مجله‌ی علمی، پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان
دوره‌ی ۱۸، شماره‌ی ۷۰، بهار ۱۳۸۹، صفحات ۱۰ تا ۲۱

تاثیر تزریق L- آرژنین بر یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با WIN55, 212-2 در مدل یادگیری اجتنابی مهاری

دکتر مرتضی پیری[۱]، دکتر محمد ناصحی[۲]، دکتر محمد رضا زرین دست[۳]

نویسنده‌ی مسئول: اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، دانشکده‌ی علوم biopiri@yahoo.com

دریافت: ۸۷/۱۲/۱۰ پذیرش: ۸۸/۷/۱۱

چکیده

زمینه و هدف: *کانابینوئیدها جزو داروهای مقلد حالات روانی می‌باشند که انواع مختلف حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار می‌دهند، در این پژوهش اثر L- آرژنین پیش ساز نیتریک اکساید که به عنوان آگونیست نیتریک اکساید عمل می‌نماید، بر یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با WIN55, 212-2 در موش‌های کوچک آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت، تا برهم‌کنش بین سیستم کانابینوئیدی و نیتریک اکساید در زمینه‌ی یادگیری وابسته به وضعیت کانابینوئیدها در هیپوکامپ پشتی مورد بررسی قرار گیرد.*

روش بررسی: *روش اجتنابی مهاری (غیر فعال) با مدل Step-Down برای بررسی حافظه در موش‌های سوری بکار گرفته شد و حافظه‌ی حیوان ۲۴ ساعت بعد از آموزش مورد بررسی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *تزریق درون مغزی WIN55, 212-2 (۰/۵ و ۱ میکروگرم به هر موش) در روز آموزش به تخریب حافظه‌ی حیوانات منجر شد. حافظه‌ی تخریب شده با تزریق WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) در روز آموزش به طور کامل با به‌کار بردن همان مقدار از WIN55, 212-2 در روز آزمون به حالت عادی برگشت. تزریق L-آرژنین (۰/۳، ۱ و ۳ میکروگرم به هر موش) به تنهایی قبل از آزمون تاثیری بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری نداشت .در حالی که، تزریق قبل از آزمون این دارو می‌تواند حافظه‌ی تخریب شده با WIN55, 212-2 را اصلاح کند. به‌علاوه به‌کار بردن مقدارهای غیر موثر WIN55, 212-2 وL-آرژنین، همراه با هم در روز آزمون می‌تواند حافظه‌ی تخریب شده با WIN55, 212-2 اصلاح کند.*

نتیجه‌گیری: *این یافته‌ها نشان می‌دهد که نیتریک اکساید در یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد شده توسط تزریق درون مغزی WIN55, 212-2 در هیپوکامپ پشتی موش سوری دخیل می‌باشد و آن را تحت تاثیر قرار می‌دهد.*

واژگان کلیدی: WIN55, 212-2 ، L- آرژنین، نیتریک اکساید، یادگیری وابسته به وضعیت، موش کوچک آزمایشگاهی

مقدمه

کانابینوئیدها جزو داروهای مقلد حالات روانی می‌باشد که از گیاه شاه‌دانه استخراج می‌شود و از هزاران سال قبل توسط انسان مورد استفاده بوده‌اند. اثرات کانابینوئیدها از بسیاری جهات مشابه اپیوییدها می‌باشد، کانابینوئیدها به مانند

۱- دکترای فیزیولوژی جانوری، مربی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل
۲- دکترای فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار
۳- دکترای فارماکولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز مطالعات اعتیاد

اپیوییدها دارای اثرات ضددرد و ضدالتهابی بوده، باعث سرکوب سیستم ایمنی بدن و القای فراموشی می‌شوند (۱). کشف لیگاندهای آندوژن کانابینوئیدها مانند آنانداميد و دی آراشیدونیل گلیسرول که از طریق گیرنده‌های کانابینوئیدی عمل می‌نمایند، باعث شد که اثرات درمانی کانابینوئیدها بیشتر مورد توجه قرار گیرد (۲). کانابینوئیدها از طریق دو نوع گیرنده‌ی اصلی که CB1 و CB2 نامیده می‌شود اثرات خود را القا می‌نمایند. گیرنده‌های CB1 به مقدار زیاد در بخش‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی مانند قشر مغز، عقده‌های قاعده‌ای، آمیگدال و ساختارهای هیپوکامپ که نقش اساسی در حافظه و یادگیری دارند بیان می‌شود، اما به مقدار کم در بافت‌های محیطی نیز یافت می‌شود، در حالی‌که گیرنده‌های CB2 بیشتر در سلول‌های ایمنی محیطی بیان می‌شود و بیان آن در سیستم عصبی مرکزی بسیار کم است. (۳)مطالعه روی گیرنده‌های کانابینوئیدی و خصوصیات فارماکولوژیک آن‌ها با ساخت آگونیست‌ها و آنتاگونیستی متنوع تسهیل شده است. WIN55, 212-2 یک آمینو آلکالوئید است، که به عنوان آگونیست کانابینوئیدی عمل می‌نماید و می‌تواند با سیستم‌های نورترانس میتری و کانال‌های یونی مختلف برهم‌کنش نشان دهد (۴). نشان داده شده است که کانابینوئیدها و اپیوییدها هر دو با سیستم‌های نورترانس میتری مختلف نظیر دوپامین (۵)، سروتونین (۶)، گابا (۷) و نیتریک اکساید (۸) برهم‌کنش نشان می‌دهند و از این طریق باعث تغییرات پایدار و درازمدت در الگوهای رفتاری مختلف می‌شوند (۹). نیتریک اکساید به عنوان یک پیک ثانویه در سیستم عصبی مرکزی و محیطی عمل می‌نماید (۱۰). مطالعات نشان می‌دهد که نیتریک اکساید در ایجاد تقویت دراز مدت سیناپسی LTP نقش دارد (۱۱). همچنین در سیستم عصبی مرکزی، نیتریک اکساید در القای اثرات کانابینوئیدها نقش مهمی بر عهده دارد (۱۲)، گزارش شده است که WIN55, 212-2 بیان نیتریک اکساید سنتتاز را تعدیل می‌نماید (۱۳). آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز، تولید نیتریک اکساید را کاتالیز می‌نماید و از طریق ایجاد LTP می‌تواند حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار دهد (۱۴). هیپوکامپ نقش اساسی در حافظه و یادگیری دارد (۱۵). مطالعات نشان می‌دهد که نیتریک اکساید و کانابینوئیدها به واسطه‌ی اثر بر روی هیپوکامپ می‌توانند حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار دهند (۱۶). بنابراین در این مطالعه برای اولین بار، بر هم‌کنش بین سیستم کانابینوئیدها و نیتریک اکساید در زمینه‌ی یادگیری وابسته به وضعیت کانابینوئیدها در هیپوکامپ پشتی مورد بررسی قرار گرفت. یادگیری وابسته به وضعیت، پدیده‌ای است که در آن یادآوری اطلاعات تازه کسب‌شده تنها در شرایطی صورت می‌گیرد که فرد از لحاظ حسی و فیزیولوژیک در همان شرایط قرار گیرد که اطلاعات در آن شرایط کد شده است (۱۸و ۱۷). برای بررسی حافظه در این مطالعه از حافظه‌ی اجتنابی مهاری مدل Step-Down استفاده شده است.

روش بررسی

در این مطالعه‌ی تجربی از موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI (وزن تقریبی ۲۲تا۳۰ گرم) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد، استفاده گردید. حیوان‌ها به حیوان‌خانه‌ی تحقیقاتی منتقل شده، در طول آزمایش‌ها آب و غذای کافی در اختیار موش‌ها قرار گرفت. دمای حیوان‌خانه بین ۳ ± ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد متغیر بود. قبل از جراحی به مدت یک هفته به موش‌ها اجازه داده شد که خود را با شرایط حیوان‌خانه تطبیق دهند. موش‌ها در گروه ده‌تایی قرار داده شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام شد. دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری غیر فعال Inhibitory (Passive) Avoidanse Apparatus، مدل Step-Down، شامل جعبه‌ی چوبی به ابعاد (۴۰×۳۰× ۳۰) سانتی‌متر بود که کف دستگاه دارای ۲۹ میله‌ی فولادی با قطر

۰/۳ سانتی‌متر و به فاصله‌ی ۱ سانتی‌متر از یکدیگر قرار داشت. یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد (۴×۴×۴) سانتی‌متر در قسمت میانی کف دستگاه (روی میله‌های فلزی) قرار گرفته بود، این میله‌ها به دستگاه تحریک‌کننده متصل شده، شوک الکتریکی از طریق این میله‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد شد. آزمایش‌ها در اتاق نسبتاً تاریک و بدون سر و صدا انجام گردید.

در این تحقیق داروهای WIN55، 212-2 (تاکریس، آمریکا) و L- آرژنین (سیگما، آمریکا) مورد استفاده قرار گرفت. WIN55, 212-2 در محلول حاملی حل شدند که ۹۰ درصد آن سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹ درصد استریل و ۱۰ درصد باقیمانده، دی متیل سولفوکسید (DMSO) بود که سرانجام به محلول فوق یک قطره روغن توئین ۸۰ اضافه شد. L- آرژنین نیز بلافاصله قبل از آزمایش‌ها در سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹ درصد حل شدند.

روش جراحی و کانول گذاری در ناحیه‌ی هیپوکامپ پشتی (CA1): موش‌های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید Ketamine Hydrochloride (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به‌علاوه‌ی گزیلزین Xylazine (۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند. بر اساس اطلس پاکسینوس [Paxinos (۲۰۰۱)]، کانول راهنما (G ۲۲) یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، قرار داده شد (۱۹). مختصات ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی عبارت از ۲- =AP، ۱/۶+ =ML، ۱/۵- =V بود. 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 دوره‌ی بهبودی پس از جراحی (Recovery) را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردد.

آزمون‌های رفتاری: روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه در موش‌های صحرایی در دو روز متوالی انجام شد. روز اول یا روز آموزش (Training Day) شامل آموزش دادن حیوان‌ها در دستگاه بوده، در روز دوم یا روز آزمون (Testing Day) میزان حافظه‌ی حیوان‌های آموزش دیده بررسی شد.

مرحله‌ی آموزش: در روش اجتنابی مهاری مدل Step-Down، هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار گرفت و مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت شد. در صورتی که هر موش بیش از ۲۰ ثانیه روی سکو می‌ماند، آن موش حذف می‌شد. بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای موثر بر روی میله‌های فولادی به مدت ۱۵ ثانیه شوک الکتریکی (۱هرتز، ۰/۵ ثانیه و ۴۵ ولت مستقیم) دریافت شد. شوک توسط یک محرک (Grass S44, West Warnick, RI, USA) به میله‌های فولادی انتقال داده شد (۲۰). مراحل آموزش در بین ساعت ۸ صبح الی ۲ بعدازظهر انجام گرفت.

مرحله‌ی آزمون یا بررسی حافظه: جلسه‌ی آزمون ۲۴ساعت بعد از آموزش با پروسه‌های مشابه آموزش انجام شد. در این روز شوکی دریافت نشد. مدت زمان توقف موش بر روی سکو به عنوان معیار حافظه در موش اندازه‌گیری شد که حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو برابر با ۳۰۰ ثانیه می‌باشد (۲۱).

تزریق درون مغزی دارو: برای تزریق دارو پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن ۲۷ گیج دندانپزشکی که ۹ میلی‌متر طول داشت و به کت دان تیوب (Cat Down Tupe) نوزاد (شماره ۴) متصل بود، در داخل کانول راهنما G ۲۲ قرار داده شده، در کانول ۱ میکرولیتر دارو در مدت ۶۰ تا ۹۰ ثانیه تزریق شد. در طول تزریق به حیوان اجازه داده شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند.

بافت شناسی: پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفرم، با تزریق رنگ متیلن بلو ۱ درصد (۱ میکرولیتر) به داخل هر دو کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شد و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از یک هفته با استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شد، محل ورود کانول به مغز به وسیله‌ی میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده شد. پس از کسب اطمینان از محل قرارگیری کانول‌ها در نواحی مورد نظر اطلاعات حاصل از حیوان مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. در همه‌ی آزمایش‌ها، زمان توقف حیوان روی سکو به صورت میانه (Median) و چارک ثبت گردید. به علت تفاوت‌های خاص زیادی که در پاسخ‌های یادگیری حیوانات و همچنین ظرفیت فراگیری هر حیوان وجود داشت، داده‌ها توسط آنالیزواریانس یک‌طرفه (ANOVA) برای داده‌های غیر پارامتریک (Kruskal- wallis) و به دنبال آن برای بررسی جفت گروه‌ها از روش Mann- Withney, U-test استفاده گردید. در تمام ارزیابی‌های آماری، حداقل P<۰/۰۵، معیار معنی‌دار بودن مقایسه‌ی بین گروه‌ها بود.

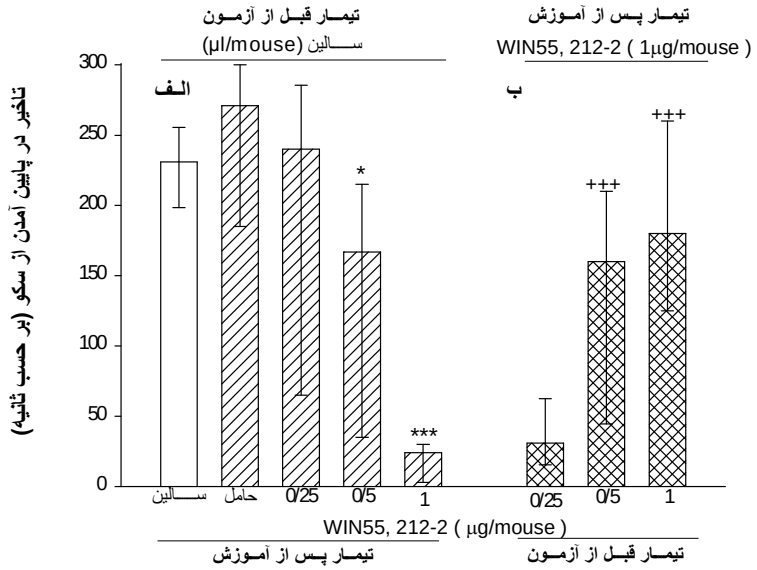
۱- آزمایش اول، بررسی تاثیر تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری: هشت گروه حیوان در این آزمایش به کار رفت. گروه اول و دوم بلافاصله پس از آموزش، سالین و حامل را به صورت درون مغزی (Intra-CA1) دریافت کردند. سه گروه باقی مانده مقادیر مختلف WIN55, 212-2 (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ میکروگرم به هر موش) را بلافاصله پس از آموزش به صورت درون مغزی (Intra-CA1) دریافت کردند، در روز آزمون گروه‌ها قبل از تست سالین (۱ میکروگرم به هر موش) یا حامل (۱ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از تست دریافت داشتند (نمودار ۱ـ الف). سه گروه دیگر بلافاصله بعد از آموزش WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) را دریافت کردند و در روز آزمون مقادیر مختلف WIN55, 212-2 (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی (Intra-CA1) دریافت کردند (نمودار ۱- ب).

۲- آزمایش دوم، بررسی تاثیر تزریق درون مغزی L – آرژنین بر حافظه اجتنابی تخریب شده ناشی از WIN55, 212-2: در این آزمایش هشت گروه حیوان به کار رفت. چهار گروه از حیوانات بلافاصله پس از آموزش سالین (۱ میکروگرم به هر موش) را دریافت کردند و در روز آزمون سالین یا مقادیر مختلف L – آرژنین (۰/۳، ۱، ۳ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی (Intra-CA1) دریافت کردند. چهار گروه دیگر از حیوانات بلافاصله پس از آموزش WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) را دریافت کردند و در روز آزمون سالین یا مقادیر مختلف L – آرژنین (۰/۳، ۱، ۳ میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی (Intra-CA1) دریافت کردند

۳- آزمایش سوم، بررسی تاثیر تزریق درون مغزی L- آرژنین به‌علاوه‌ی WIN55, 212-2 بر حافظه‌ی اجتنابی تخریب شده ناشی از WIN55, 212-2: در این آزمایش هفت گروه حیوان 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، پنج گروه دیگر در روز آموزش WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) را دریافت کردند، در روز آزمون سه گروه از این موش‌ها WIN55, 212-2 (۰/۲۵ میکروگرم به هر موش) یا L – آرژنین (۰/۳، ۱ میکروگرم به هر موش) را به تنهایی دریافت داشت و دو گروه باقی مانده WIN55, 212-2 (۰/۲۵ میکروگرم به هر موش) به‌علاوه L – آرژنین (۰/۳، ۱میکروگرم به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون مغزی (Intra-CA1) دریافت کردند.

یافته‌ها

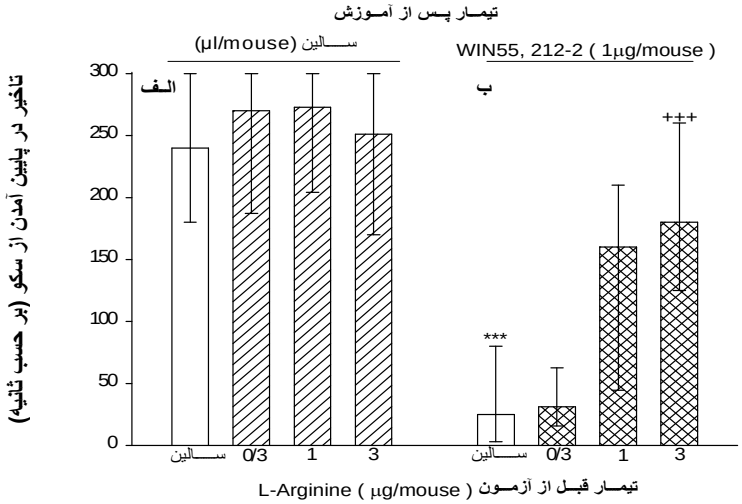
آزمایش اول: نتایج تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری در موش‌های کوچک آزمایشگاهی بر اساس آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه‌ی کوروسکال والیس (Kruskal-Wallis) مشخص شد که تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 حافظه را تغییر می‌دهد (P <۰/۰۰۱، H (۴) = ۲۲/۴۰، ANOVA). انجام آزمون مکمل من ـ ویتنی (Mann-Whithney) نشان داد که تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ میکروگرم به هر موش) تاخیر در پایین رفتن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش داد. به‌علاوه به‌کار بردن WIN55, 212-2 قبل از آزمون قادر به بهبود حافظه‌ی تخریب شده با WIN55, 212-2 در روز آموزش بود (P < ۰/۰۰۱، H (۳) = ۲۳/۵۹، ANOVA). آزمون مکمل من- ویتنی نشان داد که WIN55, 212-2 (۰/۵ و ۱ میکروگرم به هر موش) قادر به بازگرداندن حافظه‌ی تخریب شده بود.



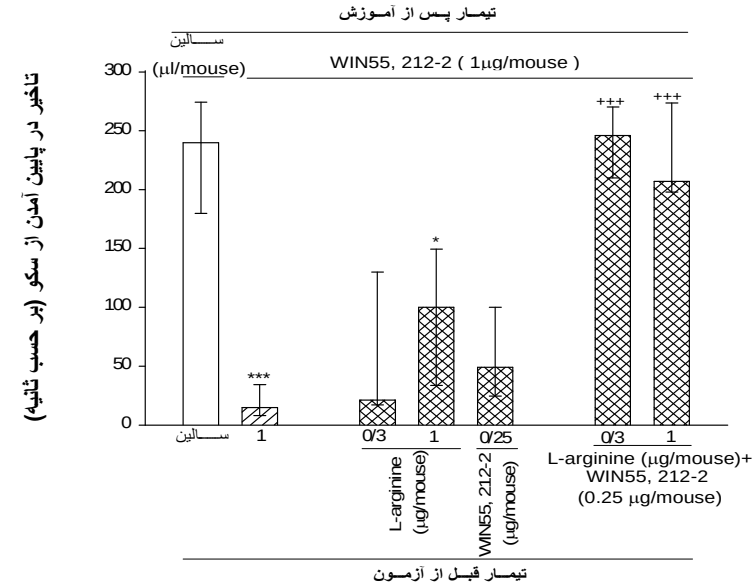
نمودار ۱: آثار تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر حافظه اجتنابی مهاری (نمودار ۱ـالف) و اثر تزریق پیش از آزمون WIN55, 212-2 بر حافظه اجتنابی تخریب شده با WIN55, 212-2 روز آموزش (نمودار ۱ـب). ۰/۰۰۱ >P ، ۰/۰۵ >P* در مقایسه با گروه سالین/ سالین و ۰/۰۰۱ > P+++ در مقایسه با سالین/ WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) می‌باشد.***

۲- آزمایش دوم: نتایج تزریق درون مغزی L-آرژنین قبل از آزمون بر روی حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2 بر اساس آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه‌ی کوروسکال والیس مشخص شد که به‌کار بردن L-آرژنین به تنهایی قبل از آزمون تاثیری بر روی حافظه ندارد (P>۰/۰۵، H (۴) =۰/۶۵، ANOVA)، (نمودار ۲- الف). به‌علاوه تحلیل واریانس یک طرفه‌ی کوروسکال والیس مشخص نمود که به‌کار بردن L-آرژنین قبل از آزمون می‌تواند حافظه‌ی تخریب شده توسط تزریق بعد از آموزش WIN55, 212-2 را تغییر دهد (P <۰/۰۰۱، H (۳) =۱۹/۷۰، ANOVA). آزمون مکمل من- ویتنی نشان داد که L-آرژنین (۱، ۳ میکروگرم به هر موش) می‌تواند حافظه‌ی تخریب

شده با WIN55, 212-2 روز آمـوزش را اصـلاح مـی‌کنـد (نمودار ۲- ب).



نمودار ۲: اثر L–آرژنین بر حافظه‌ی اجتنابی مهاری (نمودار ۲– الف) و بر حافظه‌ی اجتنابی تخریب شده با WIN55, 212-2 (نمودار ۲– ب). ۰/۰۰۱ > P در مقایسه با گروه سالین/ سالین و ۰/۰۰۱ > P+++ در مقایسه با سالین/ WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش).***



نمودار ۳: اثر تزریق هم‌زمان L–آرژنین و WIN55, 212-2 در روز آزمون بر حافظه‌ی تخریب شده توسط WIN55, 212-2 ۰/۰۰۱ > P، ۰/۰۵ >P* در مقایسه با گروه سالین/ سالین و ۰/۰۰۱ > P+++ در مقایسه با سالین/ WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش)***

۳- آزمایش سوم: نتایج تزریق مقادیر غیر موثر L -آرژنین و WIN55, 212-2 همراه با هم بر روی حافظه‌ی تخریب شده توسط WIN55, 212-2 بر اساس آزمون آماری تحلیل واریانس یک طرفه‌ی کوروسکال والیس مشخص شد که به‌کار بردن هم‌زمان مقادیر غیر موثرL-آرژنین و WIN55, 212-2 قبل از آزمون می‌تواند حافظه‌ی تخریب شده توسط تزریق بعد از آموزش WIN55, 212-2 را تغییر دهد (P <۰/۰۰۱، H (۶) = ۳۰/۵۷، ANOVA). آزمون مکمل من - ویتنی نشان داد که مقادیر غیر موثر L-آرژنین (۰/۳ و ۱ میکروگرم به هر موش) همراه با WIN55, 212-2 (۰/۲۵ میکروگرم به هر موش) می‌تواند حافظه‌ی تخریب شده با WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) در روز آموزش را اصلاح کند (نمودار ۳).

بحث

مطالعات نشان می‌دهند که گیرنده‌های CB1 به مقدار زیادی در هیپوکامپ بیان می‌شوند (۲۲). همچنین مطالعات نشان می‌دهد که آگونیست‌های گیرنده‌های CB1 می‌توانند حافظه و یادگیری را تحت تاثیر قرار دهند (۲۳). مطالعات ما نیز نشان می‌دهد که تزریق بعد از آموزش آگونیست غیر اختصاصی گیرنده‌های کانابینوئیدی، WIN55, 212-2 به صورت درون مغزی در هیپوکامپ خلفی به صورت وابسته به مقدار باعث تخریب حافظه می‌شود. نتایج ما با مطالعات پیشین که نشان می‌دهد آگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی باعث تخریب حافظه می‌شود موافق می‌باشد (۲۴). نظر به این‌که بیشتر مطالعات پیشین با استفاده از حیوانات ترنس ژنیک و یا با استفاده از تزریق محیطی کانابینوئیدها صورت گرفته بود تعیین محل اثر کانابینوئیدها بر اساس مطالعات گذشته ممکن نبود (۲۶ و ۲۵). گزارش شده است که آندوکانابینوئیدها از نورون‌های پس‌سیناپسی آزاد می‌شود و آزادسازی نورترانس‌میترهای مختلف را از نورون‌های پیش سیناپسی کاهش می‌دهد (۲۷). مطالعات اخیر نشان می‌دهند که گیرنده‌های CB1 در پایانه‌ی آکسونی نورون‌های گلوتاماتی در هیپوکامپ حضور دارد (۲۸) و انتقال پیام های گلوتاماتی را کنترل می‌نماید (۲۹). بنابراین این احتمال وجود دارد که تخریب حافظه توسط آگونیست گیرنده‌های CB1 به واسطه‌ی کاهش رهایش گلوتامات در هیپوکامپ صورت گیرد. فراموشی القا شده با کانابینوئیدها به نظر می‌رسد که با اثر دارو بر روی فرآیند تثبیت حافظه صورت می‌گیرد (۳۰). فراموشی القا شده با تزریق ۱ میکروگرم WIN55-212-2، به هر موش بعد از آموزش به طور کامل با تزریق همان مقدار دارو پنج دقیقه قبل از آزمون به حالت عادی برمی‌گردد. این نتایج نشان می‌دهد که WIN55-212-2 یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد می‌نماید. یادگیری وابسته به وضعیت پدیده‌ای است که توسط برخی از داروهای مقلد حالات روانی در انسان ایجاد می‌شود (۳۲ و ۳۱). در این پدیده به یادآوری اطلاعات تازه کسب شده تنها زمانی امکان پذیر می‌باشد که جاندار درزمان به خاطر آوردن اطلاعات در همان شرایط فیزیولوژیک قرار گیرد که در زمان کدبندی (Encoding) در آن قرار داشته است (۱۸). سیستم کانابینوئیدی و سیستم اپیوئیدی شباهت‌های زیادی با یکدیگر دارند (۱)، مطالعات پیشین نشان می‌دهند که مرفین یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد می‌نماید (۳۴ و ۳۳) و یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد شده با مرفین با سیستم‌های نورترنس میتری مختلف از جمله دوپامین (۳۵)، هیستامین (۳۶)، استیل کولین (۳۷)، گلوتامات (۳۸)، گابا (۳۹)، کانابینوئیدها (۴۰) و نیتریک اکساید (۳۴) برهم‌کنش نشان می‌دهد. با توجه به شباهت زیاد سیستم کانابینوئیدی و اپیوییدی این احتمال وجود دارد که کانابینوئیدها نیز پاسخ مشابهی را ایجاد نمایند. با وجود تحقیقات زیادی که بر روی یادگیری وابسته به وضعیت صورت گرفته، داروهای متعددی که می‌توانند یادگیری وابسته به وضعیت ایجاد کنند، شناسایی و مورد بررسی قرار گرفته‌اند

و برهم‌کنش آنها با سیستم های مختلف مورد بررسی قرار گرفته است، اما مکانیسم واقعی یادگیری وابسته به وضعیت ناحیه‌ای از مغز که در ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت نقش دارد، هنوز مشخص نمی‌باشد. از طرف دیگر هیپوکامپ بخشی از مغز می‌باشد که نقش اساسی در حافظه و یادگیری دارد (۴۱). همچنین نیتریک اکساید یکی از تعدیل‌کننده‌های اعمال نورون‌ها می‌باشد که در تغییر شکل سیناپسی، تقویت درازمدت سیناپسی و تثبیت حافظه دراز مدت نقش دارد (۴۲). بنابراین در این مطالعه نقش نیتریک اکساید در هیپوکامپ خلفی در یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با WIN55-212-2 مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که تزریق L – آرژنین، پیش ساز نیتریک اکساید، در روز آزمون به تنهایی تاثیری بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری ندارد. به‌علاوه نتایج ما نشان می‌دهد که تزریق L – آرژنین در روز آزمون به موش‌هایی که در روز آموزش تحت تاثیر WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) بوده‌اند، فراخوانی حافظه را به صورت معنی‌داری تسهیل می‌نماید و L – آرژنین قادر است اثرات WIN55, 212-2 روز آزمون را تقلید نماید. نکته‌ی قابل توجه این است که مقادیر کم L – آرژنین به‌علاوه مقدار کم WIN55, 212-2 در روز آزمون به شدت فراخوانی حافظه را در موش هایی که در روز آموزش تحت تاثیر WIN55, 212-2 (۱ میکروگرم به هر موش) بوده‌اند تقویت می‌نماید، به‌گونه‌ای که مقادیر کم و غیر موثر L – آرژنین و WIN55, 212-2 همراه با هم قادر می‌باشند اثرات مقادیر بالای WIN55, 212-2 در روز آزمون را تقلید نمایند. این نتایج موافق با نتایج دیگری می‌باشد که نشان می‌دهد فعال شدن گیرنده‌های کانابینوئیدی باعث افزایش سطح نیتریک اکساید می‌شود (۴۳). بنابراین افزایش سطح نیتریک اکساید ممکن است اثرات WIN55, 212-2 را بر روی یاد آوری اطلاعات کسب شده، تسهیل نماید. سایر مطالعات نشان می‌دهد که تزریق بعد از آموزش L – آرژنین می‌تواند تثبیت حافظه را تسهیل نماید و تخریب حافظه‌ی القا شده با مهار کننده‌های آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز را اصلاح نموده، به حالت عادی برگرداند (۴۴). به‌علاوه فعال شدن گیرنده‌های آمینواسیدهای تحریکی، به ویژه گیرنده‌های NMDA باعث افزایش فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتتاز می‌شود (۴۵) و از این طریق موجب ایجاد اثرات شناختی و غیر شناختی مختلف می‌شود، در حالی‌که مهار کننده‌های نیتریک اکساید سنتتاز می‌توانند بسیاری از اثرات میانجی‌گری شده با گیرنده‌های NMDA را مهار نمایند (۱۱).

نتیجه‌گیری

ملاحظه‌ی اثرات تقویت کننده‌ی L-آرژنین بر روی حافظه‌ی اجتنابی مهاری زمانی که به صورت هم‌زمان با WIN55, 212-2، قبل از آزمون و به صورت درون مغزی در هیپوکامپ پشتی تزریق شود، این احتمال را مطرح می‌نماید که یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با WIN55, 212-2 ساخت و رهایش نیتریک اکساید را افزایش می‌دهد.

References

1- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; 365: 61-5.

2- Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V. Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem.* 1997; 272: 3315-23.

3- Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neur Biol.* 1992; 58: 16-26.

4- Compton DR, Gold LH, Ward SJ, Balster RL, Martin BR. Aminoalkylindole analogs: cannabimimetic activity of a class of compounds structurally distinct from delta 9-tetrahydrocannabinol. *J Pharmacol Exper Therap.* 1992; 263: 1118-26.

5- Rodriguez de Fonseca F, Cebeira M, Fernandez-Ruiz JJ, Navarro M, Ramos JA. Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience.* 1991; 43: 713-23.

6- Molina-Holgado F, Amaro A, Gonzalez MI, Alvarez FJ, Leret ML. Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *Eur J Pharmacol.* 1996; 316: 39-42.

7- Vela G, Martin S, Garcia-Gil L, et al. Maternal exposure to delta9-tetrahydrocannabinol facilitates morphine self-administration behavior and changes regional binding to central mu opioid receptors in adult offspring female rats. *Brain Res.* 1998; 807: 101-9.

8- Jeon YJ, Yang KH, Pulaski JT, Kaminski NE. Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor- kappa B/Rel activation. *Mol Pharmacol.* 1996; 50: 334-41.

9- Viveros MP, Llorente R, Moreno E, Marco EM. Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav pharmacol.* 2005; 16: 353-62.

10- Breder CD, Saper CB. Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain res.* 1996; 713: 64-9.

11- Prast H, Philippu A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol.* 2001; 64: 51-68.

12- Xu X, Boshoven W, Lombardo B, Spranger J. Comparison of the amnestic effects of NMDA receptor antagonist MK-801 and nitric oxide synthase inhibitors: L-NAME and L-NOARG in goldfish. *Behav Neurosci.* 1998; 112: 892-9.

13- Cuellar B, Fernandez AP, Lizasoain I, et al. Up-regulation of neuronal NO synthase immunoreactivity in opiate dependence and withdrawal. *Psychopharmacol.* 2000; 148: 66-73.

14- Wilson RI, Yanovsky J, Godecke A, Stevens DR, Schrader J, Haas HL. Endothelial nitric oxide synthase and LTP. *Nature.* 1997 27; 386: 338.

15- Everitt BJ, Robbins TW. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol.* 1997; 48: 649-84.

16- Farr SA, Flood JF, Morley JE. The effect of cholinergic, GABAergic, serotonergic, and glutamatergic receptor modulation on posttrial memory processing in the hippocampus. *Neurobiol Learning Memory.* 2000; 73: 150-67.

17- Izquierdo I, Dias RD. Memory as a state dependent phenomenon: role of ACTH and

epinephrine. *Behav Neural Biol.* 1983; 38: 144-9.
18- Shulz DE, Sosnik R, Ego V, Haidarliu S, Ahissar E. A neuronal analogue of state-dependent learning. *Nature.* 2000; 403: 549-53.
19- Paxinos G, Franklin, KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. Newyork: Academic Press; 2001.
20- Hiramatsu M, Sasaki M, Kameyama T. Effects of dynorphin A-(1–13) on carbon monoxide-induced delayed amnesia in mice studied in a stepdown type passive avoidance task. *Eur J Pharmacol.* 1995; 282: 185-91.
21- Homayoun H, Khavandgar S, Zarrindast MR. Morphine statedependent learning: interactions with ά2-adrenoceptors and acute stress. *Behav Pharmacol.* 2003; 14: 41-8.
22- Pettit DA, Harrison MP, Olson JM, Spencer RF, Cabral GA. Immunohistochemical localization of the neural cannabinoid receptor in rat brain. *J Neurosci Rese.* 1998; 51: 391-402.
23- Kobilo T, Hazvi S, Dudai Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *Eur J Neurosci.* 2007; 25: 3417-21.
24- Davies SN, Pertwee RG, Riedel G. Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. Neuropharmacol. 2002; 42: 993-1007.
25- Reibaud M, Obinu MC, Ledent C, Parmentier M, Bohme GA, Imperato A. Enhancement of memory in cannabinoid CB1 receptor knock-out mice. *European pharmacol.* 1999; 379: 1-2.
26- Martin BR, Compton DR, Thomas BF, et al. Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol biochem and behav.* 1991; 40: 471-8.
27- Sullivan JM. Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol.* 1999;82: 1286-94.
28- Katona I, Urban GM, Wallace M, et al. Molecular composition of the endocannabinoid system at glutamatergic synapses. *J Neurosci.* 2006; 26: 5628-37.
29- Domenici MR, Azad SC, Marsicano G, et al. Cannabinoid receptor type 1 located on presynaptic terminals of principal neurons in the forebrain controls glutamatergic synaptic transmission. *J Neurosci.* 2006; 26: 5794-9.
30- De Oliveira Alvares L, Genro BP, Diehl F, Quillfeldt JA. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem.* 2008; 90: 1-9.
31- Overton DA. Historical context of state dependent learning and discriminative drug effects. *Behav Pharmacol.* 1991; 2: 253-64.
32- Overton DA. Comparison of the degree of discriminability of various drugs using the T-maze drug discrimination paradigm. *Psychopharmacol.* 1982; 76: 385-95.
33- Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Euro J Pharmacol.* 2004; 497: 197-204.
34- Zarrindast MR, Askari E, Khalilzadeh A, Nouraei N. Morphine state-dependent learning

sensitization and interaction with nitricoxide. *Pharmacol.* 2006; 78: 66-71.

35- Zarrindast MR, Bananej M, Khalilzadeh A, Fazli-Tabaei S, Haeri-Rohani A, Rezayof A. Influence of intracerebroventricular administration of dopaminergic drugs on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Neurobiol Learn Mem.* 2006; 86: 286-92.

36- Khalilzadeh A, Zarrindast MR, Djahanguiri B. Effects of intracerebroventricular administration of ultra low doses of histaminergic drugs on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Behav Brain Res.* 2006; 166: 184-7.

37- Jafari MR, Zarrindast MR, Djahanguiri B. Influence of cholinergic system modulators on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physiol behav.* 2006; 88: 146-51.

38- Ahmadi S, Zarrindast MR, Nouri M, Haeri-Rohani A, Rezayof A. N-Methyl-D-aspartate receptors in the ventral tegmental area are involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neurobiol Learn Mem.* 2007; 88: 352-8.

39- Zarrindast MR, Noorbakhshnia M, Motamedi F, Haeri-Rohani A, Rezayof A. Effect of the GABAergic system on memory formation and state-dependent learning induced by morphine in rats. *Pharmacol.* 2006; 76: 93-100.

40- Zarrindast MR, 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.

41- Wan RQ, Pang K, Olton DS. Hippocampal and amygdaloid involvement in nonspatial and spatial working memory in rats: effects of delay and interference. *Behav Neurosci.* 1994; 108: 866-82.

42- Baratti CM, Kopf SR. A nitric oxide synthase inhibitor impairs memory storage in mice. *Neurobiol Learn Mem.* 1996; 65: 197-201.

43- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature.* 1994; 372: 686-91.

44- Baratti CM, Boccia MM. Effects of sildenafil on long-term retention of an inhibitory avoidance response in mice. *Behav Pharmacol.* 1999; 10: 731-7.

45- Garthwaite J, Garthwaite G, Palmer RM, Moncada S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Euro J Pharmacol.* 1989; 172: 413-6.

Influence of Intracerebral Administration of L-Arginine in Dorsal Hippocampus (CA1) on WIN55, 212-2 Induced State-Dependent Memory

Piri M[1], Nasehi M[2], Zarrindast MR[3]

[1]Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Ardabil branch, Ardabil, Iran.

[2]Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Garmsar branch, Semnan, Iran.

[3]Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Corresponding Author: Piri M. Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Ardabil branch, Ardabil, Iran.

E-mail: biopiri@yahoo.com

Received: 28 Feb 2009 **Accepted:** 3 Oct 2009

Background and Objective: Cannabinoids are a class of psychoactive compounds that produce a wide array of effects in a large number of species. In the present study, the effects of bilateral intra-CA1 injections of L-arginine on WIN55, 212-2 induced state-dependent memory of passive avoidance task was examined in mice.

Materials and Methods: One-trial step-down paradigm was used for the assessment of memory retention in adult male NMRI mice.

Results: Post-training intra-CA1 administration of cannabinoid receptor agonist, WIN55, 212-2 (0.5 and 1 μg/mouse), decreased the memory retrieval. The memory impairment induced by post-training administration of WIN55, 212-2 (1μg/mouse) was restored by pre-test administration of the same dose of the drug, showing the state-dependent memory of WIN55, 212-2. Single intra-CA1 administration of L-arginine (0.3, 1 and 3 μg/mouse) 5 min pre-test could not alter the memory retrieval. On the other hand, in the animals in which retrieval was impaired due to post-training administration of WIN55, 212-2 (1μg/mouse), pre-test intra-CA1 administration of L-arginine (1 and 3 μg/mouse), 24 hr after training restored memory retrieval. Furthermore, in the animals under influence of post-training administration of WIN55, 212-2 (1μg/mouse), pre-test co-administration of non-effective doses of WIN55, 212-2 and L-arginine, increased the restoration of memory by the pre-test WIN55, 212-2.

Conclusion: The findings of the present study suggest that NO system of dorsal hippocampus may play an important role in Win55,212-2-induced amnesia and WIN55,212-2 state-dependent memory.

Key words: WIN55, 212-2, State-dependent memory, Step-down passive avoidance task, L-arginine, NO, Mice