱۰). کانابینوئیدها از طریق رسپتورهای کانابینوئید ۱ (CB1) و کانابینوئید ۲ (CB2) اعمال فیزیولوژیک خود را انجام می دهند. به دنبال

## روش بررسی:

در این مطالعه تجربی ۲۴ راس موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن تقریبی ۸ هفته و وزن ۳۵۰-۳۰۰ گرم از موسسه رازی مشهد خریداری و در دمای ۲۳-۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت ۵۰ دسترسی و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در اتاق حیوانات دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد نگهداری شدند. در طول آزمایش حیوانات به آب و غذای استاندارد کافی دسترسی داشتند. حجم نمونه در هر گروه بر اساس مطالعات قبلی انتخاب شده است (۱۶).

گیاه کانایس در منطقه ای از گناباد جمع آوری شد و در آزمایشگاه گیاه شناسی دانشگاه آزاد مشهد با کد هرباریمی ۲۵۴۸ تایید شد (هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد IAUM). برگ گیاه خشک شاهدانه برای هر نوبت عصاره گیری در همان روز کاملاً آسیاب گردید و عصاره گیری به روش سوکسله آبی انجام گرفت (۱۵).

در این آزمایش موش ها به سه گروه تجربی ۱، تجربی ۲ و گروه شاهد تقسیم شدند. پس از تهیه عصاره آبی برگ گیاه کانایس ساتیوا، گروه های تجربی به ترتیب با دوزهای ۲۵ و ۵۰ mg/kg عصاره (۱۶) به روش داخل صفاقی (IP) به مدت ۳ هفته (هر هفته یکبار) و گروه شاهد نرمال سالین تزریق شد. پس از گذشت یک ماه حیوانات با رامپون و کتامین به نسبت وزن بدن (۶ و ۶۰ mg/kg) بیهوش شد (۱۷). سپس مغز به آرامی از جمجمه خارج شده در فرمالین نمکی ۱۰ درصد قرار گرفته و پس از طی مراحل پاساژ بافتی از مغز برش های سریال ۷ میکرونی تهیه شده و با همتوکسیلین، اتوزین رنگ آمیزی شد از مناطق CA1, CA2, CA3 هیپوکامپ عکسبرداری و به طریقه دایسکتور دانسیته نورونی بررسی شده و با گروه کنترل مقایسه شد.

روش دایسکتور به این صورت بوده است که در

یک چهارچوب مرجع نورون ها شمارش می گردند. اگر نورونی در هر دو چهارچوب باشد در شمارش محسوب نمی شود اما اگر نورونی در چهارچوب مرجع باشد ولی در چهارچوب بعدی نباشد شمارش می شود (۱۷). پس از شمارش نورون ها دانسیته نورونی بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$ND = \Sigma Q / \Sigma \text{frame} \times V \text{ dissector}$$

ND: دانسیته نورونی

$\Sigma Q$ : مجموع نورون های شمارش شده در یک نمونه است.

$\Sigma \text{frame}$ : مجموع دفعات نمونه برداری شده در یک

نمونه است.

V dissector: حجم چهارچوب نمونه برداری است که برابر

است با:

$$V \text{ dissector} = A \text{ frame} \times H$$

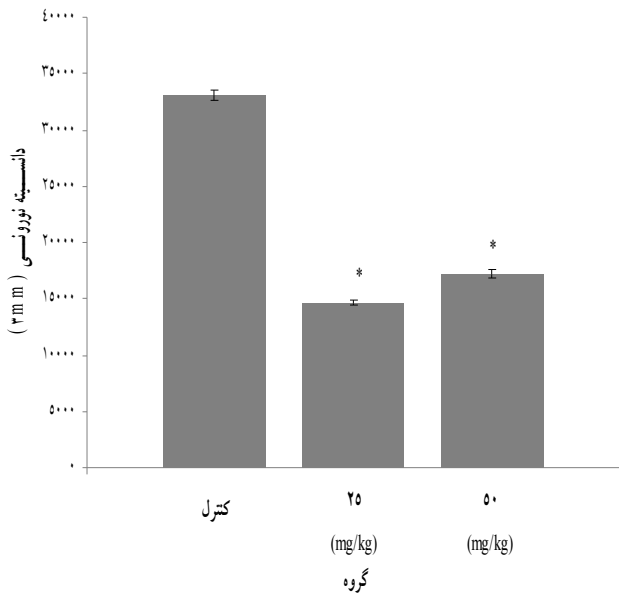
A frame: مساحت چهارچوب نمونه برداری است.

H: فاصله بین دو برش متوالی یا ضخامت هر برش می باشد.

داده های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Minitab 13 و آزمون های آماری t، ANOVA و توکی (برای مقایسه دوتایی گروه ها) تجزیه تحلیل شدند. سطح معنی داری آزمون ها ( $P < 0.001$ ) در نظر گرفته شد.

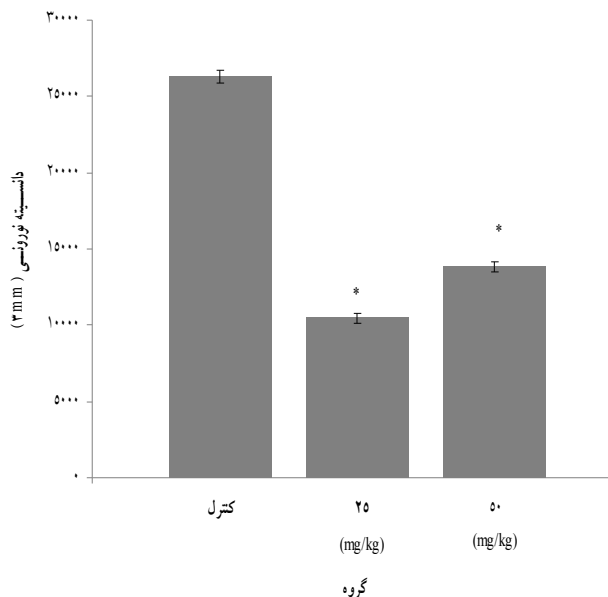
## یافته ها:

مقایسه میانگین دانسیته نورونی هیپوکامپ در گروه های مختلف نشان داد که در ناحیه CA1 گروه کنترل میزان دانسیته نورونی  $37396 \pm 553$  می باشد. در گروه تیمار شده با عصاره آبی دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم  $10081 \pm 233$  و در گروه تیمار شده با عصاره آبی دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم  $10986 \pm 382$  می باشد که از نظر مقایسه میانگین ها بین گروه کنترل و سایر گروه ها تفاوت معناداری وجود دارد (نمودار شماره ۱) و ( $P < 0.001$ ). همچنین میزان میانگین دانسیته

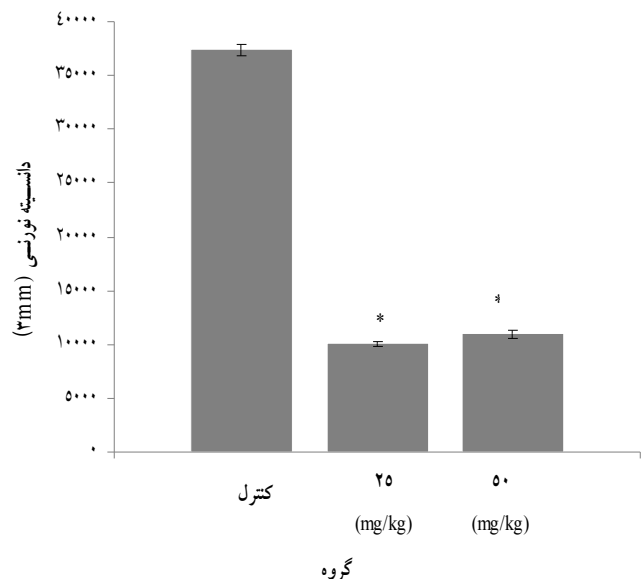


**نمودار شماره ۲: مقایسه دانسیته نورونی ناحیه CA۲**  
در گروه کنترل با دو گروه تیمار شده عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه  
 $P < 0.001$ \* نسبت به گروه کنترل  $n=8$  در هر گروه

نورونی در ناحیه CA2 گروه کنترل  $33045 \pm 449$ ، در گروه تیمار شده با عصاره آبی دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم  $14648 \pm 284$  و گروه تیمار شده با عصاره آبی دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم  $17147 \pm 378$  می باشد که از نظر مقایسه میانگین ها بین گروه کنترل و دو گروه تیمار شده تفاوت معناداری وجود دارد (نمودار شماره ۲) ( $P < 0.001$ ). به علاوه میزان میانگین دانسیته نورونی در ناحیه CA3 گروه کنترل  $26324 \pm 437$ ، در گروه تیمار شده با عصاره آبی دوز ۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم  $10469 \pm 215$  و گروه تیمار شده با عصاره آبی دوز ۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم  $13829 \pm 359$  می باشد که از نظر مقایسه میانگین ها بین گروه کنترل و دو گروه تیمار شده تفاوت معناداری وجود دارد (نمودار شماره ۳) ( $P < 0.001$ ). مقایسه گروه کنترل با گروه های تیمار شده بخش های مختلف هیپوکامپ نشان می دهد که تزریق عصاره آبی برگ این گیاه اثر کاهشی در نواحی CA1 و CA2, CA3 داشته است.



**نمودار شماره ۳: مقایسه دانسیته نورونی ناحیه CA۳**  
در گروه کنترل با دو گروه تیمار شده عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه  
 $P < 0.001$ \* نسبت به گروه کنترل  $n=8$  در هر گروه



**نمودار شماره ۱: مقایسه دانسیته نورونی ناحیه CA۱**  
در گروه کنترل با دو گروه تیمار شده عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه  
 $P < 0.001$ \* نسبت به گروه کنترل  $n=8$  در هر گروه

## بحث:

در این تحقیق سعی شده تا اثرات عصاره آبی برگ گیاه کانابیس ساتیوا بر مناطق CA1, CA2, CA3 هیپوکامپ بررسی شود. در قسمت نتایج مشاهده شد که دانشیته نورونی مناطق ذکر شده هیپوکامپ نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری داشته است.

محققین چهار جزء از عصاره گیاه کانابیس ساتیوا را شناسایی کرده اند. یکی از این اجزا کانابینوئیدول است که متاسفانه کانابینوئیدول می تواند پتانسیل های درمانی مفید این گیاه را محدود کند به طوری که منجر به ذخیره پتاسیم خارج سلولی شده که در طی تحریکات، پتاسیم به خارج از سلول ها هدایت می شود در حقیقت عصاره گیاه کانابیس ساتیوا اثرات افسردگی و اختلالات یادگیری را نشان می دهد (۱۸).

در تحقیق حاضر به کاهش تعداد نورون ها در هیپوکامپ با تزریق عصاره آبی برگ گیاه مذکور اشاره شده که تا کنون این نوع عصاره از برگ مورد مطالعه قرار نگرفته است.

همچنین مطالعات نقش دوپامین را در اثر استعمال شاهدانه شناسایی کرده اند و مشخص شده در اثر استعمال کانابینوئیدها آزادسازی دوپامین افزایش می یابد و ماده موثره گیاه کانابیس ساتیوا در رسپتورهای اپیوئیدی موجب تسهیل در آزادسازی دوپامین می شود (۱۹، ۲۰). از طرفی اثبات شده که کانابینوئیدهای روانگردان فعالیت نورون های دوپامینرژیک را در مسیر و نتراتگمنتال ایریا (VTA) در ساقه مغز افزایش می دهد. VTA ناحیه ای در سیستم مزولیمبو کورتیکال است و در واقع یکی از سیستم های دوپامینرژیک مهم در ساقه مغز است. نورون های دوپامینرژیک در و نتراتگمنتال ایریا تحت کنترل عملکرد بازدارندگی اینترنورون های گاباارژیک هستند مهار گابا بوسیله رسپتورهای اپیوئیدی باعث افزایش آزادسازی دوپامین در پایانه های نورون های دوپامینرژیک در هسته آکومبنس می شود. بررسی ها نشان داده است که کانابینوئیدها از جمله

دلتا ۹ تتراهیدروکانابینول ماده موثره این گیاه، فعالیت دوپامین را در مسیر مزولیمبیک از و نتراتگمنتال ایریا به هسته آکومبنس افزایش می دهد. هسته های آکومبنس پایانه های مهمی از فیبرها را دارا هستند و اهمیت ویژه ای در مصرف داروهای اعتیادآور دارد. کانابینوئیدها نیز آزادسازی دوپامین را در هسته آکومبنس افزایش می دهند. شواهد نشان داده که ماده موثره گیاه کانابیس ساتیوا  $\Delta 9$ -THC غلظت دوپامین را بوئژه در نواحی قشری هسته آکومبنس افزایش می دهد بطوری که این افزایش در خود هسته ها دیده نمی شود و این به خاطر وجود گیرنده های CBI در نواحی قشری هسته آکومبنس می باشد. بنابراین کانابینوئیدها در فرایند تسهیل سیستم دوپامینی مزولیمبیک نقش دارند (۱۹). همچنین مشخص شده نورون های دوپامینی در ساقه مغز تولید ایمپالس های مهارتی IPSP می کنند (۲۰). از طرفی آوران های مهمی از ساقه مغز به هیپوکامپ می رسد (۲۱) که می توانند ایمپالس های مهارتی را به هیپوکامپ برسانند. در بررسی حاضر کاهش نورونی در ناحیه هیپوکامپ ممکن است به دلیل افزایش فعالیت نورون های دوپامینرژیک در ساقه مغز باشد.

مطالعات نشان داده که سیستم کانابینوئیدی آندوژن موجب ضعف در یادآوری می شود و مشخص شده که اندوکانابینوئیدها بر رسپتورهای CBI در آمیگدال و سیستم لیمبیک اثر می گذارد و از طریق یک تاثیر مهارتی بر روی شبکه های نورونی (توسط نورون های GABA) موجب کاهش حافظه می شوند (۲۲). احتمال می رود کانابینوئیدهای آگزوژن هم پس از ورود، با اثر بر رسپتور های CBI اثر مهارتی بر نورون ها القاء کند و کاهش حافظه را به دنبال داشته باشد.

علاوه بر این مشخص شده که  $\Delta 9$  THC مرگ سلولی را در هیپوکامپ القاء می کند به طوری که با انقباض نورون ها، DNA را در هیپوکامپ قطعه قطعه و متلاشی می کند و سبب آپوپتوز نورون ها می شود و

CA1، CA2 و CA3 هیپوکامپ موش صحرایی دارد. لذا عصاره آبی برگ گیاه مذکور نه تنها نمی تواند اثرات نوروپروتکتیوی در هیپوکامپ القاء کند بلکه دانسته نرونی را در این نواحی کاهش می دهد و نمی توان از آن جهت درمان بیماری های مربوط به اختلالات حافظه استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی:

این مقاله حاصل پایان نامه برای اخذ درجه کارشناسی ارشد بود. تحقیق در گروه زیست شناسی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد صورت گرفت که از تمام همکاران گروه زیست شناسی و مدیریت محترم گروه سرکار خانم دکتر محمودزاده و ریاست محترم دانشکده علوم آقای دکتر هروی جهت همکاری های بی دریغشان تشکر و قدردانی می شود.

ممکن است دلیلی برای اختلال حافظه بعد از استعمال شدید ماری جوانا باشد. فعال شدن گیرنده های CB1 با دلتا ۹ تتراهیدروکانابینول ممکن است ایجاد رادیکال های آزاد کند که به نوبه خود منجر به پراکسیداسیون چربی و مرگ سلولی می شود (۸). همچنین محققین نشان دادند ماده موثره گیاه مذکور با تولید رادیکال های آزاد بوسیله آنزیم های سیکلواکسیژناز ایجاد سمیت عصبی نیز می کند. مطالعات بخشی از کاهش حافظه را به ایجاد سمیت القاء شده توسط کانابینوئیدها مرتبط می دانند (۹). چنانچه با نتایج حاصل از تحقیق ما همسویی دارد.

### نتیجه گیری:

این مطالعه نشان می دهد که تزریق عصاره آبی برگ گیاه کانابیس ساتیوا به مدت سه هفته (هر هفته ای یک بار) اثر کاهشی بر تعداد نوروئین های نواحی

### منابع:

1. Kandel ER, Schavart JH, Jessel TM. Pricipels of neural science. 4<sup>th</sup> ed. NewYork: McGraw Hill; 2000.
2. Ganong WF. Medical physiology. 21<sup>st</sup> ed. NewYork: McGraw Hill; 2007.
3. Gorden MS. Neurobiology. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.
4. Jackson C, McCabe B, Nicol A, Brown M, Horn G. Dynamic of memory trace: effects of sleep on consolidation. J Curr Biol. 2008; 18(6): 393-400.
5. Baringa M. How cannabinoids work in the brain. J Science. 2001; 291(5513): 2530-1.
6. Di marzo V. Abrief history of cannabinoid and endocannabinoid pharmacology as inspired by the work of British scientists. Trends Pharmacol Sci. 2006; 27(3): 134-40.
7. Kosiorek P, Hryniewicz A, Bialuk L, Zawwadzka A, Winnicka MM. Cannabinoids alter recognition memory in rat. Pol J Pharmacol. 2004; 55(5): 903-10.
8. Chan G, Hinds TR, Impey S, Storm D. Hippocampal neurotoxicity of Delta 9-tetrahydrocannabinol. J Neurosci. 1998; 14(18): 5322-32.
9. Lupica CR, Riegel AC. Endocannabinoid release from midbrain dopamine neurons: a potential substrate for cannabinoid receptor antagonist treatment of addiction. Neuropharmacology. 2005; 48(8): 1105-16.
10. Mohini R, Deepak CD. The acute effects of cannabinoids on memory in humans. J Psychopharmacology. 2006; 188(4): 425-44.

11. Solowiji N, Battisti R. The choronic effects of cannabis memory in humans. *Curr Drug Abuse*. 2008; 1(1): 81-98.
12. Braida D, Sala M. Function of cannabinoid –induced working memory impairment is reversed by second generation choline strasel inhibitor in rats. *Neuroreport*. 2000; 11(9): 2025-9.
13. Murillo-rodriguez E. The role of the CB1 receptor in the regulation of sleep. *Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2008; 32(6): 1420-7.
14. Bilkei-Gorzo A, Racz I, Valverde O, Otto M, Michel K, Sastre M, et al. Early age-related cognitive impairment in mice lacking cannabinoid CB1 receptors. *proc. Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(43): 15670-5.
15. Kyari MZ. Extraction and characterization of seed oil. *Int. Agro Physics*. 2008; 22: 139-42.
16. Tehranipour M, Ghadamyari T. Neurotective effect of salvia stamina alcoholic extract on peripheral nerve degeneration after sciatic nerve compression in rat. *Pharmacology Online*. 2009; 3: 679-87.
17. Behnam-Rasuli M, Nikravesh M, Mahdavi-shahri N, Tehranipour M. [Post operative time effect after siatic nerve crush on the number of alpha motonrurons, using a stereological counting method (Disector). *Iran Biomed J*. 2000; 4(1): 45-9.]Persian
18. Izquierdo I, Orsingher O. Effect of Cannabinoidiol and of other Cannabis Sativa compounds on hippocampal seizure Discharges. *Psychopharmacologia*. 1973; 28(1): 95-102.
19. Liang-Wu F, John CL. Electroacupuncture modulates vIPAG release of GABA through presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *J Appl Physiol*. 2009; 106(6): 1800-9.
20. Annette DD, Stephan CW. Endocannabinoid and thir receptors as targets for obesity therapy. *J endocrinology*. 2009; 150(6): 2531-6.
21. Hui F, Cavazos JE, Tien RD. Hippocampus normal magnetic tesonans imegin anatomy. *Neuroimaging Clin N Am*. 1997; 7(1): 11-30.
22. Fu LW, Longharst JC. Electroacupuncture modulates vIPAG release of GABA through presynaptic cannabinid CB1 receptors. *J Appl Physiol*. 2009; 106(6): 1800-9.

## **Evaluation of *Cannabis sativa* leaves aquatic extract effect on triple regions of hippocampus neuronal density in male rats**

Tehranipour M (PhD), Kehtarpour M (MSc)\*, Javadmoosavi BZ (MSc), Mahdavi-Shahri N (PhD)

Biology Dept., Islamic Azad University, Mashhad Branch, Mashhad, I.R. Iran.

Received: 5/Mar/2011

Revised: 20/Dec/2011

Accepted: 5/Mar/2012

**Background and aims:** More than sixty one substances have been found in *Cannabis sativa* which are called cannabinoids. Cannabinoids are involved in all stages of memory. The aim of this study was to evaluate the effects of leaves aquatic extract of *Cannabis sativa* on the neuronal density of CA1, CA2 and CA3 of Hippocampus in rats.

**Methods:** In this experimental study twenty four male Wistar rats (weight 300-350 g) were divided into two experimental and one control groups. *Cannabis sativa* was extracted with Soxhlet apparatus. Aquatic extract was injected intraperitoneally (I.P.) in experimental groups with two dosages (50 mg/kg and 25 mg/kg) for three weeks. After one month, animals were decapitated and their brains were dissected, fixed in 10% formalin, sectioned in 7µm thickness and stained by hematoxylin-eosin (HE). By applying dissector techniques and systematic random sampling scheme the neuronal density of CA1, CA2 and CA3 of Hippocampus were estimated. Then, the numerical density in each group compared with control group using t-test and ANOVA statistics and Tukey test by Minitab 13 software.

**Results:** Neuronal density average of CA1 area in control, experimental 1 and 2 groups were  $37396 \pm 553$ ,  $10081 \pm 233$  in CA1 and  $10986 \pm 382$ , CA2 area  $33045 \pm 449$ ,  $14648 \pm 284$  and  $17147 \pm 378$  and in CA3 area  $26324 \pm 437$ ,  $10469 \pm 215$  and  $13829 \pm 359$  respectively. Statistical analyses showed significant decrease ( $P < 0.001$ ) in the CA1, CA2 and CA3 of Hippocampus neuronal density in experimental groups compared to control group.

**Conclusion:** Aquatic extract of *Cannabis sativa* leaves has cannabinoids substances that may effectively increase dopamine release and inhibit the production of impulse and induce neuronal degeneration in Hippocampus leading to reduction of the neuronal density of Hippocampus.

**Keywords:** Cannabinoid, *Cannabis sativa*, Hippocampus, Memory.



**Cite this article as:** Tehranipour M, Kehtarpour M, Javadmoosavi BZ, Mahdavi-Shahri N. [Evaluation of *Cannabis sativa* leaves aquatic extract effect on triple regions of hippocampus neuronal density in male rats. J Sharekord Univ Med Sci. 2012 Apr, May; 14(1): 20-27.] Persian

**\*Corresponding author:**

Hazrat Zeynab institute, area no 6, Education training office, Mashhad, I.R. Iran. Tel: 00985118828717, E-mail: kehtarpourmaryam@yahoo.com