اثر تنظیمی آنتاگونیست گیرنده 5-HT4 هیپوکامپ پشتی (CA1) بر فراموشی ناشی از ACPA در موش کوچک آزمایشگاهی

مریم فرهی‌زاده[1*]، محمدرضا زرین‌دست[2]، محمد ناصحی[3]، مریم بنانج[1]

۱ـ گروه زیست شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲ـ پژوهشکده علوم شناختی، تهران، ایران
۳ـگروه زیست شناسی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: maryam.farrahizadeh@ymail.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۲/۲۶

چکیده

در این پژوهش آثار تزریق دو طرفه آنتاگونیست گیرنده ۴ سروتونینی (RS23597-190) در هیپوکامپ پشتی (CA1) بر حافظه ترس القا شده توسط ACPA در موش‌های کوچک آزمایشگاهی بررسی شد. برای بررسی حافظه ترس در موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI از روش شرطی شدن ترس توسط دستگاه شرطی‌سازی ترس استفاده شد و ۲۴ ساعت پس از آموزش حافظه حیوان مورد بررسی قرار گرفت. تزریق درون صفاقی آگونیست گیرنده CB1 (ACPA) با دوزهای ۰/۰۰۵، ۰/۰۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم باعث تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گردید. بعلاوه، تزریق درون CA1 آنتاگونیست گیرنده 5- HT4 (RS23597-190)، با دوزهای ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ میکروگرم بر موش به تنهایی، اثر چشم‌گیری بر حافظه ترس نداشت. اما تزریق هم‌زمان دوز بی‌اثر آن (۰/۰۱ میکروگرم بر موش) با تمام دوزهای ACPA، تخریب حافظه ترس ناشی از ACPA را برگرداند. نتایج قویاً نشان می‌دهد که هیپوکامپ پشتی نقش مهمی در فراموشی ترس ناشی از کانابینوئیدها دارد. و در این میان سیستم سروتونرژیک ناحیه CA1 در تخریب حافظه ترس القا شده با ACPA اثر می‌گذارد.

کلمات کلیدی: کانابینوئیدها، هیپوکامپ پشتی، سیستم سروتونرژیک، RS23597-190، دستگاه شرطی‌سازی ترس

مقدمه

پاک‌سازی خاطرات را به طور کلی می‌توان مقوله‌ای درمانی به شمار آورد. بسیاری از مردم از عوارض تجربه-ها و خاطرات ناگوارشان مدام در رنج و عذابند و برایشان ناراحتی‌های روانی مزمن ایجاد می‌شود. در چنین شرایطی تنها کاری که معمولاً برای تسکین دردهای این مردم از دستمان بر می‌آید، روان درمانی و تجویز آرام بخش است و گرنه تا امروز که هیچ روش درمانی کامل برای این قبیل بیماران نداریم. طبیعی است که بهترین مرهم برای چنین دردهایی آن است که از ریشه، آنها را براندازد. یعنی آنکه این تصورات ترسناک را از ذهن‌ها بزداید [۱۵]. هر چند تا رسیدن به این هدف و کاربردی کردن آن، تحقیقات بسیار لازم است و این موضوع باید از زوایای مختلف مورد بررسی قرار گیرد، اما به هر حال دانشمندان علوم اعصاب تاکنون به دستاوردهای بسیار مفید و جالبی در این زمینه دست یافته‌اند. کانابینوئیدها ترکیبات موجود در گیاه شاهدانه و آنالوگ‌های صناعی از مشتقات اسیدهای چرب به ویژه اسیدآراشیدونیک می‌باشند. آثار کانابینوئیدها عبارتند از: کاهش حرکت، بی‌حرکتی همراه با سفتی، کاهش دمای بدن، آثار ضددردی و غیره. هزاران سال است که حشیش و ماری‌جوانا که هر دو از گیاه شاهدانه به دست می‌آیند. حشیش از گونه شاهدانه هندی با نام علمی *Cannabis indica* و ماری جوانا از گونه شاهدانه آمریکای مرکزی با نام علمی *Cannabis sativa* به دست می‌آیند. به علت آثار دارویی و نیز مقلد حالات روانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اثرات کانابینوئیدها از بسیاری از جهات مشابه اپیوئیدها می-

باشد. کانابینوئیدها به مانند اپیوئیدها دارای اثرات ضددرد و ضد التهابی می‌باشند و باعث سرکوب سیستم ایمنی بدن و القای فراموشی می‌شوند [۳۰]. تاکنون سه نوع گیرنده کانابینوئیدی به نام‌های CB1، CB2 و CB3 شناسایی شده‌اند. گیرنده‌های CB1 به مقدار زیاد در بخش‌های مختلف سیستم عصبی مرکزی، مانند قشر مغز، عقده‌های قاعده‌ای، آمیگدال و تشکیلات 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 می‌شوند و بیان آن در سیستم عصبی مرکزی بسیار کمتر است [۲، ۴ ، ۲۲،۶، ۲۳ و ۴۷] بنابراین بسیاری از آثار روانشناختی کانابینوئیدهای درون‌زاد توسط گیرنده CB1 میانجیگری شده و در تأیید این مطلب تحقیقات گسترده‌ای وجود دارد [۱۰]. قابل توجه این‌که هردو گیرنده‌های کانابینوئیدی واپیوئیدی درغشاء پیش-سیناپسی قرار گرفته و منجر به کاهش رهاسازی میانجیگرهای عصبی می‌شوند و هر دو سیستم در بسیاری از مناطق مغز اثرات مشابه و هم‌پوشانی دارند، به عنوان مثال مهار آدنیلات سیکلاز، مهار کانال کلسیم، فعال‌سازی کانال پتاسیم و از طرف دیگر پاسخ‌های اپیوئیدها و کانابینوئیدها به ترتیب توسط آنتاگونیست‌های کانابینوئیدها و اپیوئیدها مهار می‌شوند [۱۲]. از طرف دیگر مطالعات گسترده نشان داده است که سروتونین (۵-هیدروکسی تریپتامین) ماده شیمیایی مهمی در مغز است که به عنوان نوروترانسمیتر شناخته می‌شود. بدون وجود سروتونین به مقدار کافی بسیاری از فعالیت‌های بدن و از جمله حالات روحی تحت تأثیر قرارمی‌گیرند [۳۸، ۴۵]. هنگامی که نور از چشم‌ها عبور کرده به مغز می‌رسد سروتونین آزاد می‌شود. سروتونین که باعث دپلاریزاسیون سلول پس‌سیناپسی می‌شود مسئول کنترل فعالیت‌های فیزیولوژیک بسیاری از جمله: ۱-خواب ۲- تعدیل حالات و رفتارهای روانی ۳- اشتها ۴- حافظه ۵- فعالیت‌های جنسی ۶- تحریک حرکات دودی روده ۷- آزادشدن پلاکت در طی فرایند انعقاد خون و ... است. سروتونین نقش مهمی در فرایندهای شناختی دارد و انتقال عصبی سروتونین در برخی فرایندهای یادگیری و ثبت حافظه و تنظیم آن مورد نیاز است [۳، ۲۰]. مطالعات رفتاری تداخل مستقیم بین کانابینوئیدها و بعضی از سیستم‌های میانجیگر عصبی شامل سیستم‌های دوپامینرژیک، سروتونرژیک، گابائرژیک و اپیوئیدرژیک را پیشنهاد می‌کنند که از طریق این سیستم‌ها تغییر الگوهای رفتاری را باعث شوند [۲۷، ۲۹، ۳۱، ۴۰، ۴۵]. هیپوکامپ به ویژه ناحیه پشتی هیپوکامپ (CA1) از مهم‌ترین بخش‌های مغزانسان و مهره‌داران مخصوصاً پستانداران است و نقش مهمی در تبدیل حافظه کوتاه مدت به بلند مدت، حافظه فضایی و نیز جهت‌یابی دارد. آسیب به این ناحیه منجر به اختلالات جدی درعملکرد حافظه ازجمله ایجاد فراموشی، آلزایمر و دیگر مشکلات حافظه‌ای خواهد شد [۱۹]. با توجه به مطالب گفته شده و پژوهش-های صورت گرفته، در ادامه‌ی کارهای گذشته ما به بررسی سیستم سروتونرژیک CA1 (آنتاگونیست گیرنده ۴) بر فراموشی ترس ناشی از ACPA با استفاده از متد شرطی‌سازی ترس پرداختیم که تا کنون چنین بررسی انجام نگرفته است.

مواد و روش کار

در این پژوهش موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI در ۱۲ گروه ۱۰ تایی(کنترل و تجربی) در محدوده وزنی ۲۳ – ۲۷ گرم و محدوده سنی ۲ ماه مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی کنترل شده با دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ۷ صبح) و دمای ۲±۲۲ سانتی‌گراد نگهداری می‌شدند. آب و غذا به جز در هنگام جراحی و آزمایش‌ها، باید به طور کامل در اختیار حیوانات قرار داده می‌شد. در هر گروه ۱۰ حیوان قرار داد شد و از هر حیوان تنها یک بار استفاده شد. به منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوان‌ها لمس می‌شدند. همه تست‌ها در روز بین

ساعات ۹ صبح تا ۳ بعد از ظهر در اتاق با نور کم انجام گرفت.تمام حیوانات متعلق به حیوان‌خانه پژوهشکده علوم شناختی بوده و همه آزمایش‌ها نیز در آزمایشگاه این پژوهشکده انجام گرفت.

دستگاه شرطی سازی ترس (Fear Condition): شامل جعبه‌ای به ابعاد ۶۷×۵۳×۵۵ می‌باشد. دیواره‌های داخلی جعبه توسط صفحات آکوستیک پوشیده شده است. در سقف جعبه دوربینی برای مشاهده حیوان و دو عدد بلندگو برای پخش صوت نصب شده است. این بلندگوها به کامپیوتری که در آن برنامه تولیدکننده صوت نصب شده است، متصل است. یک لامپ با نور ۲۴ وات در گوشه‌ای از جعبه نصب گردیده است.جعبه شرطی‌سازی با ابعاد ۲۵×۲۵×۲۵ درون جعبه آکوستیک قرار می‌گیرد. در کف این جعبه میله‌های موازی از جنس استیل با قطر D = ۰/۳ cm و به فاصله موازی ۱ cm قرار دارد که به دستگاه شوکر متصل است.دستگاه مذکور ساخت شرکت برج صنعت ایران می‌باشد. تصویر دستگاه مذکور در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

شکل ۱ـ دستگاه Fear conditioning جهت سنجش حافظه ترس شرطی شده

طرز تهیه محلول‌های دارویی: همه داروهای مصرفی در سالین حل شدند و بعد از حل شدن، دور از نور و در ظرف‌های مخصوص، درون فریزر (دمای حدود ۴-) نگهداری می‌شدند. بالاترین و غلیظ‌ترین دوز به عنوان دوز مادر تهیه و دوزهای رقیق‌تر از آن ساخته شدند. همه داروها ساخت شرکت آمریکایی Tocris می‌باشند.

برای تهیه داروهای درون مغزی (ICV)(RS23597-190) ۰/۲ میلی‌گرم از داروی مورد نظر را در ۱ سی‌سی سالین حل کردیم و به این صورت محلولی با غلظت ۰/۲ میکروگرم بر موش به دست آمد. برای تهیه داروهای درون صفاقی (IP) (ACPA) ۰/۲ میلی‌گرم از داروی مورد نظر را در ۰/۲ سی‌سی سالین حل کردیم و به این صورت محلولی با غلظت ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم به دست آمد.

روش جراحی و کانول گذاری در هیپوکامپ پشتی: حیوانات با محلول زایلازین و کتامین رقیق شده بیهوش می‌شدند و جهت تثبیت و مختصات برداری در دستگاه استرئوتاکس قرار می‌گرفتند. با استفاده از اطلس پاکسینوس محل کانول‌گذاری (CA1 هیپوکامپ ۲ طرفه) مشخص شد. سپس با استفاده از سیمان دندان پزشکی، کانول‌ها بر روی جمجمه تثبیت می‌گردند.

مختصات ناحیه CA1:

AP = - 2.3 mm (از نقطه برگما)

ML = ± 2 mm (از خط وسط)

DV = - 1.2 mm (از سطح جمجمه)

پس از بهبودی محل جراحی(۵-۷ روز پس از کانول گذاری)، تزریق دارو و آموزش به حیوان آغاز شد.

آزمون‌های رفتاری: سنجش حافظه به روش شرطی‌سازی ترس در دو روز متوالی انجام می‌شود. روز اول مرحله آموزش، روز دوم مرحله آزمون.

مرحله آموزش (روز اول) : اتاق آزمایش های مربوطه را ابتدا با الکل یا اسیداستیک ضدعفونی می‌کنیم.سپس از موقعیت دوربین‌ها مطمئن خواهیم شد.

فاز اول: حیوان را به مدت ۲ دقیقه در اتاق نگه می‌داریم تا به محیط انس بگیرد.

فاز دوم: حیوان را به مدت ۳۰ – ۲۸ ثانیه در معرض صدا قرار می‌دهیم.

فاز سوم: حیوان را به مدت ۲ ثانیه تحت تأثیر شوک قرار می‌دهیم. ۳۰ ثانیه پس از دریافت آخرین شوک حیوانات را از اتاق خارج می‌سازیم و به حیوان‌خانه منتقل می‌نماییم.

مرحله آزمون (روز دوم): انجام آزمون بعد از ۲۴ ساعت صورت می‌گیرد.آزمون ۲ مرحله دارد. حیوان به مدت ۵ دقیقه بدون صدا و شوک درون اتاقک شرطی‌سازی قرار می‌گیرد. پس از یک ساعت حیوان به مدت ۳ دقیقه درون اتاقک شرطی‌سازی در معرض صدا قرار می‌گیرد. از Freezing number در این دو مرحله به عنوان معیاری برای سنجش یادگیری و حافظه استفاده می‌شود.

تزریق درون صفاقی و درون مغزی دارو : برای تزریق داروی درون صفاقی از سرنگ انسولین ۱ سی‌سی استفاده شد. برای این منظور دقیقا هم وزن هر حیوان به آن دارو تزریق شد. برای تزریق داروی درون مغزی از کانول تزریقی که یک میلی‌متر بزرگ‌تر از کانول راهنما بود استفاده شد. برای تزریق از سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتر استفاده شد و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو به مدت ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق شد.

بافت‌شناسی: پس از کشتن حیوان‌ها با تزریق رنگ متیلن بلو ۱٪ (۰/۵ µl) به درون هر دو کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار می‌گرفت پس از یک هفته با استفاده از دستگاه ویبرواسلایس برش‌هایی تهیه شد و محل ورود کانول به مغز به وسیله 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.

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایش، از روش تحلیل واریانس یک طرفه و دوطرفه و آزمون توکی استفاده گردید. اختلاف در سطح $p<۰/۰۵$ به عنوان تفاوت معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار sigma plot (ورژن ۱۰) و برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS (ورژن ۱۹) استفاده شد.

گروه‌های مورد آزمایش: در هر آزمایش چهار گروه موش (هر گروه شامل ۱۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی) مورد استفاده قرار گرفت. تمامی گروه‌ها تحت جراحی مغز قرار گرفتند.

آزمایش اول: بررسی اثر ACPA بر حافظه‌ی ترس در موش کوچک آزمایشگاهی: گروه اول (به عنوان گروه کنترل) ۱۵ دقیقه پیش از آموزش سالین و گروه‌های دوم و سوم و چهارم هریک ACPA را به ترتیب با دوزهای ۰/۰۰۵، ۰/۰۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی و هر چهار گروه ۵ دقیقه پیش از آموزش، ۰/۵ میکروگرم بر موش (۱ µl/side) سالین را به صورت تزریق درون CA1 دریافت کردند.

آزمایش دوم: بررسی اثر RS23597-190 بر حافظه‌ی ترس در موش کوچک آزمایشگاهی: گروه اول (به عنوان گروه کنترل) ۱۵ دقیقه پیش از آموزش سالین و گروه‌های دوم و سوم و چهارم هریک RS23597-190 را به ترتیب با دوزهای ۰/۰۱، ۰/۱ و ۰/۲ میکروگرم بر موش به صورت درون صفاقی و هر چهار گروه ۵ دقیقه پیش از آموزش، ۰/۵ (۱ µl/side) سالین را به صورت تزریق درون CA۱ دریافت کردند.

آزمایش سوم: بررسی اثر RS23597-190 بر حافظه‌ی ترس القا شده توسط ACPA در موش کوچک آزمایشگاهی: گروه اول (به عنوان گروه کنترل)، ۱۵ دقیقه پیش از آموزش، سالین را به صورت درون صفاقی و ۵ دقیقه پیش از آموزش، ۰/۵ µl/side (۱ میکروگرم بر موش) سالین را به صورت تزریق درون CA1 دریافت کردند و گروه‌های دوم و سوم وچهارم هریک ۱۵ دقیقه پیش از آموزش، ACPA را به ترتیب با دوزهای ۰/۰۰۵،

۰/۰۵ و ۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی و هر چهار گروه ۵ دقیقه پیش از آموزش، RS23597-190 را با دوز ۰/۰۱ میکروگرم بر موش به صورت تزریق درون CA1 دریافت کردند.

نتایج

آزمایش اول ـ بررسی اثر ACPA بر حافظه ترس در موش کوچک آزمایشگاهی: تجزیه و تحلیل آماری به روش One Way Anova و آزمون مکمل Tokey Post Hoc نشان داد که ACPA در بالاترین دوز ۰/۵ میکروگرم بر موش منجر به تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی می‌شود زیرا تعداد Freezing در هر ۲ فاز صدادار (۳ دقیقه) و بدون صدا (۵ دقیقه)، کاهش می‌یابد. نتایج آنالیز آماری One Way Anova و تعیین سطح معنی‌داری نتایج فوق را نمودارهای ۱ و ۲ مشاهده می‌کنید. [$F_{(۳و۳۶)} = ۴,۹۳۵، p <۰,۰۰۱$] = Freezing number 5min [$F_{(۳و۳۶)} = ۴,۲۷۸، p <۰,۰۵$] = Freezing number 3min.

آزمایش دوم ـ بررسی اثر RS23597-190 بر حافظه ترس در موش کوچک آزمایشگاهی: تجزیه و تحلیل آماری به روش One Way Anova و آزمون مکمل Tukey Post Hoc نشان داد که RS23597-190 هم در فاز بدون صدا (۵ دقیقه) و هم در فاز صدادار (۳ دقیقه) و در هیچ یک از دوزها تأثیر چشم‌گیری بر حافظه ترس ندارد چرا که در هیچ‌کدام اختلاف معنی‌داری ایجاد نشده است. نتایج آنالیز آماری One Way Anova و تعیین سطح معنی‌داری نتایج فوق را در نمودارهای ۳ و ۴ مشاهده می‌کنید.

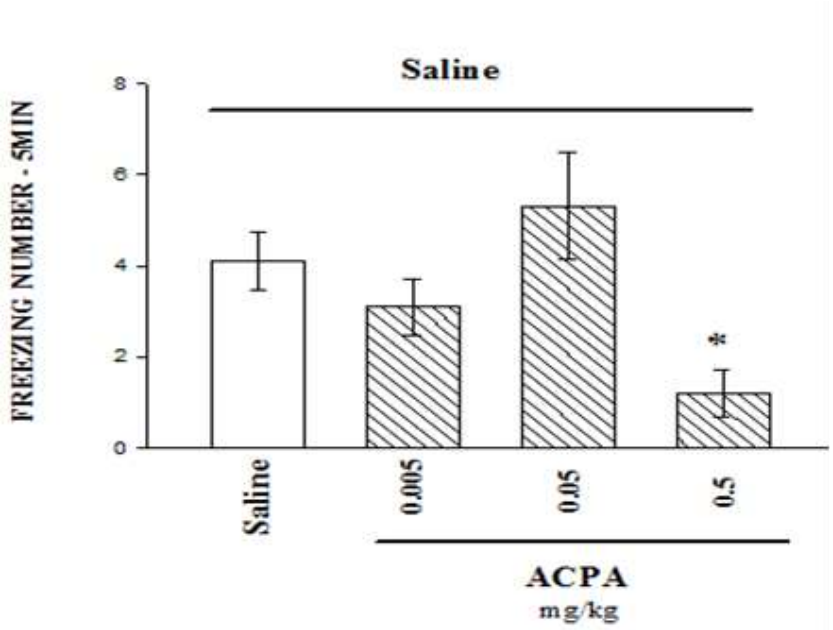
[$F_{(۳و۳۶)} = ۱,۴۱۶، p >۰,۰۵$] = Freezing number 5 min

[$F_{(۳و۳۶)} = ۵,۲۰۲، p >۰,۰۵$] = Freezing number 3 min

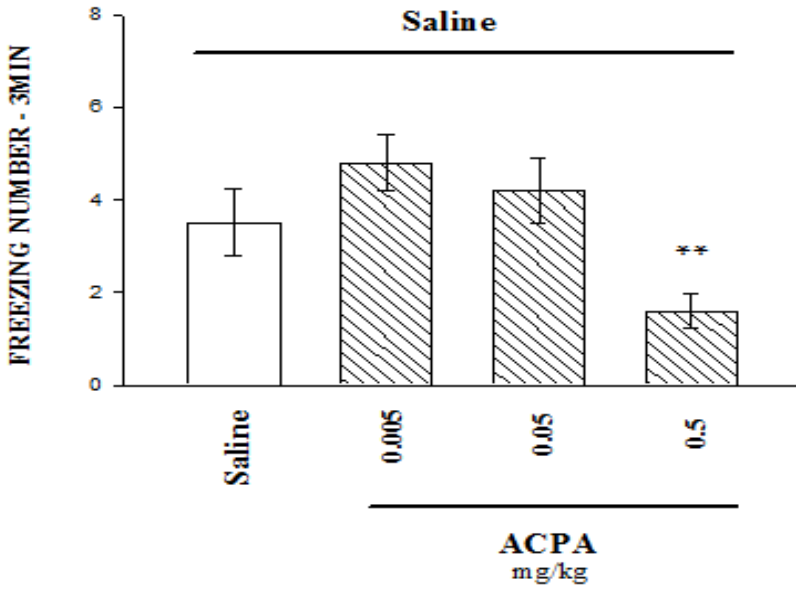
آزمایش سوم ـ بررسی اثر RS23597-190 بر حافظه ترس القا شده توسط ACPA در موش کوچک آزمایشگاهی: تجزیه و تحلیل آماری به روش Two Way Anova و آزمون مکمل Tukey Post Hoc نشان داد که تزریق درون صفاقی ACPA (دوزهای مؤثر و بی اثر) به همراه تزریق درون مغزی RS23597-190 (دوز بی‌اثر) در هر ۲ فاز بدون صدا (۵ دقیقه) و صدادار (۳ دقیقه)، در کمترین دوز ACPA (۰/۰۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) باعث تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گردید. این در حالی است که در بیشترین دوز ACPA (۰/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) حافظه‌ی ترس تخریب شده توسط ACPA، بازگشته، جلوی تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گرفته شد. چرا که تعداد Freezing افزایش پیدا کرده و اختلاف معنی‌داری ایجاد گردید. نتایج آنالیز آماری و تعیین سطح معنی‌داری نتایج فوق را در نمودارهای ۵ و ۶ مشاهده می‌کنید.

[$F_{(۷و۷۲)} = ۵,۱۲۲، p <۰,۰۱$] = Freezing number 5min

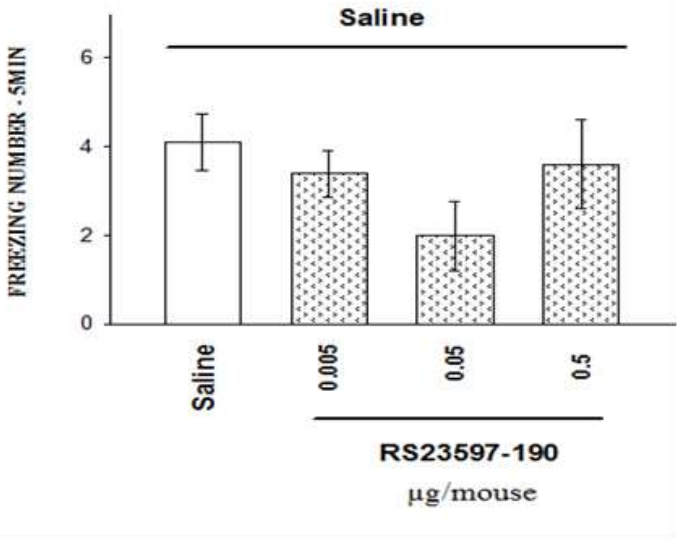
[$F_{(۷و۷۲)} = ۱۰,۲۴ ، p <۰,۰۰۱$] = Freezing number 3min



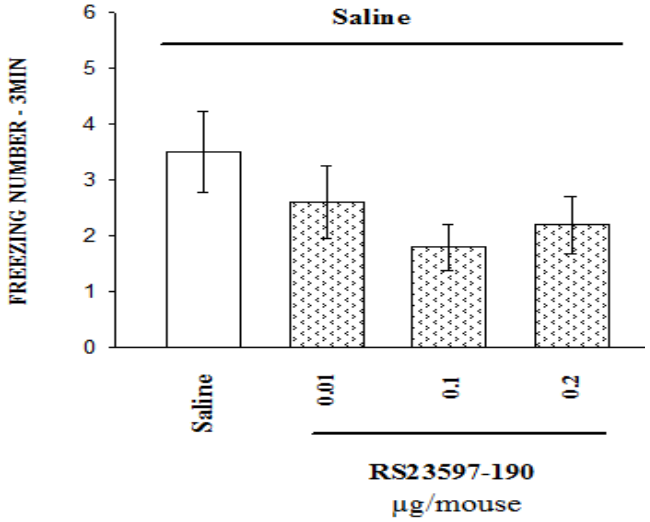
نمودار ۱ـ نتایج آنالیز آماری اثر ACPA بر حافظه ترس در فاز ۵ دقیقه. ۰/۰۵ >p * در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. همانطور که در نمودار مشخص است، ACPA در بالاترین دوز مورد استفاده سبب تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گشته است.



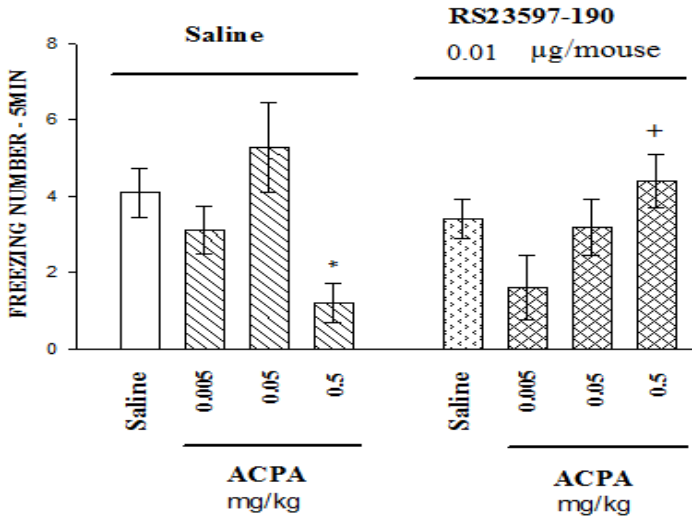
نمودار ۲ـ نتایج آنالیز آماری اثر ACPA بر حافظه ترس در فاز ۳ دقیقه. ۰/۰۱ >p ** در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. همانطور که در نمودار مشخص است، ACPA در بالاترین دوز مورد استفاده سبب تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گشته است.



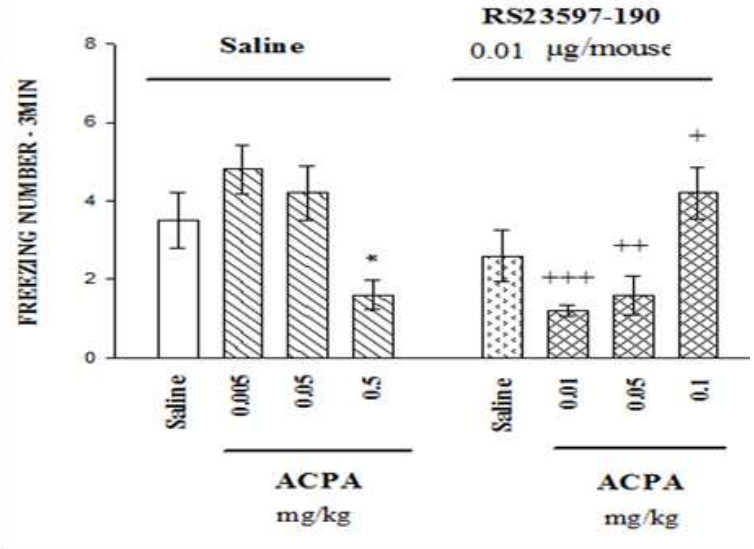
نمودار ۳ـ نتایج آنالیز آماری اثر RS23597-190 بر حافظه ترس در فاز ۵ دقیقه. همانطور که در نمودار مشخص است، آنتاگونیست 5-HT4 در دوزهای مورد استفاده تأثیر قابل توجهی بر حافظه ترس نداشته است.



نمودار ۴ـ نتایج آنالیز آماری اثر RS23597-190 بر حافظه ترس در فاز ۳ دقیقه. همانطور که در نمودار مشخص است، آنتاگونیست 5-HT4 در دوزهای مورد استفاده تأثیر قابل توجهی بر حافظه ترس نداشته است.



نمودار ۵ـ نتایج آنالیز آماری اثر RS23597-190 بر حافظه ترس القا شده توسط ACPA در فاز ۵ دقیقه. ۰/۰۵ >p ❋ در مقایسه با گروه کنترل و ۰/۰۵ >p + در مقایسه با گروه ACPA ۰/۵ می‌باشد. همانطور که در نمودار مشخص است، تداخل یکی از دوزهای بی‌اثر آنتاگونیست 5-HT4 با تمام دوزهای ACPA، سبب بازگشت و بهبود حافظه ترس تخریب شده در بالاترین دوز ACPA، گشته است.



نمودار ۶ـ نتایج آنالیز آماری اثر RS23597-190 بر حافظه ترس القا شده توسط ACPA در فاز ۳ دقیقه. ۰/۰۵ >p ❋ در مقایسه با گروه کنترل و ۰/۰۵ >p + در مقایسه با گروه ACPA ۰/۵ و ۰/۰۱ >p ++ در مقایسه با گروه ACPA ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱>p +++ در مقایسه با گروه ACPA ۰/۰۰۵ می‌باشد. همانطور که در نمودار مشخص است، تداخل یکی از دوزهای بی اثر آنتاگونیست 5-HT4 با تمام دوزهای ACPA، سبب بازگشت و بهبود حافظه ترس تخریب شده، در بالاترین دوز ACPA و ایجاد فراموشی در دوزهای پایین‌تر ACPA گشته است.

بحث

در این پژوهش آثار تزریق دوطرفه آنتاگونیست 5-HT4 در هیپوکامپ پشتی (CA1) بر روی حافظه ترس موش-های کوچک آزمایشگاهی القا شده با ACPA با استفاده از الگوی دوطرفه بررسی شد. نتایج نشان داد که تزریق درون صفاقی ACPA، آگونیست گیرنده انتخابی CB1 ، پیش از آموزش حافظه ترس در روز تست را تخریب می‌کند. علاوه بر این نتایج حاکی از آن بود که تزریق درون مغزی RS23597-190، پیش از آموزش تخریب حافظه ترس ناشی از تزریق درون صفاقی ACPA را بهبود بخشید (در بالاترین دوز). در حالی‌که RS23597-190 به تنهایی اثری بر حافظه ترس نداشت. این نتایج مطابق با مطالعات رفتاری دیگری است که نشان داده‌اند که یکی از اثرات اصلی کانابینوئیدها روی انسان‌ها و حیوانات آزمایشگاهی فروپاشی یا تخریب حافظه کوتاه مدت است [۲۰، ۳۱ و ۴۲]. در سال ۲۰۰۰ هم، تجویز سیستمیک ΔTHC- 9 قبل از تست ماز T شکل، حافظه کاری را از بین برده است و این اثر، توسط آنتاگونیست گیرنده CB1، تعدیل می‌شود [۳۳]. همچنین لیچمن در سال ۲۰۰۰ در مطالعاتی که به صورت *in vitro* صورت گرفت، نشان داد که فعال کردن گیرنده‌های CB1 با تزریق حاد ترکیبات کانابینوئیدی،LTP را در ناحیه CA1، از بین می‌برد و این اثر با آنتاگونیست گیرنده کانابینوئید برمی‌گردد [۲۶]. نتایج به دست آمده نشان داد که تزریق محیطی ACPA پیش از آموزش حافظه ترس را وقتی ۲۴ ساعت بعد از تزریق دارو در دستگاه fear condition تست شدند، تخریب نمود. بعید به نظر می‌رسد که اثر ACPA در روز تست اتفاق افتاده باشد. بنابراین یک اثر خاص ACPA روی تثبیت اطلاعات حسی پیشنهاد می‌شود. این نتیجه در توافق با مطالعات دیگران است که نشان دادند تزریق آگونیست-های گیرنده CB1 تشکیل حافظه فضایی و غیرفضایی را تخریب می کند [۱۱، ۱۸، ۲۱] و آنتاگونیست‌های گیرنده CB1 ممکن است فرایند حافظه را بهبود ببخشند [۲۶، ۴۳، ۴۸]. یا اینکه اثری بر حافظه نداشته باشند [۸]. همچنین گزارشاتی از داسیلوا در سال ۲۰۰۲ وجود دارد که نشان می‌دهند آگونیست‌های گیرنده CB1 کانابینوئید ممکن است بر روی فرایندهای اکتساب ویا تثبیت حافظه اثر داشته باشند [۸، ۲۴، ۳۳]. سنجش محل دقیق دخالت کانابینوئیدها بر مراحل مختلف حافظه مشکل است. گزارشی از د.اولیوریا در سال ۲۰۰۸ نشان می دهد که تزریق پس از آموزش آناندامید، آگونیست گیرنده CB۱، در دوزهای پایین در دستگاه step-down باعث یک اثر تسهیلی بر حافظه می‌شود [۹]. همچنین در یک آزمایش دیگر نقش تسهیل کننده LTP اندوکانابینوئیدها نیز گزارش شده است [۲۶]. بحث و جدال در مورد پاسخ-های متفاوت کانابینوئیدها بر حافظه ممکن است به علت تفاوت در نوع دارو، دوز دارو یا روش اندازه‌گیری حافظه باشد. برای مثال یک مطالعه نشان داد که کانابینوئیدها در دستگاه سنجش حافظه اجتنابی مهاری یک اثر فراموشی بر بیزاری دارد اما در دستگاه میدان باز این اثر را ندارد. شواهد زیادی نشان می‌دهد که گیرنده‌های کانابینوئیدی به طور منفی از طریق Gi/o proteins با آدنیلات سیکلاز جفت می‌شوند و منجر به کاهش تولید cAMP می‌گردند. نشان داده شده است که CB1 معمولاً از طریق این G- protein روی کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع N پیش‌سیناپسی عمل می‌کند که نقش کانابینوئیدها در تنظیم انتقال عصبی CNS را پیشنهاد می‌کند [۲۵]. همچنین گزارش شده است که اندوکانابینوئیدها از جایگاه‌های پس‌سیناپسی آزاد می‌شوند و قادرند آزاد سازی انتقال دهنده‌های دیگر از قبیل سروتونین، GABA، اوپیوئیدها و دوپامین را مهار کنند که ممکن است منجر به تغییرات اساسی و طولانی مدت در الگوهای رفتاری مختلف گردد [۱۳، ۱۴، ۱۶، ۲۹، ۴۱، ۴۴، ۴۶]. در کل مکانیسم واقعی کانابینوئیدها بر روی هیپوکامپ کاملاً واضح نیست اما در توقف مهار ایجاد شده با دپلاریزاسیون، اندوکانابینوئیدها ممکن است به

عنوان پیامبران برگشتی که تنظیم کاهشی آزادسازی GABA در هیپوکامپ را میانجیگری می‌کنند، عمل نمایند [۳۵]. در برخی مطالعات نشان داده شده که سطوح افزایش یافته کانابینوئیدهای درون زا در هیپوکامپ، که بلافاصله بعد از آموزش رخ می‌دهد، در تثبیت تسهیل حافظه شرکت می‌کند. چون آگونیزاسیون گیرنده‌های CB1، فعالیت شبکه‌های مهاری موضعی در هیپوکامپ پشتی را کاهش می‌دهد، موجب از بین رفتن مهار خروجی نورون‌های هرمی گلوتاماترژیک شده که نورون-های گلوتاماترژیک هدفشان را توقیف می‌کنند. در تأیید این فرضیه نشان داده شده که اندوکانابینوئیدها، از بین برندگان طبیعی مهار شکل‌پذیری موضعی در هیپوکامپ پشتی هستند و آنتاگونیست‌های CB1، از قبیل AM251 این سیستم تنظیمی درون‌زا که در دستگاه اجتنابی مهاری step-down موجب اثر فراموشی می-گردد، را تخریب می‌نماید. در نتیجه پیشنهاد شده که اینترنورون‌های سروتونرژیک هیپوکامپ، نقش مهمی در همزمانی سلول‌های هرمی دارند و بدین وسیله در الگوهای نوسانی از قبیل ریتم تتا که در کد کردن اطلاعات حسی و فضایی مهمند، شرکت دارند [۵، ۷، ۳۶، ۳۷]. تحقیقات نشان می‌دهد که تزریق ACPA، پس از آموزش، تثبیت حافظه در آمیگدال مرکزی را کاهش می-دهد و در تأیید آن گزارش شده است که CB1 نقش مخصوصی در تخریب حافظه دارد. آگونیست‌های کانابینوئیدی در تجمع و آسیب به مدل‌های حافظه در انسان و حیوانات آزمایشگاهی اشکالاتی ایجاد می‌کنند. سایر محققین نشان دادند که تزریق آگونیست سنتتیک کانابینوئید از طریق فعالیت گیرنده آن به حافظه در حال فعالیت در مدل radial arm maz و water maz آسیب می‌رساند. کاهش میزان اندوکانابینوئیدها توسط تخریب ژن CB1 یا بلاک کردن انتقال اندوکانابینوئیدها در محل CB1 سبب تسهیل یادگیری و حافظه می‌شود [۱۷]. نتایج نشان می‌دهد که تشکیل حافظه بلندمدت به سنتز پروتئین در هیپوکامپ و mRNA جدید نیاز دارد و تخلیه سروتونین بر هیچ‌یک از حافظه‌های کوتاه مدت و بلندمدت اثری ندارد [۵، ۳۷].

یافته‌هایی که توسط نیک در سال ۲۰۰۸ ارائه شد، نشان می‌دهد که تزریق آگونیست 5-HT1 در مدل‌های حافظه فضایی، باعث آسیب به حافظه می‌شود و آنتاگونیست 5-HT7 حافظه را در مدل Radial maze بهبود می‌بخشد. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که گیرنده مزبور در مراحل دریافت و بازیابی حافظه درگیر است [۳۴].

مطالعات رفتاری پیشنهاد می‌کند که ارتباط مستقیمی بین کانابینوئیدها و سیستم‌های مونوآمینرژیک مانند سیستم سروتونرژیک وجود دارد. با توجه به مطالعات صورت گرفته بر سروتونین و سیستم اندوکانابینوئیدی در آمیگدال و هیپوکامپ، مشخص شده است که گیرنده CB1 همراه با گیرنده 5-HT3A که از نوع کانال یونی دریچه‌دار وابسته به لیگاند است، بیان می‌شود. هر دو گیرنده کانابینوئیدی و سروتونینی در نورون‌های گاباارژیک آمیگدال و تشکیلات هیپوکامپ حضور دارند و این نورون‌ها رونوشت mRNA گیرنده CB1 و زیر واحد 5-HT3A را با هم بیان می‌کنند. پس پیشنهاد می‌شود که یک تعامل بین کانابینوئیدها و سیستم‌های سروتونرژیک در انتقالات عصبی وجود دارد [۱۱]. مطالعات الکتروفیزیولوژیک صورت گرفته توسط ناکازی در سال ۲۰۰۰ نشان می هد که آگونیست رسپتور CB1 موجب کاهش آزادسازی سروتونین، آدرنالین و دوپامین می‌شود. همین مطالعات حاکی از آن است که این رسپتورها در پایانه‌های آکسونی سیستم‌های مونوآمینرژیک قرار گرفته-اند [۳۲].

تعداد زیادی گیرنده CB1 کانابینوئیدی و گیرنده سروتونینی در نورون‌های گاباارژیک آمیگدال و تشکیلات هیپوکامپی حضور دارند. علاوه بر این گیرنده‌های CB1 بر روی فیبرهای سروتونرژیک هسته رافه حضور دارند [۱].

نتیجه‌گیری

در نهایت با توجه به نتایج پژوهش خود و مطالعات مختلف پژوهشگران پیشین چنین می‌توان استنباط کرد که ACPA سبب تخریب حافظه ترس می‌شود. در این میان آنتاگونیست 5HT4 به صورت نورومدولاتور و تعدیل کننده عمل کرده و سبب تخریب و یا بهبود حافظه می‌گردد.

منابع

1- Albertazzi P. (2006), Noradrenergic and serotonergic modulation to treat vasomotor symptoms. *Menopause Interactions*, 12: 7-11.

2- Ameri A. (1999), The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*, 58: 315-348.

3- Berumen L.C. (2012), Serotonin receptors in hippocampus. *Scientific World Journal*, 2012: 823493.

4- Bliss T.V., Collingridge G.L.A (1993), synaptic model of memory: Long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361: 31-39.

5- Buzsaki G. (1997), Functions for interneuronal nets in the hippocampus. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 75(5):508-15.

6- Chaperon F., Thiebot M.H. (1999), Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Critical Reviews in Neurobiology*, 13: 243-281.

7- Cobb S.R., Buhl E.H., Halasy K., Paulsen O., Somogyi P. (1995), Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature*, 378(6552): 75-78.

8- Da Silva G., Takahashi R.N. (2002), SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Progressive Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*, 26(2): 321-325.

9- De Oliveira Alvares L., Pasqualini Genro B., Diehl F., Quillfeldt J.A. (2008), Dfferential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90: 19.

10- De Oliveira Alvares L., de Oliveira L.F., Camboim C., Diehl F., Genro B.P., Lanziotti V.B., Quillfeldt J.A. (2005), Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiology of Learning and Memory*, 83: 119-124.

11- Egashira N., Mishima K., Iwasaki K., Fujiwara M. (2002), Intracerebral microinjections of delta 9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. *Brain Research*, 952(2): 239-45.

12- Fattore L., Deiana S., Spano S.M., Cossu G., Fadda P., Scherma M., Fratta W. (2005), Endocannabinoid system and opioid addiction: Behavioural aspects. *Pharmacology Biochemistery Behavior*, 81: 343-359.

13- Fernandez-Ruiz J., Berrendero F., Hernandez M.L., Ramos J.A. (2000), The endogenous cannabinoid system and brain development. *Trends of Neuroscience*, 23(1):14-20.

14- Fernandez-Ruiz J.J., Berrendero F., Hernandez M.L., Romero J., Ramos J.A. (1999), Role of endocannabinoids in brain development. *Life Science*, 65(6-7): 725-36.

15- Fields R.D. (2005), Making memories stick. *Science of America*, 292(2): 75-81.

16- Garcia-Gil L., de Miguel R., Romero J., Perez A., Ramos J.A., Fernandez-Ruiz J.J. (1999), Perinatal delta 9-tetra hydro cannabinol exposure augmented the magnitude of motor inhibition caused by GABA(B), but not GABA(A), receptor agonists in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 21(3): 277-283.

17- Ghiasvand M., Rezayof A. (2011), Activation of cannabinoid CB1 receptors in the central amygdala impairs inhibitory avoidance memory consolidation via NMDA receptors." *Neurobiology of Learn and Memory*, 96(2): 333-338.

18- Hampson R.E., Deadwyler S.A. (1999), Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Science*, 65(6-7): 715-723.

19- Hampson R.E., Deadwyler S.A. (2000), Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. *Journal of Neuroscience*, 20: 8932-8942.

20- Haritou S.J. (2008), Seasonal changes in circadian peripheral plasma concentrations of melatonin, serotonin, dopamine and cortisol in aged horses with Cushing's disease under natural photoperiod. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(8): 988-996.

21- Hernandez-Tristan R., Arevalo C., Canals S., Leret M.L. (2000), The effects of acute treatment with delta9-THC on exploratory behaviour and memory in the rat. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 56(1):17-24.

22- Izquierdo I., Da Cunha C., Rosat R., Jerusalinsky D., Ferreira M.B., Medina J.H. (1992), Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, andhippocampus of the rat. *Behavior and Neural Biology*, 58: 16-26.

23- Izquierdo I., Medina J. H. (1995), Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63: 19-32.

24- Kobilo T., Hazvi S., Dudai Y. (2007), Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *Eur Journal of Neuroscience*, 25(11): 3417-3421.

25- Lichtman A.H., Dimen K.R., Martin B.R. (1995), Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 119(3): 282-290.

26- 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.

27- Liu J. (2000), Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure*, 19(3): 165-172.

28- Mackie K., Lai Y., Westenbroek R., Mitchell R. (1995), Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *Journal of Neuroscience*, 15(10): 6552-6561.

29- Molina-Holgado F., Amaro A., Gonzalez M.I., Alvarez F.J., Leret M.L. (1996), Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *European Journal of Pharmacology*, 316(1): 39-42.

30- Munro S., Thomas K.L., Abu-Shaar M. (1993), Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365: 61-65.

31- Nahas G., Latour C. (1992), The human toxicity of marijuana. *Medical Journal of Austria*, 156(7): 495-497.

32- Nakazi M. (2000), Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 361(1): 19-24.

33- Nava F., Carta G., Battasi A.M., Gessa G.L. (2000), D(2) dopamine receptors enable delta(9)-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *British Journal of Pharmacology*, 130(6): 1201-1210.

34- Nic Dhonnchadha B.A., Cunningham K. A. (2008), Serotonergic mechanisms in addiction-related memories. *Behavior and Brain Research*, 195(1): 39-53.

35- Ohno-Shosaku T., Maejima T., Kano M. (2001), Endogenous cannabinoids mediate retrograde signals from depolarized postsynaptic neurons to presynaptic terminals. *Neuron*, 29(3): 729-738.

36- O'Keefe J. (1993), Hippocampus, theta, and spatial memory. *Currents of Opinion Neurobiology*, 3(6): 917-924.

37- Paulsen O., Moser E.I. (1998), A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends of Neuroscience*, 21(7): 273-278.

38- Rezayof A., (2003), Involvement of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. *Journal of Psychopharmacology*, 17(4): 415-423.

39- Robinson L., Goonawardena A.V., Pertwee R.G., Hampson R.E., Riedel G. (2007), The synthetic cannabinoid HU210 induces spatial memory deficits and suppresses hippocampal firing rate in rats. *British Journal of Pharmacology*, 151(5): 688-700.

40- Rodriguez de Fonseca F., Cebeira M., Fernandez-Ruiz J.J., Navarro M., Ramos J. A. (1991), Effects of pre and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 43: 713-723.

41- Schlicker E., Timm J., Gothert M. (1996), Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 354(6): 791-5.

42- Stiglick A., Kalant H. (1982), Learning impairment in the radial-arm maze following prolonged cannabis treatment in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 77(2):117-23.

43- Terranova J.P., Storme J.J., Lafon N., Perio A., Rinaldi-Carmona M., Le Fur G., Soubrie P. (1996), Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology* (Berl), 126(2):165-172.

44- Vela G., Fuentes J.A., Bonnin A., Fernandez-Ruiz J., Ruiz-Gayo M. (1995), Perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) leads to changes in opioid-related behavioral patterns in rats. *Brain Research*, 680(1-2):142-147.

45- Vela G., Martin S., Garcia-Gil L., Crespo J.A., Ruiz-Gayo M., Javier Fernandez-Ruiz J., Garcia-Lecumberri C., Pelaprat D., Fuentes J.A., Ramos J.A., Ambrosio E. (1998), 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 Reserch*, 807: 101-109.

46- Viveros M.P., Llorente R., Moreno E., Marco E.M. (2005), Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behav Pharmacology*, 16(5-6): 353-362.

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

48- Wolff M.C., Leander J.D. (2003), SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. *European Journal of Pharmacology*, 477(3): 213-217.

49- Zarrindast M.R. (2003), Involvement of dopamine D1 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Brain Research*, 965(1-2): 212-221.