

تأثیر آراشیدونیل سیکلو پروپیل آمید (ACPA) بر یادگیری وابسته به وضعیت موسیمول در مدل یادگیری احترازی غیر فعال در موش سوری

دکتر بهاره پاکپور^۱، کبری جعفری^۲، زهرا بشیری^۳، دکتر مجید نوائیان^۴، دکتر مرتضی پیری^۵
نویسنده‌ی مسول: اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، گروه زیست شناسی
biopiri@iauardabil.ac.ir

دریافت: ۹۱/۸/۱۰ پذیرش: ۹۲/۳/۲۷

چکیده

زمینه و هدف: نشان داده شده است که کانابینوئیدها اثرات متنوعی بر روی اعمال شناختی می‌گذارند. یک همپوشانی در پراکنش گیرنده‌های گابا با کانابینوئیدی در برخی از ساختارهای مغزی نظیر هیپوکامپ پشتی گزارش شده است، بنابراین احتمال وجود برهمکنش عملکردی بین سیستم کانابینوئیدی و گابائریک در زمینه‌ی اعمال شناختی وجود دارد. مطالعه‌ی حاضر نقش احتمالی گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 هیپوکامپ پشتی بر روی فراموشی القا شده با موسیمول و یادگیری وابسته به وضعیت موسیمول در موش‌های سوری نر بالغ مورد بررسی قرار داده است. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی از ۲۵۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI و داروهای ACPA و موسیمول استفاده شد. موش‌ها بیهوش شده و کانول گذاری دوطرفه در ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی با استفاده از روش استریوتاکسی انجام شد. بعد از طی دوره‌ی بهبودی هفت روزه، آزمون رفتاری با استفاده از دستگاه یادگیری احترازی آغاز شد. **یافته‌ها:** تزریق پس از آموزش موسیمول (۰/۱۵، ۰/۰۷۵، میکروگرم بازای هر موش) باعث تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهارتی شد. تخریب حافظه‌ی القا شده با موسیمول (۰/۱۵، میکروگرم بازای هر موش) به‌طور کامل با به‌کار بردن ACPA و/یا موسیمول روز آزمون برمی‌گردد، که نشان دهنده‌ی القای یادگیری وابسته به وضعیت توسط موسیمول می‌باشد. **نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها پیشنهاد می‌نمایند که گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 هیپوکامپ پشتی ممکن است نقش مهمی در فراموشی ایجاد شده با موسیمول و یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با موسیمول در موش سوری بازی کند. **واژگان کلیدی:** موسیمول، آراشیدونیل سیکلو پروپیل آمید (ACPA)، حافظه‌ی وابسته به وضعیت، موش سوری

مقدمه

یادگیری وابسته به وضعیت پدیده‌ای است که در آن به یاد آوری اطلاعات تازه کسب شده تنها در شرایطی صورت می‌گیرد که فرد از لحاظ حسی و فیزیولوژیک در همان شرایط قرار گیرد که اطلاعات در همان شرایط کد شده است (۱). مطالعات آشکار نموده است که داروهایی نظیر کانابینوئیدها (۲)، اپیوئیدها (۳)، لیتیم (۴) و هیستامین (۵)

۱- دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۳- دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر ری

۴- دکترای تخصصی فیزیولوژی جانوری، استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل، اردبیل

Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) اعمال می‌نمایند (۱۱). مطالعات رفتاری مشخص کرده‌اند که در هیپوکامپ برهمکنش مستقیمی بین گیرنده‌های پیش سیناپسی CB1 و برخی از میانجی‌های عصبی از جمله گابا، گلوتامات، استیل کولین و نورآدرنالین وجود دارد و فعال شدن گیرنده‌های پیش سیناپسی CB1 می‌تواند رهایش این میانجی‌های عصبی را کاهش دهد (۱۵). بیان همزمان گیرنده‌های گابا و گیرنده‌های CB1 در برخی از ساختارهای مغزی از جمله هیپوکامپ نشان دهنده‌ی احتمال برهمکنش بین سیستم کانابینوئیدی و گابائریک در کنترل اعمال شناختی می‌باشد (۱۶). با توجه به اینکه گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 در هیپوکامپ پستی حضور دارد و هیپوکامپ پستی یکی از ساختارهای اصلی دخیل در حافظه و یادگیری در مغز می‌باشد و نیز اثر گیرنده‌های CB1 در مطالعات قبلی بر روی یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با موسیمول مورد بررسی قرار نگرفته است (۱۷). این مطالعه با هدف بررسی تاثیر گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 هیپوکامپ پستی بر روی یادگیری وابسته به وضعیت القاء شده با موسیمول که آگونیست گیرنده‌ی گابا - A می‌باشد، انجام گرفته است. بدین منظور ما در بخش اول این مطالعه اثر موسیمول بر روی شکل‌گیری و به یادآوری حافظه‌ی احترازی غیر فعال را مورد بررسی قرار دادیم و در بخش دوم این مطالعه اثر آراشیدونیل سیکلو پروپیل آمید (ACPA) آگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 بر روی یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با موسیمول مورد بررسی قرار داده شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی که در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکز انجام شد، از موش‌های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI (وزن تقریبی ۲۲ تا ۳۰ گرم) که از انستیتو پاستور ایران تهیه شد، استفاده گردید. حیوان‌ها بعد

قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشند (۶). مطالعات پیشین همچنین پیشنهاد نموده‌اند که گیرنده‌های گابا - A در یادگیری وابسته به وضعیت دخیل می‌باشند (۷). گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا) اصلی‌ترین ناقل عصبی مهاری در مغز می‌باشد. این ناقل عصبی مهاری از طریق اثر بر روی سه گیرنده مختلف گابا اثرات مهاری خود را اعمال می‌نماید (۸). گیرنده‌های گابا - A و گابا - C جزء گیرنده‌هایی می‌باشند که با کانال وابسته به لیگاند کلر جفت شده‌اند، در حالی که گیرنده‌ی گابا - B از طریق پروتئین‌های G عمل می‌نماید (۹). در گذشته اثر سیستم گابائریک بر روی یادگیری و حافظه مشخص شده است (۱۰). اکثر گزارشات نشان می‌دهد که تزریق آگونیست گیرنده‌های گابائریک باعث تخریب حافظه، در حالی که آنتاگونیست‌های آن‌ها باعث تسهیل ذخیره و به یادآوری حافظه‌ی احترازی غیر فعال می‌شود. به عنوان نمونه نشان داده شده است که وقتی آگونیست‌های GABA به داخل بطن‌های جانبی، بخش قاعده‌ای مغز جلویی، هیپوکامپ و آمیگدال تزریق می‌شود، باعث تخریب حافظه می‌گردد (۷). از طرف دیگر اهمیت گیرنده‌های کانابینوئیدی در فرآیندهای حافظه، یادگیری و توجه مشخص شده است (۱۲ و ۱۱). کانابینوئیدها دارای دو گیرنده‌ی اصلی به نام‌های CB1 و CB2 می‌باشند (۱۳)، اخیراً گیرنده‌های کانابینوئیدی جدیدی موسوم به CB3 نیز در سیستم عصبی شناسایی و گزارش شده است (۱۴). گیرنده‌های CB1 از گیرنده‌های متابوتروپیک سیستم عصبی مرکزی هستند که به مقدار زیاد در نواحی مختلف مغز که نقش مهمی در حافظه دارند، نظیر هیپوکامپ، قشر مغز و آمیگدال بیان می‌شوند (۱۲). این گیرنده‌ها پیش سیناپسی از طریق پروتئین‌های G عمل نموده، اثرات خود را به واسطه‌ی مهار ساخت آدنوزین مونوفسفات حلقوی، کاهش هدایت کلسیم به ویژه از طریق کانال‌های نوع N کلسیمی، افزایش هدایت پتاسیم از طریق کانال‌های پتاسیمی و افزایش فعالیت پروتئین کیناز فعال شده توسط میتوژن

از انتقال به حیوانخانه تحقیقاتی در قفس‌های ده‌تایی با دوره‌ی شبانه روزی طبیعی (۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی) و در دمای 3 ± 22 درجه‌ی سانتی‌گراد، با آب و غذای کافی نگهداری شدند. در هر سری آزمایش ده سر موش استفاده شد. دستگاه یادگیری احترازی غیر فعال، مدل Step-down، جعبه‌ی چوبی به ابعاد (۳۰×۳۰×۴۰ سانتی‌متر) می‌باشد. کف دستگاه دارای ۲۹ میله‌ی فولادی با قطر ۳/۰ سانتی‌متر می‌باشد که به فاصله‌ی ۱ سانتی‌متر از یکدیگر قرار گرفته‌اند، این میله‌ها به دستگاه تحریک کننده متصل شده و شوک الکتریکی از طریق این میله‌ها به حیوانات مورد آزمایش وارد می‌شود. یک سکوی مکعبی چوبی به ابعاد (۴×۴×۴ سانتی‌متر) در قسمت میانی کف دستگاه (روی میله‌های فلزی) قرار گرفته است، که حیوانات هنگام انجام آزمایشات به آرامی در روی این سکو قرار داده می‌شوند. در این تحقیق از آگونیست گیرنده‌ی گابا - A یعنی موسیمول و آگونیست اختصاصی گیرنده‌ی CB1 کانابینوئیدی یعنی ACPA استفاده گردید (تاکریس، آمریکا). موسیمول در سرم فیزیولوژی استریل ۰/۹ درصد حل شد و ACPA که به صورت محلول بود، توسط سالی‌ن رقیق شده و در دوزهای ۳، ۱/۵ و ۰/۷۵ نانوگرم به ازای هر موش مورد استفاده گرفت.

روش جراحی و کانول گذاری در ناحیه‌ی هیپوکامپ پستی (CA1): موش‌های کوچک آزمایشگاهی توسط تزریق کتامین هیدروکلرید (۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌علاوه گزیزین (۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بی‌هوش شدند. بعد از بی‌هوشی حیوانات در دستگاه استریوتاکسی قرار داده شدند و دو کانول راهنما (اندازه‌ی ۲۲) یک میلی‌متر بالاتر از محل تزریق، براساس اطلس پاکسینوس (۲۰۰۱) قرار داده شد. مختصات ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پستی عبارت بود از $AP = -2$ ، $V = -1/5$ ، $ML = \pm 1/6$ (۱۸). براساس مطالعات قبلی بعد از قرار دادن کانول در مختصات مورد نظر با استفاده از سیمان دندان پزشکی کانول‌های راهنما در جای خود محکم شدند

(۱۹). پس از جراحی و قبل از تزریق درون هیپوکامپی دارو، به حیوان اجازه داده شد ۵ تا ۷ روز دوره‌ی بهبودی پس از جراحی را به منظور رفع استرس و تخریب بافتی احتمالی توسط جراحی سپری کرده، به حالت عادی خود برگردند. **آزمون‌های رفتاری:** یادگیری احترازی غیرفعال مدل Step-down روشی مورد قبول برای بررسی حافظه دراز مدت در موش‌های کوچک آزمایشگاهی بود (۲۰). در این روش، بررسی حافظه در دو روز متوالی و بین ساعت ۸ صبح تا ۲ بعد از ظهر انجام گردید. روز اول یا روز آموزش (Training Day) شامل آموزش دادن حیوان‌ها در دستگاه و روز دوم یا روز آزمون (Testing Day) شامل بررسی میزان حافظه‌ی حیوان‌های آموزش دیده بود. در روز آموزش هر حیوان به آرامی روی سکوی مکعبی دستگاه ارزیابی حافظه قرار گرفت و مدت زمان توقف روی سکو (قبل از پایین آمدن) ثبت گردید. در صورتی که هر موش بیش از ۲۰ ثانیه روی سکو بماند آن موش حذف می‌گردید. بلافاصله بعد از پایین آمدن موش از مکعب چوبی و قرار گرفتن چهار پای موثر بر روی میله‌های فولادی شوک الکتریکی به مدت ۱۵ ثانیه (۱ هرتز، ۰/۵ ثانیه و ۴۵ ولت مستقیم) توسط حیوان دریافت گردید. جلسه‌ی آزمون ۲۴ ساعت بعد از آموزش، مشابه آموزش انجام گردید. با این تفاوت که حیوانات مورد آزمایش در روز آزمون شوک دریافت نمی‌کردند. مدت زمان توقف موش بر روی سکو در روز آزمون به عنوان معیار حافظه در موش اندازه‌گیری می‌شود، که حداکثر زمان برای توقف موش روی سکو (زمان سقف Cut-off) برابر با ۳۰۰ ثانیه می‌باشد که به‌عنوان حافظه‌ی کامل در نظر گرفته می‌شود. **تزریق درون هیپوکامپی دارو:** برای تزریق دارو پس از برداشتن سیم داخل کانول راهنما، سر سوزن دندانپزشکی شماره ۲۷ که ۹ میلی‌متر طول داشت در داخل کانول راهنما شماره ۲۲ قرار داده شد و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو در مدت ۶۰ تا ۹۰ ثانیه تزریق شد. در طول تزریق به حیوان

روز آزمون سالیان یا مقادیر مختلف ACPA (۳، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰ نانوگرم به ازای هر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون به صورت درون هیپوکامپی دریافت داشتند.

آزمایش سوم: بررسی تاثیر تزریق درون هیپوکامپی موسیمول به علاوه ACPA بر حافظه‌ی احترازی تخریب شده ناشی از موسیمول انجام شد در این آزمایش پنج گروه حیوان به کار رفت. دو گروه از حیوانات در روز آموزش بلافاصله بعد از آموزش سالیان یا موسیمول (۰/۱۵ میکروگرم به ازای هر موش) و در روز آزمون سالیان را دریافت کردند، سه گروه دیگر در روز آموزش موسیمول (۰/۱۵ میکروگرم به ازای هر موش) را دریافت کردند و در روز آزمون یک گروه از موش‌ها ACPA (۰/۷۵ نانوگرم به ازای هر موش) یا موسیمول (۰/۰۳۷ میکروگرم به ازای هر موش) را به تنهایی دریافت داشت و گروه آخر ACPA (۰/۷۵ نانوگرم به ازای هر موش) به علاوه مقادیر مختلف موسیمول (۰/۰۳۷ میکروگرم به ازای هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون هیپوکامپی دریافت کردند.

تجزیه و تحلیل آماری: در همه آزمایش‌ها، زمان توقف حیوان روی سکو به صورت میانه و چارک ثبت گردید. به علت تفاوت‌های خاص زیادی که در پاسخ‌های یادگیری حیوانات وجود داشت، داده‌ها توسط آنالیزواریانس یکطرفه (ANOVA) برای داده‌های غیر پارامتریک (Kruskal- Wallis) و به دنبال آن برای بررسی جفت گروه‌ها از روش Mann- Withy, U-Test استفاده گردید. در تمام ارزیابی‌های آماری، حداقل $P < 0.05$ معیار معنی‌دار بودن مقایسه‌ی بین گروه‌ها بوده است.

یافته‌ها

مقطع بافتی مربوط به ناحیه‌ی CA1 هیپوکامپ پشتی که نشان دهنده‌ی محل قرار گیری صحیح کانول در مقایسه با شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس

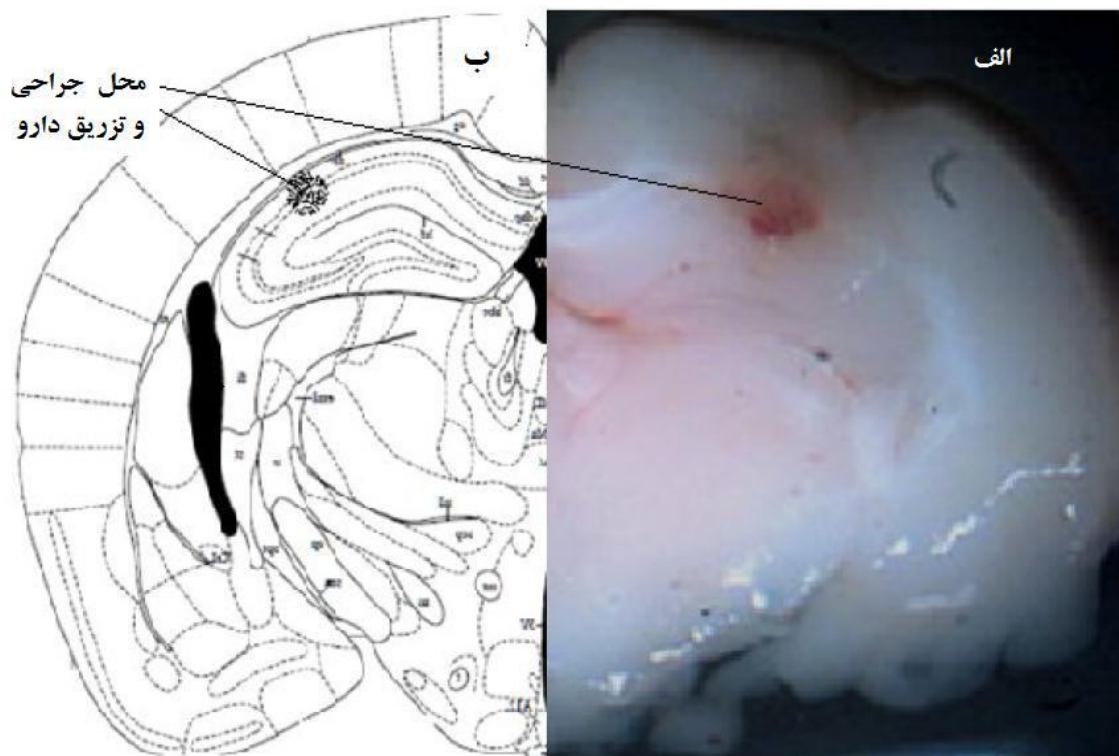
اجازه داده شد بدون هیچ استرسی آزادانه حرکت کند. **بافت‌شناسی:** پس از کشتن حیوان‌ها توسط کلروفورم، ۰/۵ میکرولیتر رنگ متیلن بلو ۱ درصد به داخل هر کانول تزریق شد، سپس مغز از درون مجسمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از یک هفته به استفاده از تیغ جراحی در محل ورود کانول به درون مغز برش‌هایی داده شده و محل ورود کانول به مغز به وسیله‌ی میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه‌ی قرار گرفت. جهت مطالعه‌ی مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده شد.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده: آزمایش اول: بررسی تاثیر تزریق موسیمول پس از آموزش بر روی حافظه‌ی احترازی غیرفعال هشت گروه حیوان در این آزمایش انجام گردید. چهار گروه اول مقادیر مختلف موسیمول (۰/۱۵، ۰/۰۷۵، ۰/۰۳۷ میکروگرم به ازای هر موش) را بلافاصله پس از آموزش به صورت درون هیپوکامپی دریافت کردند، در روز آزمون این گروه‌ها سالیان (۱ میکرو لیتر به هر موش) را ۵ دقیقه قبل از تست دریافت داشتند (نمودار ۱- الف). چهار گروه دیگر بلافاصله بعد از آموزش موسیمول (۰/۱۵، ۰/۰۷۵، ۰/۰۳۷ میکروگرم به ازای هر موش) را دریافت کردند و در روز آزمون مقادیر مختلف موسیمول (۰/۱۵، ۰/۰۷۵، ۰/۰۳۷ میکروگرم به ازای هر موش) را ۵ دقیقه قبل از آزمون به صورت درون هیپوکامپی دریافت کردند.

آزمایش دوم: بررسی تاثیر تزریق درون هیپوکامپی ACPA بر حافظه‌ی احترازی تخریب شده ناشی از موسیمول انجام شد. 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 ACPA (۳، ۱/۵، ۰/۷۵، ۰ نانوگرم به ازای هر موش) را پنج دقیقه قبل از آزمون دریافت داشتند. چهار گروه باقی مانده بلافاصله بعد از آموزش موسیمول (۰/۱۵ میکروگرم به ازای هر موش) را دریافت کردند و در

می‌باشد. لازم به ذکر است که تنها داده‌های مربوط به حیواناتی که محل جراحی آن‌ها در مقایسه با اطلس

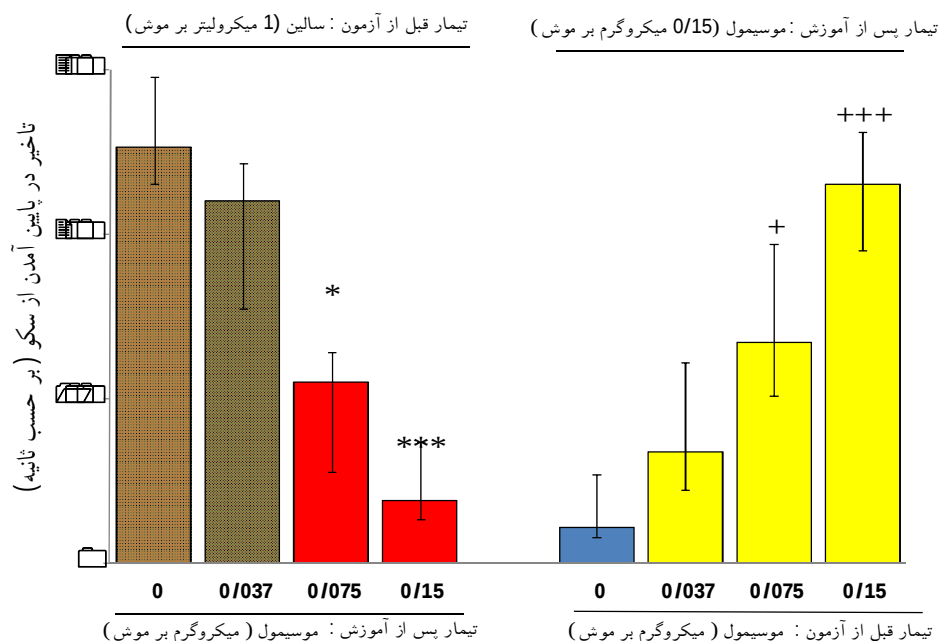
پاکسینوس صحیح بود، در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).



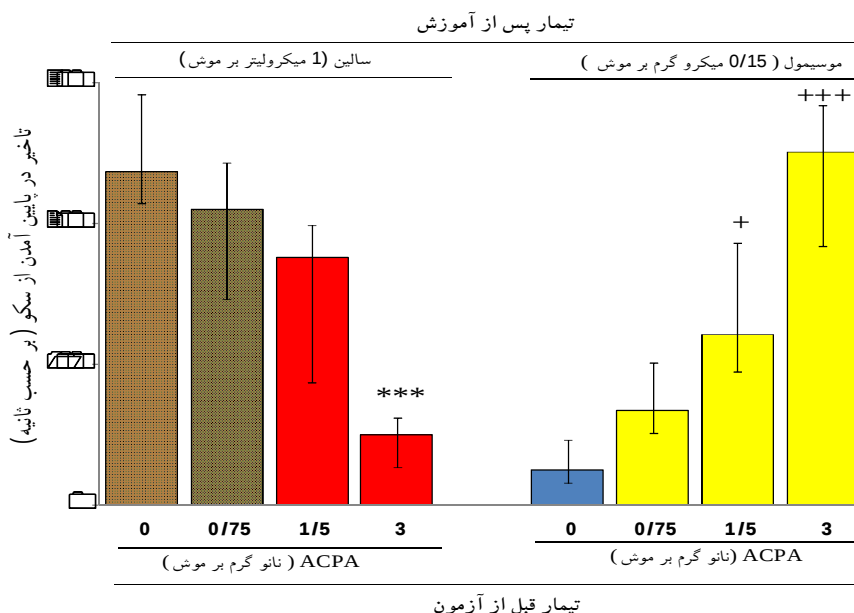
شکل ۱: عکس مقطع بافتی مربوط به کانول گذاری در ناحیه CA1 (الف) و شکل شماتیک برگرفته از اطلس پاکسینوس که ناحیه CA1 در آن مشخص شده است (ب)

آزمایش اول: نتایج تزریق پس از آموزش موسیمول بر روی حافظه‌ی احترازی غیرفعال در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. نتایج آزمایش اول نشان داد، تزریق پس از آموزش موسیمول (۰/۱۵، ۰/۰۷۵ میکروگرم به ازای هر موش) تاخیر در پایین رفتن از سکو، یا به اصطلاح میزان حافظه را در ۲۴ ساعت بعد کاهش داد (نمودار ۱-الف). به‌علاوه به‌کار بردن موسیمول (۰/۱۵، ۰/۰۷۵ میکروگرم به ازای هر موش) قبل از آزمون قادر به بهبود حافظه تخریب شده با موسیمول روز آموزش بود (نمودار ۱-ب).

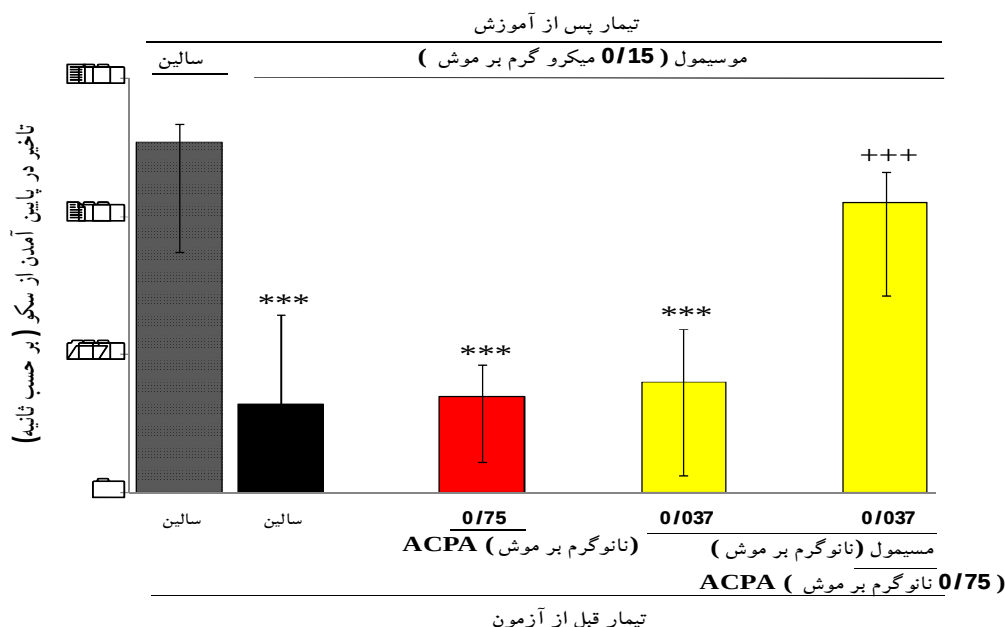
آزمایش دوم: نتایج تزریق درون هیپوکامپی ACPA قبل از آزمون بر روی حافظه‌ی تخریب شده توسط موسیمول نشان داد که، به‌کار بردن ACPA (۳ نانوگرم به ازای هر موش) به‌تنهایی قبل از آزمون باعث تخریب حافظه‌ی احترازی غیرفعال می‌شود (نمودار ۲-نیمه چپ)، اما تزریق مقادیر ۳ و ۱/۵ نانوگرم ACPA قبل از آزمون می‌تواند حافظه‌ی تخریب شده با موسیمول روز آموزش را اصلاح کند (نمودار ۲-نیمه راست).



نمودار ۱: آثار تزریق پس از آموزش و پیش از آزمون موسیمول بر حافظه‌ی احترازی غیرفعال در موش‌های کوچک آزمایشگاهی
 $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ در مقایسه با گروه سالین/سالین و $P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$ در مقایسه با سالین/موسیمول می‌باشد.



نمودار ۲: اثر تزریق پیش از آزمون ACPA بر حافظه‌ی احترازی غیرفعال (نمودار - پانل چپ) و بر حافظه‌ی احترازی تخریب شده با تزریق پس از آموزش موسیمول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی (نمودار - پانل راست). $P < 0.001$ در مقایسه با گروه سالین/سالین و $P < 0.001$ در مقایسه با سالین/موسیمول می‌باشد.



نمودار ۳. اثر تزریق مقادیر غیر موثر موسیمول و ACPA بر حافظه‌ی احترازی تخریب شده با تزریق پس از آموزش موسیمول در موش‌های کوچک آزمایشگاهی. $P < 0.001$ در مقایسه با گروه سالمین/سالمین و $P < 0.001$ در مقایسه با سالمین/موسیمول می‌باشد.

به داخل ناحیه‌ی CA1، ۲۴ ساعت قبل از آزمون باعث تخریب حافظه و القای فراموشی می‌شود. نتایج ما با نتایج سایر مطالعاتی که نشان می‌دهد آگونیست گیرنده‌های گابا باعث تخریب حافظه و القای فراموشی می‌شوند، هماهنگ می‌باشد (۷). به علاوه نتایج ما نشان می‌دهد که حافظه‌ی تخریب شده با به کار بردن بعد از آموزش موسیمول با تزریق مجدد همان مقدار موسیمول در روز آزمون دوباره به حالت عادی بر می‌گردد. این اثر موسیمول یادگیری وابسته به وضعیت نامیده می‌شود. نتایج ما همسو با مطالعات قبلی می‌باشد که نشان می‌دهند موسیمول قادر به ایجاد یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد (۲۱). مطالعات نشان می‌دهد که گابا نقش کنترلی در ایجاد تعادل بین سیستم‌های تحریکی و مهاري در قشر مخ و هیپوکامپ بازی می‌کند و نرون‌های بینابینی گاباثرزیک در این دو بخش نقش فعالی در فرآیند پردازش اطلاعات دارا می‌باشند. در راستای نتایج به دست آمده در این مطالعه نتایج مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد که

آزمایش سوم: نتایج تزریق مقادیر غیر موثر موسیمول و ACPA همراه با هم بر روی حافظه‌ی تخریب شده توسط موسیمول نتایج آزمایش سوم، به کار بردن همزمان مقادیر غیر موثر موسیمول (۰/۰۳۷ میکروگرم به ازای هر موش) همراه با ACPA (۰/۷۵ نانوگرم به ازای هر موش) قبل از آزمون توانست حافظه‌ی تخریب شده با موسیمول روز آموزش را اصلاح کند، اما هیچکدام از این داروها به تنهایی قادر به اصلاح حافظه تخریب شده با موسیمول نمی‌باشد (نمودار ۳).

بحث

در بخش اول این مطالعه اثر آگونیست گیرنده‌ی گابا - A یعنی موسیمول بر روی یادگیری احترازی غیر فعال و در بخش دوم اثر آگونیست اختصاصی گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 یعنی ACPA بر روی حافظه‌ی تخریب شده با موسیمول مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات ما نشان می‌دهد تزریق پس از آموزش آگونیست گیرنده‌ی گابا - A، موسیمول

آگونیست‌های گیرنده‌های گابا - A باعث تخریب حافظه و آنتاگونیست‌های این گیرنده باعث بهبود حافظه و یادگیری می‌گردند (۷)، البته اکثر این مطالعات به بررسی اثر تزریق محیطی موسیمول پرداخته‌اند، در حالی‌که در این مطالعه موسیمول به ناحیه هیپوکامپ پستی که یکی از مراکز مهم شکل‌گیری حافظه دراز مدت می‌باشد، تزریق شده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هیپوکامپ یکی از مراکز اصلی است که موسیمول از طریق اثر بر آن باعث تخریب حافظه‌ی احترازی غیر فعال می‌گردد. برخی یافته‌ها بیان‌گر اهمیت سیستم کولینرژیک در تخریب حافظه‌ی القا شده توسط موسیمول می‌باشد (۲۱). هیپوکامپ غنی از سیناپس‌های کولینرژیکی می‌باشد که می‌تواند تحت تاثیر سیستم گاباژژیک قرار گیرد (۲۲). مشخص شده است که مسیر کولینرژیک سیتو-هیپوکامپی که نقش مهمی در حافظه دارد توسط آگونیست‌های گابا تحت تاثیر قرار گرفته و مهار می‌شود (۲۳). از طرف دیگر با وجود اینکه موسیمول وقتی به‌تنهایی تزریق می‌گردد، باعث تخریب حافظه می‌گردد ولی تزریق آن به موش‌هایی که در روز آموزش حافظه آن‌ها با تزریق مقدار موثر موسیمول تخریب شده است، باعث بهبود حافظه‌ی احترازی غیر فعال می‌گردد. در این زمینه می‌توان بیان داشت که اثر یک دارو در شرایط مختلف یکسان نمی‌باشد و ممکن است تزریق یک دارو به جاندارانی که حافظه‌ی کامل دارند، باعث تخریب حافظه گردد، در حالی‌که تزریق این دارو به جاندارانی که حافظه‌ی آن‌ها با یک عامل دیگر که می‌تواند دارویی باشد، تخریب شده باعث برگشت حافظه و بهبود حافظه می‌گردد (۲۴).

نتایج ما در بخش بعدی این مطالعه نشان داد که با وجود اینکه تزریق قبل از آزمون ACPA به موش‌هایی که در روز آموزش سالیان دریافت کرده‌اند، باعث تخریب حافظه‌ی احترازی مهار می‌گردید، اما تزریق آن به موش‌هایی که در روز آموزش تحت تاثیر دوز موثر موسیمول بوده‌اند، باعث بهبود

حافظه‌ی احترازی غیرفعال تخریب شده با موسیمول شد. به‌بیان دیگر ACPA روز آزمون قادر به تقلید اثر موسیمول روز آزمون بوده و به مانند آن باعث بهبود حافظه‌ی تخریب شده با موسیمول روز آموزش می‌گردد. مطالعات نشان می‌دهد که آندوکانابینوئیدها نقش کترلی در ایجاد تعادل بین سیستم‌های تحریکی و مهاری در قشر مخ و هیپوکامپ بازی می‌کند و نقش فعالی در فرآیند پردازش اطلاعات دارا می‌باشند. در راستای نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نتایج مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد که آگونیست‌های گیرنده‌های کانابینوئیدی باعث تخریب حافظه و یادگیری می‌گردند (۱۲). در مطالعات گذشته بیشتر اثر آگونیست‌های غیر اختصاصی کانابینوئیدی در تخریب حافظه مورد بررسی قرار گرفته است و به عنوان نمونه اثرات تخریبی WIN55, 212-2 و تتراهیدروکسی کانابینول بر روی حافظه نشان داده شده است (۱۱). در این حالت نمی‌توان بیان کرد که تخریب حافظه ایجاد شده توسط کدامیک از گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1، CB2 یا CB3 میانجی‌گری شده است و با توجه به اینکه کانابینوئیدهای نقش تعدیل‌کننده بر روی حافظه دارند و اکثر آنتاگونیست‌های آن‌ها نیز باعث تخریب حافظه می‌گردند (۱۲)، نمی‌توان با تزریق آنتاگونیست‌های اختصاصی گیرنده‌های CB1، CB2 یا CB3 مشخص نمود که پاسخ مشاهده شده توسط کدامیک از گیرنده‌های کانابینوئیدی میانجی‌گری شده است (۲۵). از این نظر نتایج مطالعه‌ی حاضر اهمیت دو چندان می‌یابد چرا که علاوه بر اینکه به ما نشان می‌دهد که آگونیست‌های گیرنده‌های کانابینوئیدی باعث تخریب حافظه می‌گردند، بلکه مشخص می‌نماید که این پاسخ از طریق گیرنده‌های CB1 میانجی‌گری می‌گردد. یکی از اعمال شناخته شده کانابینوئیدها مهار تقویت دراز مدت سیناپسی LTP و تخریب حافظه می‌باشد. گیرنده‌های CB1 در پایانه‌ی آکسونی نورون‌های پیش سیناپسی قرار دارند و فعال شدن این گیرنده‌ها رهایش میانجی‌های عصبی را کاهش

می‌دهد. نشان داده شده است که کانابینوئیدها با اثر بر روی گیرنده‌های پیش سیناپسی CB1 می‌توانند رهایش گابا، گلوتامات، دوپامین، نوراپی نفرین و استیل کولین را در هیپوکامپ کاهش دهند (۲۶). با توجه به اهمیت این میانجی‌های عصبی در یادگیری و حافظه می‌توان گفت ACPA به واسطه‌ی کاهش رهایش این میانجی‌های عصبی در هیپوکامپ باعث تخریب حافظه می‌شود (۲۷). با وجود اینکه ACPA وقتی به تنهایی تزریق می‌گردد، باعث تخریب حافظه می‌گردد ولی تزریق آن به موش‌هایی که تحت تأثیر موسیمول بوده‌اند، باعث بهبود حافظه احترازی مهارتی تخریب شده با موسیمول می‌گردند. باید این عملکرد دوگانه ACPA را توجیه کرد. بهترین توضیحی که براساس شواهد موجود در این زمینه می‌توان ارائه نمود، این است که اثر یک دارو در شرایط مختلف یکسان نمی‌باشد و همچنین که شواهد پیشین نیز نشان می‌دهند ممکن است تزریق یک دارو به جاندارانی که حافظه‌ی کامل دارند، باعث تخریب حافظه گردد، در حالی که تزریق این دارو به جاندارانی که حافظه‌ی آن‌ها با یک عامل دیگر که می‌تواند دارویی باشد، تخریب شده باعث برگشت حافظه و بهبود حافظه گردد (۲۸). نتایج ما در بخش آخر این مطالعه نشان می‌دهد که مقادیر غیر موثر موسیمول و ACPA که به تنهایی قادر به اصلاح حافظه‌ی تخریب شده با موسیمول روز آموزش در موش سوری نمی‌باشند، همراه با هم می‌توانند، حافظه‌ی تخریب شده با موسیمول روز آموزش را اصلاح نمایند. این نتیجه نشان دهنده‌ی برهمکنش این دو سیستم در زمینه‌ی حافظه اجتنابی مهارتی در موش

سوری می‌باشد. در زمینه این همکاری می‌توان بیان داشت که گابا یک ناقل عصبی مهارتی می‌باشد و به واسطه‌ی مهارتی که اعمال می‌نماید، می‌تواند رهایش ناقل‌های عصبی دیگر را کاهش دهد (۷). از طرف دیگر فعال شدن گیرنده‌های پیش سیناپسی CB1 می‌تواند، رهایش طیف وسیعی از ناقل‌های عصبی را کاهش دهد (۲۸). بنابراین تحریک این دو سیستم توسط آگونیست‌های آن‌ها می‌تواند از طریق مکانیسم‌ها و گیرنده‌های مختلف شرایط نسبتاً یکسانی را ایجاد نماید و همین باعث می‌گردد که مقادیر غیر موثر آن‌ها همراه با هم به صورت موثر حافظه‌ی تخریب شده با ACPA روز آموزش را در موش سوری اصلاح نمایند.

نتیجه گیری

موسیمول در موش سوری قادر به تخریب حافظه‌ی اجتنابی مهارتی و القای یادگیری وابسته به وضعیت می‌باشد. حافظه‌ی تخریب شده با موسیمول و یادگیری وابسته به وضعیت القا شده با موسیمول در موش سوری تحت تأثیر گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 هیپوکامپ پستی قرار می‌گیرد و ACPA (آگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1) می‌تواند به مانند موسیمول روز آزمون حافظه‌ی تخریب شده با موسیمول روز آموزش را در موش سوری اصلاح نماید.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از خانم مریم السادات شاهین که ما را در آماده سازی این مقاله یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

1- Shulz DE, Sosnik R, Ego V, Haidarliu S, Ahissar E. A neuronal analogue of state-dependent learning. *Nature*. 2000; 403: 549-53.

2- Nasehi M, Piri M, Jamali-Raeufy N, Zarrindast MR. Influence of intracerebral administration of NO agents in dorsal hippocampus (CA1) on cannabinoid state-dependent memory in the step-

- down passive avoidance test. *Physiol Behav.* 2010; 100: 297-304.
- 3- Zarrindast MR, Rezayof A. Morphine state-dependent learning: sensitization and interactions with dopamine receptors. *Eur J Pharmacol.* 2004; 497: 197-204
- 4- Zarrindast M, Madadi F, Ahmadi S. Repeated administrations of dopamine receptor agents affect lithium-induced state-dependent learning in mice. *J Psychopharmacol.* 2009; 23: 645-51
- 5- Zarrindast MR, Fazli-Tabaei S, Khalilzadeh A, Farahmanfar M, Yahyavi SH. Cross state-dependent retrieval between histamine and lithium. *Physiol Behav.* 2005; 86: 154-63.
- 6- Piri M, Nasehi M, Zarrindast MR. Influence of intracerebral administration of L-Arginine in dorsal hippocampus (CA1) on WIN55, 212-2 induced state-dependent memory. *J Zanjan Uni Med Sci.* 2010; 18: 10-21.
- 7- Rassouli Y, Rezayof A, Zarrindast MR. Role of the central amygdala GABA-A receptors in morphine state-dependent memory. *Life Sci.* 2010; 86: 887-93
- 8- Bormann J. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2000; 21: 16-9
- 9- Olsen RW, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology.* 2009; 56: 141-8.
- 10- Reis HJ, Guatimosim C, Paquet M, et al. Neuro-transmitters in the central nervous system & their implication in learning and memory processes. *Curr Med Chem.* 2009; 16: 796-840.
- 11- Piri M, Zarrindast MR, Oryan S. Effects of cannabinoidergic system of CA1 area of dorsal hippocampus on the memory of nicotine sensitized rats. *Advance in Cognitive Science.* 2009; 11: 27-37.
- 12- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature.* 1993; 365: 61-5.
- 13- Oz M, Ravindran A, Diaz-Ruiz O, Zhang L, Morales M. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-mediated responses in *Xenopus* oocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 306: 1003-10.
- 14- Al-Hayani A, Davies SN. Effect of cannabinoids on synaptic transmission in the rat hippocampal slice is temperature-dependent. *Eur J Pharmacol.* 2002; 442: 47-54
- 15- Picciotto MR. Common aspects of the action of nicotine and other drugs of abuse. *Drug Alcohol Depend.* 1998; 51: 165-72
- 16- Zarrindast MR, 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.
- 17- Zarrindast MR, Nasehi M, Piri M, Bina P. Anxiety-like behavior induced by histaminergic agents can be prevented by cannabinoidergic WIN55,212-2 injected into the dorsal hippocampus in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2010; 94: 387-96.

- 18- Nasehi M, M P, M S, Zarrindast MR. Involvement of D1/D2 receptors on 1-methyl- $\hat{\text{I}}$ '-carboline (harmaline) induced-amnesia in the step-down passive avoidance test. *J Zanzan Uni Med Sci*. 2010; 18: 1-12.
- 19- Kameyama T, Nabeshima T, Kozawa T. Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method. Suitability for experimental amnesia models. *J Pharmacol Methods*. 1986; 16: 39-52.
- 20- Jafari-Sabet M. Involvement of dorsal hippocampal muscarinic cholinergic receptors on muscimol state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Life Sci*. 2011; 88: 1136-41.
- 21- 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 Neural Biol*. 1992; 58: 16-26
- 22- Richter JA, Gormley JM. Inhibition of high-affinity choline uptake in the rat hippocampus by in vivo injection of phenobarbital in the medial septum. *J Pharmacol Exp Ther*. 1986; 237: 563-8.
- 23- Piri M, Zarrindast MR. Nitric oxide in the ventral tegmental area is involved in retrieval of inhibitory avoidance memory by nicotine. *Neuroscience*. 2011; 175: 154-61.
- 24- Navaeian M, Piri M, Pakpour B. Influence of WIN55, 212-2 on morphine state-dependent memory in the step-down passive avoidance test. *Sci J Kurdistan Univ Med Sci*. 2011; 16: 84-94.
- 25- Schlicker E, Kathmann M. Modulation of transmitter release via presynaptic cannabinoid receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2001; 22: 565-72.
- 26- Gifford AN, Tang Y, Gatley SJ, Volkow ND, Lan R, Makriyannis A. Effect of the cannabinoid receptor SPECT agent, AM 281, on hippocampal acetylcholine release from rat brain slices. *Neurosci Lett*. 1997; 238: 84-6
- 27- Azami NS, Piri M, Oryan S, Jahanshahi M, Babapour V, Zarrindast MR. Involvement of dorsal hippocampal alpha-adrenergic receptors in the effect of scopolamine on memory retrieval in inhibitory avoidance task. *Neurobiol Learn Mem*. 2010; 93: 455-62.

Influence of Arachidonylcyclopropylamide (ACPA) on Muscimol State-Dependent Memory in Step-Down Passive Avoidance Test in Mice

Pakpour B¹, Jafari K², bashiri Z², Navaeian M³, Piri M⁴

¹Dept. of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Dept. of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³Dept. of Biology, Islamic Azad University, Shahr-e-Rey Branch, Shahr-e-Rey, Iran.

⁴Faculty of Medicine, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran.

Corresponding Author: Piri M, Faculty of Medicine, Dept. of Biology, Islamic Azad University, Ardabil Branch, Ardabil, Iran.

Email: biopiri@yahoo.com,

Received: 31 Oct 2012 **Accepted:** 17 Jun 2013

Background and Objective: It has been shown that cannabinoids exert widespread effects on cognitive functions. An overlapping distribution of GABA with cannabinoid receptors has been reported in some brain structures such as dorsal hippocampus. Thus, the functional interactions between cannabinoid and GABAergic systems in cognitive control seem possible. The present study evaluated the potential role of cannabinoid CB1 receptors of the dorsal hippocampus on muscimol induced amnesia and muscimol state-dependent memory in adult male mice.

Materials and Methods: In this experimental study 250 adult male NMRI mice were entered. Drugs of muscimol and ACPA were used. Mice were anaesthetized and cannulae implantation was bilaterally used in the CA1 regions of the dorsal hippocampus via stereotaxic method. Seven days after recovery from surgery, the behavioral testing was started by means of inhibitory avoidance task.

Results: Post-training injection of muscimol (0.075, 0.15 µg/mouse) impaired inhibitory avoidance memory. The memory impairment induced by ACPA (0.15 µg/mouse) was completely reversed by pre-test administration of ACPA and/or muscimol, suggesting muscimol induced state-dependent memory.

Conclusion: These results suggest that cannabinoid CB1 receptors of the dorsal hippocampal may play an essential role in muscimol-induced amnesia and muscimol state-dependent memory in mice.

Keywords: Muscimol, Arachidonylcyclopropylamide (ACPA), State-dependent memory, Mice