



## Effect of Cannabinoid Receptor Agonist WIN55, 212-2 on the Anxiety Induced By PTSD in Male Rats

Malihe Ghasemi<sup>1</sup>, Kataneh Abrari<sup>1\*</sup>, Iran Goudarzi<sup>1\*</sup>, Ali Rashidy-pour<sup>2</sup>, Mahmoud Elahdadi Salmani<sup>1</sup>

1. School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran

2. Dept. of Physiology, Learning and Memory Lab, and Research Center of Physiology, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

Received: 29 Jun 2014

Accepted: 9 Aug 2014

### Abstract

**Introduction:** Posttraumatic stress disorder is a severe anxiety disorder caused by exposure to traumatic events. The aim of this study was to induce PTSD in rats and examine the effect of WIN55-212-2, a cannabinoid receptor agonist, on anxiety.

**Methods:** SPS&S model was used to induce PTSD in 56 male Wistar rats. Rats were restrained for 2 h, immediately followed by forced swimming for 20 min. After 15 min of recuperation, animals were exposed to diethyl ether until they lost consciousness. Thirty min later, rats received an electric foot shock in a shock chamber. Rats which were in the shock group, without experiencing SPS, only received an electrical foot shock. Animals received IP injections of WIN (two doses) or vehicle, before tests, in 3 continuous days. For PTSD induction, conditioned fear response was measured. Anxiety-like behavior was examined twice with elevated plus-maze.

**Results:** PTSD induction with SPS&S significantly decreased open arm time (OAT) and open arm entry (OAE) parameter, as compared to the control. WIN (0.25 mg/kg) significantly increased OAT as compared with the control.

**Conclusion:** WIN (0.25 mg/kg) decreased the anxiety like behavior induced by PTSD, so it seems to have anti-anxiety effect.

**Key words:** Cannabinoid receptors, Post-traumatic stress disorder, anxiety, WIN55-212-2

\* Corresponding authors e-mails: [abrari@du.ac.ir](mailto:abrari@du.ac.ir)  
[irangoudarzi@du.ac.ir](mailto:irangoudarzi@du.ac.ir)  
Available online at: [www.phypha.ir/ppj](http://www.phypha.ir/ppj)

## اثرات آگونست گیرنده ی کانابینوئیدی WIN55-212-2 بر اضطراب ناشی از القاء اختلال استرس پس از سانحه (PTSD) در موش صحرایی نر

ملیحه قاسمی<sup>۱</sup>، کتانه ابراری<sup>۲\*</sup>، ایران گودرزی<sup>۱\*</sup>، علی رشیدی پور<sup>۲</sup>، محمود اله دادی سلمانی<sup>۱</sup>

۱. دانشکده زیست شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان

۲. گروه فیزیولوژی، آزمایشگاه یادگیری و حافظه، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان

پذیرش: ۱۸ مرداد ۹۳

دریافت: ۸ تیر ۹۳

### چکیده

**مقدمه:** اختلال استرس پس از سانحه (PTSD)<sup>۱</sup> از انواع اختلالات اضطرابی است که پس از یک حادثه‌ی آسیب زای شدید بروز می کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر آگونست گیرنده‌ی کانابینوئیدی بر تعدیل اضطراب ناشی از القاء PTSD در موش صحرایی نر می‌باشد.

**روش‌ها:** در این مطالعه از ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار استفاده شد. PTSD با روش SPS&S القاء شد که ۴ مرحله دارد: رت‌ها بمدت ۲ ساعت در مقید کننده بیحرکت نگه داشته شدند، به دنبال آن ۲۰ دقیقه شنای اجباری و در نهایت با دی اتیل اتر بیهوش شدند. سپس ۳۰ دقیقه بعد یک شوک الکتریکی دریافت کردند. گروه شوک بدون تجربه کردن SPS، فقط مشابه بالا شوک دریافت کردند. تزریق آگونست و یا حلال آن با دو دوز و در سه نوبت (قبل از تستها) صورت گرفت. پاسخ ترس شرطی به منظور ارزیابی وقوع PTSD سنجیده شد و دو تست اضطراب بوسیله ماز بعلاوه‌ای مرتفع انجام شد.

**یافته‌ها:** یافته‌های این تحقیق نشان داد که القاء PTSD با مدل SPS&S منجر به کاهش معنی دار دو فاکتور درصد زمان حضور در بازوهای باز (OAT) و همچنین درصد تعداد دفعات ورود به بازوهای باز (OAE) در مقایسه با کنترل گردید. تزریق درون صفاقی آگونست WIN55-212-2 با دوز ۰/۲۵mg/kg به طور معناداری میزان درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد.

**نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که آگونست گیرنده ی کانابینوئیدی WIN55-212-2 منجر به کاهش اضطراب ناشی از القاء PTSD می شود و اثرات ضد اضطرابی دارد.

واژه‌های کلیدی: گیرنده های کانابینوئیدی، اختلال استرس پس از سانحه، اضطراب، WIN55-212-2

### مقدمه

۳۰/۵ درصد در مقایسه با مردان، با شیوع مادام العمر ۱۹/۲ درصد، بیشتر ممکن است دچار یک اختلال اضطرابی شوند [۳۱، ۱۲، ۹].

اختلال استرس پس از سانحه (PTSD)<sup>۱</sup>، نوعی بیماری اضطرابی ناشی از مواجهه با عوامل آسیب‌رسان بسیار شدید است. این مواجهه می‌تواند به صورت دیدن، حضور یا شنیدن باشد [۳۶، ۱۸].

فشاری که سبب PTSD می‌شود، معمولاً به قدری ناتوان

به طور کلی اختلالات اضطرابی از شایع‌ترین طبقات اختلالات روانی است و انواع مختلفی دارد. گزارش شده است که از هر چهار نفر، یک نفر، واجد معیارهای تشخیص دست کم یک اختلال اضطرابی است. زنان با شیوع مادام العمر

abrari@du.ac.ir

irangoudarzi@du.ac.ir

www.phypha.ir/ppj

\* نویسندگان مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

1. Post-traumatic stress disorder

عملکردهای گوناگونی در سیستم عصبی مرکزی می‌باشند. به عنوان مثال: درجسم مخطط در فعالیت‌های حرکتی، در قشر مغز و Nucleus Accumbens در فرایند پاداش، در هیپوتالاموس در تنظیم محور نورواندوکراین، رفتار غذا خوردن و تعادل انرژی و در هیپوکامپ، آمیگدال و قشر مغز در فرایند یادگیری و حافظه نقش دارند [۱۷، ۳۴].

یکی از نقش‌های بسیار مهم این سیستم، نقش در تعدیل استرس و اضطراب می‌باشد [۱۱، ۴۱]. مشخص شده است که اندوکانبینوئیدها در مدار کورتیکولیمبیک در تعدیل استرس و اضطراب نقش دارد. برخی مطالعات نشان داده است که مهار دارویی گیرنده‌های  $CB_1$  کانابینوئیدی منجر به افزایش میزان اضطراب در موش صحرائی می‌شود.

همچنین مطالعات دیگر نشان داده است که آگونیست گیرنده‌ی کانابینوئیدی یعنی  $\Delta^9THC$  منجر به کاهش میزان افسردگی و اضطراب می‌گردد [۲۰، ۳۳].

بر اساس این شواهد و دیگر شواهد در زمینه‌ی اثرات تعدیلی اندوکانبینوئیدها بر اضطراب، هدف از این مطالعه بررسی اثرات آگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی WIN55-212-2 بر تعدیل اضطراب ناشی از القاء PTSD در موش صحرائی نر می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش صحرائی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۰۰-۱۸۰ گرم استفاده شد. حیوانات در سیکل روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه‌ی سانتیگراد و میزان آب و غذای کافی نگهداری شدند. اصول اخلاقی کار بر روی حیوانات براساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان رعایت شد. آگونیست گیرنده‌ی کانابینوئیدی WIN55-212-2 با دوز-های ۰/۲۵ و ۱/۲۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن (دوزهای موثر مطالعات قبل) به صورت درون صفاقی تزریق شد. تزریق دارو روزانه یکبار و برای سه روز متوالی پس از القاء PTSD انجام گردید. آگونیست WIN55-212-2 در سالیان ۰/۹ درصد و DMSO به نسبت ۱:۹ حل شد.

دستگاه ترس شرطی (Nuldos، هلند) به دو منظور اعمال

کننده است که تقریباً هرکسی را از پای در می‌آورد. فرد بصورت ترس و درماندگی به این تجربه پاسخ می‌دهد، واقعه را دائماً در ذهن خود مجسم می‌کند، درعین حال می‌خواهد از یادآوری آن اجتناب کند. علایم مزبور باید حداقل یک ماه طول کشیده باشد و بر حوزه‌های مهمی از زندگی بیمار نظیر خانواده و شغل او تأثیر گذاشته باشد تا بتواند به عنوان اختلال استرس پس از سانحه مطرح گردد [۳۲، ۳۷، ۳۹].

از ویژگی‌های برجسته‌ی این بیماری افزایش اضطراب می‌باشد. مطالعات مختلف نشان داده است، افرادی که به PTSD مبتلا می‌شوند از اضطراب بسیار شدید در رنجند [۱۸، ۳۶].

گیاه شاهدانه در زبان انگلیسی کانابیس و در زبان اسپانیایی ماری جوانا نامیده می‌شود. از این گیاه تا کنون بیش از ۶۱ ماده‌ی شیمیایی بدست آمده که همگی کانابینوئید نامیده می‌شوند.

### 1-Post traumatic stress disorder (PTSD):

در واقع کانابینوئیدها ترکیبات موجود در گیاه شاهدانه و آنالوگ‌های صنایع از مشتقات اسیدهای چرب بویژه اسید آراشیدونوئیک می‌باشند که همگی ماهیت لیپیدی دارند [۲۶، ۴۴]. اصلی‌ترین ماده‌ی کانابینوئید دلتا ۹ تترا هیدروکانابینولیا  $\Delta^9THC$  می‌باشد که با اتصال به گیرنده‌های کانابینوئیدی در مغز به عنوان مسئول بیشتر آثار روانگردانی کانابیس به شمار می‌رود [۱۰، ۴۳].

کانابینوئیدها از طریق دو نوع گیرنده‌ی اصلی که  $CB_1$  و  $CB_2$  نامیده می‌شوند اثرات خود را اعمال می‌نمایند [۱، ۱۶، ۳۸]. گیرنده‌های  $CB_1$  به مقدار زیاد در سیستم عصبی مرکزی مانند قشر مغز عقده‌های قاعده‌ای آمیگدال و ساختار هیپوکامپ که نقش اساسی در حافظه و یادگیری دارند بیان می‌شوند. درحالی‌که گیرنده‌های  $CB_2$  به طور عمده در بافت-های محیطی نظیر سلول‌های ایمنی، کبد، طحال و بیضه-هایافت می‌شود [۵، ۴۰].

کشف لیگاند‌های آندوژن کانابینوئیدی (اندوکانبینوئیدها) مانند آناندامید و دی آراشیدونوئیل گلیسرول که از طریق گیرنده‌های کانابینوئیدی عمل می‌کند باعث شد که اثرات درمانی کانابینوئیدها بیشتر مورد توجه قرار گیرد [۷، ۱۵، ۱۹]. اندوکانبینوئیدها با توجه به مکان ساخته شدن دارای

بازوهای باز، بازوهای بسته و همچنین مجموع زمان سپری شده در بازوها محاسبه می‌شود. عبور چهار دست و پای حیوان از خط ورودی بازوها ورود محسوب می‌شود. درصد دفعات ورود به بازوی باز و درصد زمان حضور در بازوی باز که ملاک اضطراب است به اینصورت محاسبه می‌گردند. الف: درصد نسبت ورود به بازوی باز به مجموع ورود به بازوهای باز و بسته (OAT٪)؛ ب: درصد زمان سپری شدن در بازوی باز به مجموع زمان سپری شده در بازوی باز و بسته (OAE٪).

هدف از آزمایش اول بررسی اثرات آگونیست WIN55-212-2 (۰/۲۵ و ۱/۲۵ میلی گرم) بر پاسخ ترس شرطی شده ناشی از القاء PTSD می‌باشد. حیوانات بصورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند: گروه شوک بعنوان گروه کنترل، که تنها شوک الکتریکی با مشخصات بالا دریافت کردند و گروه SPS&S که مراحل SPS و شوک را به منظور القاء PTSD تجربه کردند. حیوانات هر گروه سه دسته شدند و به هر دسته حلال آگونیست (DMSO+Salin) و یا آگونیست با دوزهای ۰/۲۵ و ۱/۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تزریق شد (n=۹ در هر دسته) [۲۸، ۲۹].

تزریق، یکروز پس از اعمال شوک و برای سه روز متوالی و روزانه بصورت درون صفاقی انجام شد. نیم ساعت پس از تزریق سوم، سنجش پاسخ ترس شرطی توسط دستگاه ترس شرطی شده انجام شد [۴۴، ۴۵]. افزایش میزان پاسخ ترس شرطی شده، شاخصی از وقوع PTSD است.

هدف از آزمایش دوم بررسی اثرات آگونیست WIN55-212-2 (۰/۲۵ و ۱/۲۵ میلی گرم) بر میزان اضطراب ناشی از القاء PTSD.

گروه‌ها و روش آزمایش مشابه آزمایش اول است با این تفاوت که جهت انجام تست اضطراب ادامه یافت. دو تست اضطراب توسط ماز بعلاوه‌ای مرتفع صورت گرفت، تست اول هشت روز پس از سنجش پاسخ ترس شرطی شده و تست دوم به فاصله ۲۰ روز بعد از تست یک انجام گرفت.

در این تحقیق داده‌ها به منظور تجزیه و تحلیل به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه شده است. آنالیز داده‌های آماری به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. ارزیابی داده‌ها با توجه به توزیع پارامتریک داده‌ها با کمک آزمون آنالیز واریانس یک طرفه انجام گرفت و آزمون تکمیلی توکی برای

شوک الکتریکی و ارزیابی میزان حافظه‌ی ترومایی مورد استفاده قرار گرفت. این دستگاه شامل محفظه‌ی مکعب مستطیل شکل از جنس پلاستیک شفاف به ابعاد ۴۷×۴۵×۴۵ cm می‌باشد. ثبت میزان بی‌حرکتی حیوان یا Freezing (حذف همه اعمال حرکتی بجز حرکات تنفسی) با کمک دوربین بکار رفته در سقف این دستگاه انجام گرفت. افزایش میزان بی‌حرکتی نشان دهنده‌ی تشکیل حافظه‌ی ترومایی است. مدت زمانی که حیوان بی‌حرکت است نسبت به کل زمان قرارگیری در دستگاه، به صورت درصد توسط نرم افزار (EthoVision (Version 3 متصل به دستگاه محاسبه می‌شود.

القاء PTSD به روش SPS&S<sup>۱</sup>: در مدل مورد توافق SPS در سه مرحله انجام می‌شود. مرحله‌ی اول: حیوانات ۲ ساعت در مقید کننده<sup>۲</sup> بی‌حرکت شدند. مرحله‌ی دوم: بلافاصله بعد از خروج از مقید کننده، حیوانات به مدت ۲۰ دقیقه در ظرفی استوانه‌ای شکل جهت شنای اجباری قرار گرفتند. مرحله‌ی سوم: ۱۵ دقیقه بعد از شنا با دی اتیل اتر بیهوش شدند [۴۵].

۳۰ دقیقه بعد القاء SPS، یک شوک الکتریکی توسط سیستم ترس شرطی به حیوانات اعمال گرفت.

ماز بعلاوه‌ای مرتفع<sup>۳</sup>، یک ماز چوبی به شکل بعلاوه است که بر چهار پایه استوار است (ساخت ایران). دوتا از بازوها فاقد دیواره‌ی جانبی و انتهایی هستند، به نام بازوهای باز (۱۰×۵۰ سانتی متر). دو بازوی دیگر دارای دیواره‌ی جانبی و یک دیواره‌ی انتهایی هستند ولی سقف آن باز است (بازوهای بسته ۴۰×۱۰×۵۰).

در محل برخورد این چهار بازو یک صفحه‌ی مربع شکل به ابعاد ۱۰×۱۰ قرار دارد. ارتفاع ماز از زمین ۵۰ سانتی متر است. هر حیوان به تنهایی در مرکز ماز به صورتی گذاشته می‌شود که صورت حیوان به سمت بازوی باز باشد و ۵ دقیقه در ماز به صورت آزاد حرکت کند. در این مدت ۵ دقیقه تمام تحرکات حیوان فیلمبرداری شده و تعداد دفعات ورود حیوان به

1. Single prolonged stress and shock (SPS&S)
2. Restrainer
3. Elevated Plus-Maze

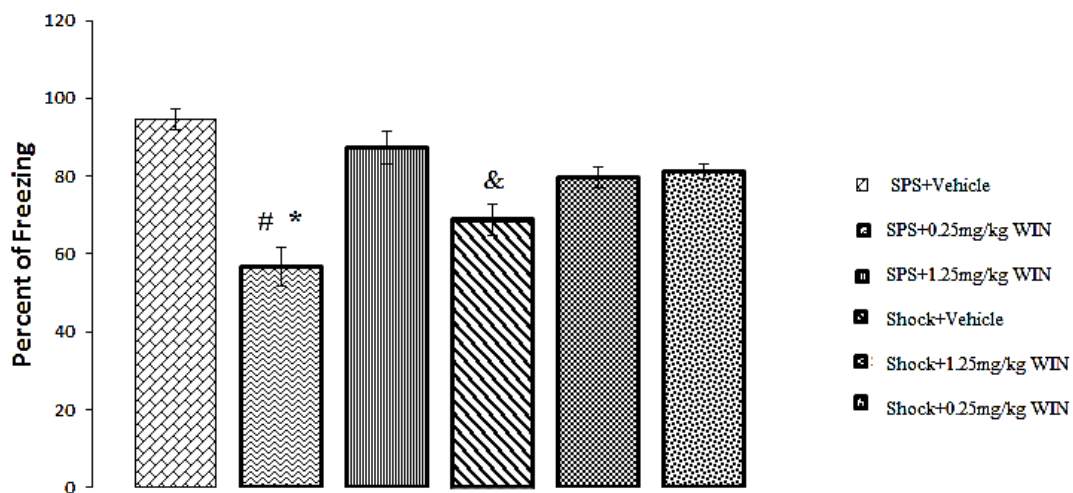
بی‌حرکتی در حیوانات گروه SPS از حیوانات شوک بطور معنی داری کمتر است.

همچنین آنالیز تکمیلی توکی برای مقایسه گروه‌های شوک و SPS که آگونیست را با دوز ۱/۲۵ دریافت کردند، نشان داد که تفاوت معنی داری بین دو گروه وجود ندارد (شکل ۱).

در آزمایش دوم، سنجش میزان اضطراب در شش گروه ذکر شده در آزمایش اول در دو نوبت و توسط آنالیز واریانس یک طرفه انجام گرفت.

تست اول اضطراب: آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که سنجش اضطراب گروه‌های مختلف از نظر درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز با یکدیگر تفاوت معنادار دارند [F(۵,۵۰)=۱۸/۸۷, P=۰/۰۰۰] و آزمون تکمیلی توکی نشان داد که آگونیست WIN55-212-2 با دوز ۰/۲۵mg/kg به طور معناداری میزان درصد زمان گذرانده شده را در بازوی باز در گروه SPS+۰/۲۵WIN mg/kg در مقایسه با گروه کنترل (SPS+Vehicle) افزایش داد (شکل ۲). در گروه Shock+WIN با دوز ۰/۲۵ نیز مقدار درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز در مقایسه با گروه Shock+Vehicle افزایش معنی داری داشت (شکل ۲). در هر سه گروه شوک مقادیر درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز در مقایسه با گروه‌های SPS افزایش معنی داری داشت (شکل ۲).

درصد تعداد دفعات ورود به بازوی باز در گروه‌های مختلف



شکل ۱- بررسی اثرات تزریق آگونیست WIN55-212-2 بر مقدار پاسخ ترس شرطی شده. داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند (n = ۱۰ یا ۹).

\*P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه SPS+Vehicle. #P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه Shock+WIN/25mg/kg. &P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه SPS+Vehicle.

بررسی وجود تفاوت معنی دار بین گروه‌های آزمایشی استفاده شد. ملاک معنادار بودن داده‌ها  $P<۰/۰۵$  در نظر گرفته شد.

## یافته ها

در آزمایش اول، مقایسه میزان بی‌حرکتی بین ۶ گروه آزمایشی بشرح زیر توسط آنالیز واریانس یک طرفه انجام گرفت.

گروه‌ها عبارت بودند از: SPS+vehicle، SPS + WIN ۱/۲۵ mg/kg و SPS + WIN ۰/۲۵mg/kg، Shock + Vehicle، Shock + WIN با دوز ۰/۲۵ و Shock+WIN با دوز ۱/۲۵ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن.

نتایج نشان داد که بین گروه‌ها تفاوت معنادار وجود دارد [F(۵,۵۰)=۱۱/۰۷, P=۰/۰۰۰].

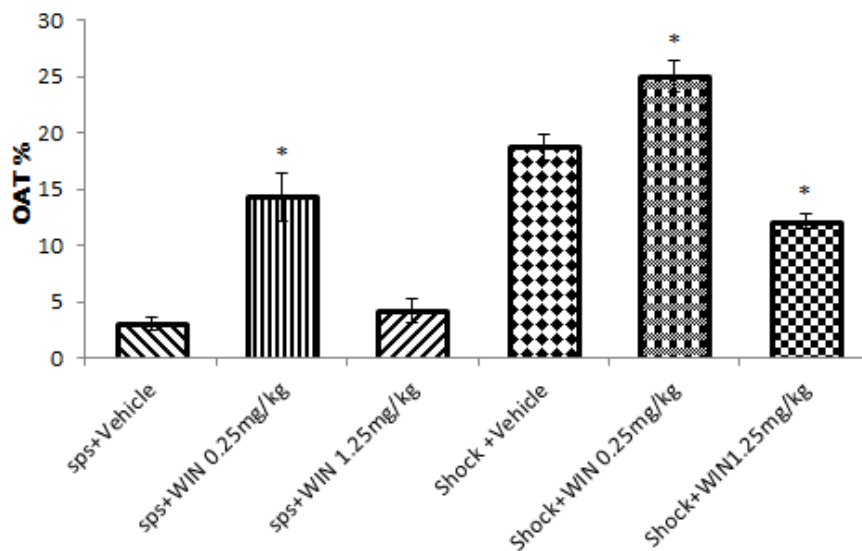
آنالیز تکمیلی توکی در مقایسه‌ی گروه‌های شوک و SPS که هر دو حامل دریافت کرده بودند نشان داد که مقدار پاسخ شرطی در گروه بیمار بیشتر از گروه شوک بود.

آنالیز تکمیلی توکی برای مقایسه گروه‌های SPS+vehicle و SPS+WIN 0.25 mg/kg نشان داد که آگونیست بطور معنا داری مقدار پاسخ ترس شرطی را کاهش داده است. از طرفی مقایسه گروه‌های شوک و SPS که آگونیست را با دوز ۰/۲۵ دریافت کردند، نشان داد که مقدار

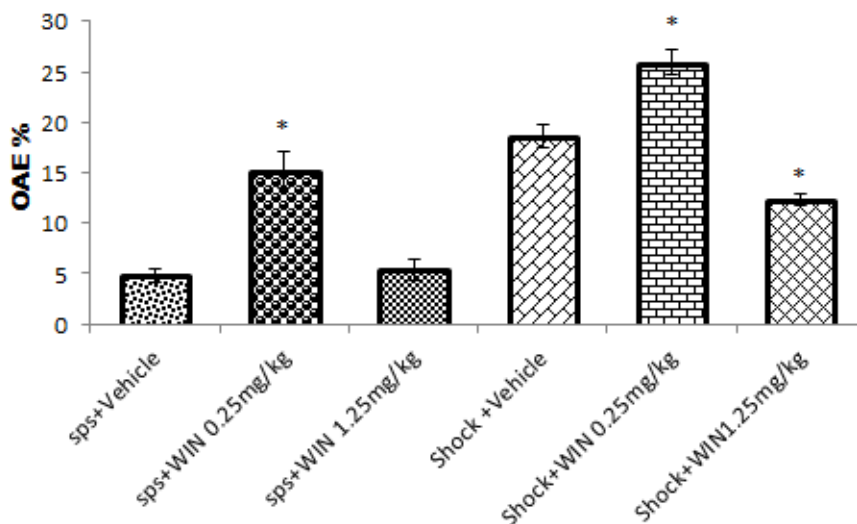
بازوی باز در مقایسه با گروه Shock+Vehicle افزایش معنی داری داشت (شکل ۳). در هر سه گروه شوک مقادیر دفعات ورود به بازوی باز در مقایسه با گروه‌های SPS افزایش معنی داری داشت (شکل ۳).

دو نتیجه‌ی بالا نشان دهنده‌ی کاهش میزان اضطراب در حیوانات بیمار که آگونیست را با دوز ۰/۲۵ دریافت کردند نسبت به گروه کنترل (بیمار که حلال آگونیست دریافت کردند) است. از طرف دیگر این آگونیست با دوز ۰/۲۵ میزان اضطراب فیزیولوژیک را در حیوانات گروه شوک نیز کاهش داد. مقایسه گروه‌های شوک و بیمار حاکی از این است که آگونیست با دوز

نیز در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج مشابه درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز بود، آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوت معنی‌داری از نظر درصد دفعات ورود به بازوی باز بین گروه‌های مختلف وجود دارد [F(۵,۵۰)=۲۲/۲۳، P=۰/۰۰۰] و آزمون تکمیلی توکی نشان داد که آگونیست WIN55-212-2 با دوز ۰/۲۵ mg/kg به طور معناداری میزان درصد دفعات ورود به بازوی باز را در گروه SPS+۰/۲۵ WIN mg/kg در مقایسه با گروه کنترل (SPS+Vehicle) افزایش داد (شکل ۳). در گروه Shock+WIN با دوز ۰/۲۵ نیز مقدار درصد دفعات ورود به



شکل ۲- بررسی اثرات تزریق آگونیست WIN55-212-2 بر فاکتور درصد زمان حضور در بازوی باز (تست اول). داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند در گروهها (۹ یا ۱۰ n) بوده است. \*P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل مربوطه.



شکل ۳- بررسی اثرات تزریق آگونیست WIN55-212-2 بر فاکتور درصد دفعات ورود به بازوی باز (تست اول). داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند در گروهها (۹ یا ۱۰ n) بوده است. \*P<۰/۰۰۱ در مقایسه با گروه کنترل مربوطه.

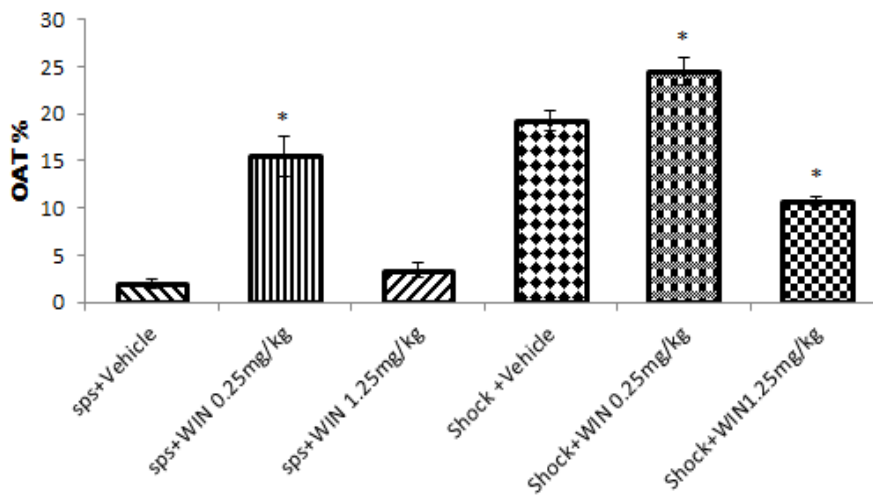
اضطراب فیزیولوژیک و عدم تاثیر دوز بالا بر اضطراب پاتولوژیک می‌باشد (شکل‌های ۲ و ۳).

همچنین آنالیز واریانس یک طرفه سنجش اضطراب در تست دوم نیز نشان داد که گروه‌های مختلف از نظر درصد زمان گذرانده شده در بازوی باز با یکدیگر تفاوت معنادار دارند [F(۵,۵۰)=۳۰/۵۹،P=۰/۰۰۰] و آزمون تکمیلی توکی نشان داد که آگونیست WIN55-212-2 با دوز ۰/۲۵ mg/kg در گروه SPS+ 0.25 WIN به طور معناداری میزان درصد زمان گذرانده شده را در بازوی باز در مقایسه با سایر گروه SPS+Vehicle افزایش داد (شکل ۴).

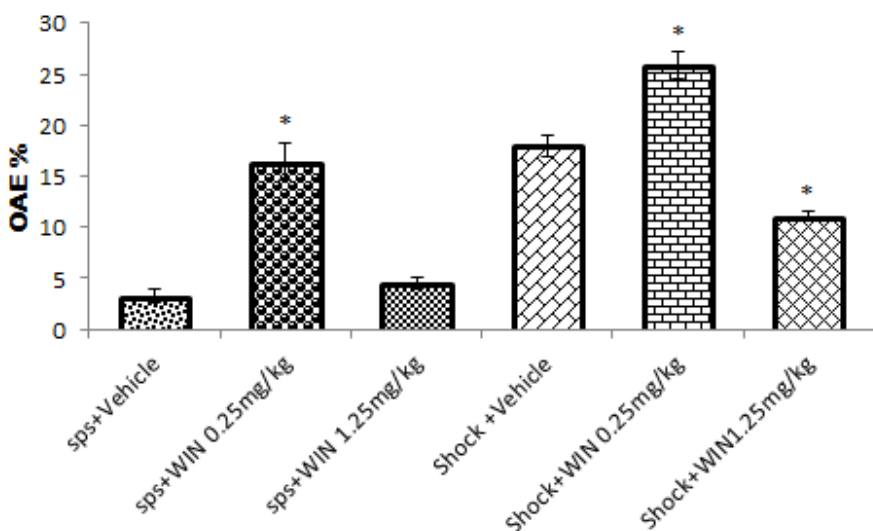
بعلاوه آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد که در تست

۰/۲۵ در هر دو حالت فیزیولوژیک و پاتولوژیک اثر ضد اضطرابی دارد ولی در گروه شوک معنی دار تر است.

همچنین آزمون تکمیلی توکی نشان داد حیوانات بیماری که تحت تاثیر این آگونیست با دوز ۱/۲۵mg/kg قرار گرفتند تفاوت معناداری را در میزان درصد زمان سپری شده در بازوی باز و همچنین درصد دفعات ورود به بازوی باز در مقایسه با گروه کنترل مربوطه (SPS+Vehicle) نشان ندادند. میزان درصد زمان سپری شده در بازوی باز و همچنین درصد دفعات ورود به بازوی باز در گروه شوک کاهش معناداری در مقایسه با گروه کنترل مربوطه (Shock+Vehicle) نشان دادند. این نتیجه حاکی از اثرات نامطلوب دوز بالای این آگونیست بر



شکل ۴- بررسی اثرات تزریق آگونیست WIN55-212-2 بر فاکتور درصد زمان حضور در بازوی باز (تست دوم). داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند در گروهها (۹ یا ۱۰ n) بوده است.  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل مربوطه.



شکل ۵- بررسی اثرات تزریق آگونیست WIN55-212-2 بر فاکتور درصد دفعات ورود به بازوی باز (تست دوم). داده‌ها به صورت Mean±SEM نمایش داده شده‌اند در گروهها (۹ یا ۱۰ n) بوده است.  $P < 0.001$  در مقایسه با گروه کنترل مربوطه.

دوم سنجش اضطراب تفاوت معنی‌داری از نظر درصد دفعات ورود به بازوی باز بین گروه‌های مختلف وجود دارد [P=۰/۰۰۰، F(۵,۵۰)=۳۶/۱۵] و آزمون تکمیلی توکی نشان داد که آگونیست WIN55-212-2 با دوز ۰/۲۵mg/kg به طور معنا-داری میزان درصد دفعات ورود به بازوی باز را در گروه SPS+WIN0/25 در مقایسه با SPS+Vehicle افزایش داد (شکل ۵). نتیجه‌ی مذکور نشان دهنده‌ی پایداری اثرات ضد اضطرابی آگونیست در حیوانات این گروه می‌باشد. نتایج نشان داد حیواناتی که تحت تأثیر این آگونیست با دوز ۱/۲۵mg/kg قرار گرفتند در تست دوم سنجش اضطراب نیز کاهش معناداری را در میزان درصد زمان سپری شده در بازوی باز و همچنین درصد دفعات ورود به بازوی باز در مقایسه با گروه کنترل دارند (اشکال ۴ و ۵).

## بحث

در مطالعه حاضر به منظور ایجاد بیماری PTSD از مدل SPS&S استفاده شد، به این ترتیب که ابتدا حیوانات مراحل سه گانه SPS را تجربه کرده و سپس یک شوک الکتریکی ۱/۵ میلی آمپری به مدت ۱ ثانیه با هدف شکل‌گیری حافظه-ی ترس شرطی دریافت می‌کردند. از علائم مهم القاء شدن بیماری PTSD افزایش شدید پاسخ ترس شرطی شده، یک هفته پس از القاء مدل در حیوان است. به همین منظور برای اطمینان از القاء بیماری مقدار پاسخ ترس شرطی حیوانات سنجیده می‌شد. پس از حصول اطمینان، بررسی اثرات آگونیست گیرنده‌ی کانابینوئیدی WIN55-212-2 با تزریق درون صفاقی دوزهای ۰/۲۵ و ۱/۲۵ این دارو، قبل از آزمایش ترس شرطی شده صورت می‌گرفت.

یافته‌ها نشان داد که استفاده از مدل SPS&S پس از یک هفته منجر به افزایش معنا داری در پاسخ ترس شرطی یا بی-حرکتی در حیوانات گروه SPS+Vehicle در مقایسه با گروه Shock+Vehicle گردید. این نتیجه نشان دهنده‌ی قوی بودن حافظه‌ی ترس شرطی شده در حیوانات این گروه و در واقع نشانه ابتلاء به بیماری PTSD می‌باشد. یافته‌ی حاضر هم راستا با یافته‌های گذشته می‌باشد که محققین نشان دادند استفاده از مدل SPS&S یک هفته پس از القاء منجر به

افزایش پاسخ ترس شرطی می‌شود [۴۴، ۴۵]. مقایسه‌ی میزان بی‌حرکتی گروه بیمار و گروه بیماری که با دوز پایین (۰/۲۵) آگونیست WIN55-212-2 تیمار شده نشان داد که آگونیست به طور معناداری منجر به تضعیف پاسخ ترس شرطی شده می‌گردد. این نتیجه با نتایج قبلی مبنی بر اثر تسهیل‌کننده‌ی دوز پائین آگونیست گیرنده‌های اختصاصی و غیر اختصاصی کانابینوئیدی بر خاموشی حافظه‌ی ترس شرطی شده همخوانی دارد [۲۷-۲۹]. یکی از اعمال شناخته شده‌ی اندوکانابینوئیدها خاموشی حافظه می‌باشد [۲۲]. اگرچه مکانیسم مداخله‌ی آگونیست WIN55-212-2 بر پاسخ‌های رفتاری ناشی از القاء PTSD به روش SPS&S مشخص نیست اما گمان می‌رود که WIN55-212-2 این عمل را از طریق تأثیر بر برخی از سیستم‌های نوروترانسمیتری انجام می‌دهد. گیرنده‌های CB1 در پایانه‌ی اکسونی نورون-های پیش سیناپسی قرار گرفته‌اند و فعال شدن این گیرنده‌ها رهایش میانجی‌های عصبی را کاهش می‌دهد [۲]. نشان داده شده است که اندوکانابینوئیدها با اثر بر روی گیرنده‌های پیش سیناپسی CB1 می‌توانند رهایش گابا، گلوتامات، دوپامین، نور اپی نفرین و استیل کولین را در نواحی مربوط به خاموشی حافظه نظیر هیپوکامپ کاهش دهند [۲۴]. احتمالاً WIN55-212-2 بواسطه‌ی کاهش رهایش این میانجی‌های عصبی سبب خاموشی حافظه‌ی ترس شرطی شده‌ی ناشی از القاء PTSD در مدارهای نورونی مرتبط با PTSD در مدل SPS&S گردیده است.

ماز بعلاوه‌ای مرتفع یک مدل انتخابی و رایج جهت بررسی رفتارهای اضطرابی در جوندگان می‌باشد [۲۱]. دو فاکتور درصد زمان حضور در بازوهای باز و همچنین درصد دفعات ورود به بازوهای باز به منظور سنجش اضطراب بررسی شدند. این سنجش در همه‌ی گروه‌ها دو بار و به فواصل زمانی متفاوت انجام گرفت.

در مطالعه‌ی حاضر اثرات سیستم اندوکانابینوئیدی بر رفتارهای اضطرابی ناشی از القاء PTSD بررسی گردید.

در این پژوهش نتایج بدست آمده از تست اول نشان داد که آگونیست انتخابی گیرنده‌ی CB1 (WIN55-212-2) با دوز پائین ۰/۲۵ دارای اثرات ضد اضطرابی در حیوانات PTSD می‌باشد. به این ترتیب که دو فاکتور درصد زمان حضور در



بعنوان نتیجه گیری کلی اینکه، آگونیسست مورد استفاده در دو گروه سالم و بیمار بصورت وابسته به دوز و به دو شکل متفاوت عمل می‌کند. به نحوی که در هر دو گروه مبتلا و سالم منجر به کاهش اضطراب با دوز پائین و با دوز بالا سبب افزایش اضطراب می‌گردد.

این نتایج متناقض در ارتباط با اثرات اضطرابی کانابینوئیدها نشان دهندهی نقش تعدیل کنندهی کانابینوئیدها در زمینهی رفتارهای مرتبط با ترس و اضطراب می‌باشد.

ترکیبات کانابینوئیدی سبب القای سرخوشی می‌شوند که این سرخوشی می‌تواند با کاهش اضطراب همراه باشد. از طرف دیگر ترکیبات کانابینوئیدی می‌توانند سبب القای بی-قراری، حس اضطراب، ترس ناگهانی<sup>۱</sup> و روان پریشی<sup>۲</sup> نیز شوند [۸].

مطالعات مختلف نشان داده است که تفاوت گونه‌ها در نوع اثر کانابینوئیدها بر رفتار حیوان اثر دارد. مثلاً در موش صحرایی نر نژاد لوئیس،  $\Delta\text{THC}$ <sup>۹</sup> اثرات ضد اضطرابی دارد در حالیکه در بقیه‌ی گونه‌های موش‌های صحرایی از قبیل ویستار هم می‌تواند دارای اثرات اضطراب زا و هم اثرات اضطراب زدا باشد [۲۵]. همچنین گزارش شده است که توزیع گیرنده‌های کانابینوئیدی در مغز موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار و لوئیس متفاوت است [۳]. با توجه به این گزارشات به نظر می‌رسد نوع پاسخ اضطرابی ایجاد شده توسط ترکیبات کانابینوئیدی به نوع حیوان، روش بکار گرفته شده جهت بررسی اضطراب و دوز داروی مصرفی بستگی داشته باشد.

همان‌طور که گفته شد مطالعات ما نشان داد که آگونیسست گیرندهی کانابینوئیدی بصورت وابسته به دوز منجر به کاهش میزان اضطراب در رت‌های PTSD با مدل SPS&S گردید. اگر چه مکانیسم اثر آگونیسست WIN55-212-2 بر اضطراب ناشی از القاء PTSD به روش SPS&S مشخص نیست اما گمان می‌رود که این آگونیسست عمل خود را بر اضطراب از طریق تأثیر بر برخی سیستم‌های نوروترانسمیتری انجام داده باشد.

شواهدی وجود دارد که استیل کولین دارای اثری تعدیل

بازوهای باز و همچنین درصد تعداد دفعات ورود به بازوهای باز افزایش معناداری در گروه تیمار شده با این دوز، در مقایسه با گروه کنترل نشان داد. افزایش این دو فاکتور حاکی از کاهش میزان اضطراب می‌باشد.

بعلاوه، مطالعه‌ی حاضر نشان داد، اثرات ضد اضطرابی این آگونیسست در تست دوم سنجش اضطراب یعنی پس از گذشت ۲۰ روز همچنان پایدار باقی ماند و آگونیسست WIN55-212-2 اثرات ضد اضطرابی خود را پس از گذشت مدت زمانی طولانی حفظ کرده است.

چندین مطالعه نتایج ما را تأیید می‌کند و نشان دهندهی اثرات ضد اضطرابی آگونیسست‌های گیرندهی کانابینوئیدی می‌باشند. به عنوان مثال دوزهای پائین نابلون، CP55940 و تترا هیدروکسی کانابینول که هر سه آگونیسست‌های گیرندهی کانابینوئیدی می‌باشند در مدل‌های اضطرابی مختلف اثرات ضد اضطرابی نشان دادند [۴، ۲۳].

همچنین این مطالعه نشان داد، اثرات آگونیسست WIN55-212-2 وابسته به دوز می‌باشد به این ترتیب که با دوز پائین (۰/۲۵) دارای اثرات ضد اضطرابی و با دوز بالا (۱/۲۵) اضطراب زا می‌باشد.

این نتیجه نیز با سایر نتایج مبنی بر اینکه مقادیر بالای آگونیسست‌های کانابینوئیدی نظیر HU-210 و CP55940 دارای اثرات اضطراب زا می‌باشند هم‌راستا می‌باشد [۴]. علاوه بر این در مطالعات انسانی نیز اضطراب از اثرات ناخواسته‌ی مصرف کانابینوئیدها گزارش شده است که یکی از علل قطع مصرف آنها به شمار می‌رود [۱۳].

در مطالعه‌ی حاضر علاوه بر حیوانات مبتلا به PTSD، اثرات آگونیسست کانابینوئیدی بر حیوانات شرطی شده نیز بررسی شد. حیوانات سالمی که بدون تجربه‌ی SPS&S، تنها در قفس ترس شرطی شوک دیده و شرطی شده بودند نیز دو بار تحت آزمون EPM قرار گرفتند. نتایج نشان داد که همانند حیوانات مبتلا به PTSD در گروه سالم (شوک) نیز، دوز پائین آگونیسست WIN55-212-2 دارای اثرات اضطراب زدا و دوز بالا اضطراب زا می‌باشد.

این مطالعه هم‌راستا با مطالعات هالر و همکاران (۲۰۰۲)، پاتل و هیلارد (۲۰۰۶)، رابینو (۲۰۰۸) و سایر مطالعات پیشین دیگر می‌باشد [۳۰، ۱۴، ۳۵].

1. panic  
2. psychosis

2-212-55 WIN بصورت وابسته به دوز منجر به کاهش میزان اضطراب در اضطراب ناشی از القاء PTSD در موش صحرایی نر می‌شود.

### سپاسگزاری

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه خانم ملیحه قاسمی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد فیزیولوژی از دانشگاه دامغان بود. بدینوسیله از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان به دلیل پرداخت هزینه مواد، وسایل و فراهم آوردن امکانات لازم تشکر و قدردانی می‌گردد.

کننده بر اضطراب می‌باشد. با توجه به اثر تعدیل‌کننده‌ی استیل‌کولین در زمینه‌ی رفتارهای اضطرابی این احتمال وجود دارد که استفاده از مقادیر پائین آگونیست 2-212-55 WIN سبب القای یک اثر تحریکی زودگذر و بکاربردن مقادیر بالای آن سبب یک مهار طولانی مدت در ره‌های استیل‌کولین در مدارهایی نظیر هیپوکامپ گردد [۴۲]. با توجه به این احتمال میتوان اثرات اضطرابی متفاوت مقادیر بالا و پائین آگونیست گیرنده‌ی کانابینوئیدی یعنی 2-212-55 WIN را در ارتباط با اثرات متفاوت مقادیر مختلف کانابینوئیدها بر ره‌های استیل‌کولین دانست [۶]. نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر آن است که آگونیست

## References

- [1] Abood ME, Molecular biology of cannabinoid receptors. *Handb Exp Pharmacol* 168 (2005) 81-115.
- [2] Alger BE, Retrogradesignaling in the regulation of synaptic transmission: focus on endocannabinoids. *Prog Neurobiol* 68 (2002) 247-286.
- [3] Arnold JC, The distribution of cannabinoid-induced Fos expression in rat brain: differences between the Lewis and Wistar strain. *Brain Res* 921 (2001) 240-255.
- [4] Berrendero F, Maldonado R, Involvement of the opioid system in the anxiolytic-like effects induced by Delta(9)-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacol (Berl)* 163 (2002) 1111-1117.
- [5] Callen L, Cannabinoid receptors CB1 and CB2 form functional heteromers in brain. *J Biol Chem* 287 (2012) 20851-20865.
- [6] Degroot A, Treit D, Dorsal and ventral hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Brain Res* 949 (2002) 60-70.
- [7] De Petrocellis L, Di Marzo V, An introduction to the endocannabinoid system: from the early to the latest concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 23 (2009) 1-15.
- [8] Dsouza DC, Cannabinoids and psychosis. *Int Rev Neurobiol* 78 (2007) 289-326.
- [9] Eaton WW, Kramer M, Anthony JC, Dryman A, Shapiro S, Locke BZ, The incidence of specific DIS/DSM-III mental disorders: data from the NIMH Epidemiologic Catchment Area Program. *Acta Psychiatr Scand* 79 (1989) 163-178.
- [10] Fattore L, Considering gender in cannabinoid research: a step towards personalized treatment of marijuana addicts. *Drug Test Anal* 5 (2013) 57-61.
- [11] Hajizadeh Moghaddam A, Bigdellu R, Fatemi Tabatabaei SR, Roohbakhsh A, Cannabinoid System of the Lateral Septum in the Modulation of Anxiety-like Behaviors in Rats. *Arch Iran Med* 16 (2013) 711-716.
- [12] Halbreich U, Anxiety disorders in women: a developmental and lifecycle perspective. *Depress Anxiety* 17 (2003) 107-110.
- [13] Hall W, Solowij N, Adverse effects of cannabis. *Lancet* 352 (1998) 1611-1616.
- [14] Haller J, Bakos N, Szirmay M, Ledent C, Freund TF. The effects of genetic and pharmacological blockade of the CB1 cannabinoid receptor on anxiety. *Eur J Neurosci* 16 (2002) 1395-1398.
- [15] Hashimoto-dani Y, Ohno-Shosaku T, Kano M, Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. *Neuroscientist* 13 (2007) 127-137.
- [16] Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC. Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990) 1932-1936.
- [17] Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress.

- Neuropharmacol* 47 (2004) 345-358.
- [18] Javanbakht A, Liberzon I, Amirsadri A, Gjini K, Boutros NN. Event-related potential studies of post-traumatic stress disorder: a critical review and synthesis. *Biol Mood Anxiety Disord* 1 (2011) 5.
- [19] Jonsson KO, Holt S, Fowler CJ, The endocannabinoid system: current pharmacological research and therapeutic possibilities. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98 (2006) 124-134.
- [20] Kazemi H, Rahgozar M, Speckmann EJ, Gorji A. Effect of cannabinoid receptor activation on spreading depression. *Iran J Basic Med Sci* 15 (2012) 926-936.
- [21] Komada M, Takao K, Miyakawa T, Elevated plus maze for mice. *J Vis Exp* 22 (2008) 1088.
- [22] Lafenetre P, Chaouloff F, Marsicano G, The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. *Pharmacol Res* 56 (2007) 367-381.
- [23] Marco EM, Pérez-Alvarez L, Borcel E, Rubio M, Guaza C, Ambrosio E, File SE, Viveros MP. Involvement of 5-HT1A receptors in behavioural effects of the cannabinoid receptor agonist CP 55,940 in male rats. *Behav Pharmacol* 15 (2004) 21-27.
- [24] Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, Hermann H, Tang J, Hofmann C, Zieglgänsberger W, Di Marzo V, Lutz B. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature* 418 (2002) 530-534.
- [25] Mc Gregor IS, Issakidis CN, Prior G, Aversive effects of the synthetic cannabinoid CP 55, 940 in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 53 (1996) 657-664.
- [26] Montserrat-de la Paz S, Marín-Aguilar F, García-Giménez MD, Fernández-Arche MA, Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil: Analytical and Phytochemical Characterization of the Unsaponifiable Fraction. *J Agric Food Chem* 62 (2014) 1105-1110.
- [27] Pamplona FA, Bitencourt RM, Takahashi RN, Short- and long-term effects of cannabinoids on the extinction of contextual fear memory in rats. *Neurobiol Learn Mem* 90 (2008) 290-293.
- [28] Pamplona FA, Prediger RD, Pandolfo P, Takahashi RN, The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 facilitates the extinction of contextual fear memory and spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 188 (2006) 641-649.
- [29] Pamplona FA, Takahashi RN, WIN 55212-2 impairs contextual fear conditioning through the activation of CB1 cannabinoid receptors. *Neurosci Lett* 397 (2006) 88-92.
- [30] Patel S, Hillard CJ, Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 318 (2006) 304-311.
- [31] Pigott TA, Anxiety disorders in women. *Psychiatr Clin North Am* 26 (2003) 621-672.
- [32] Porter A, Trauma, post-traumatic stress disorder, and war. *Lancet* 352 (1998) 152.
- [33] Robson P, Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *Br J Psychiatry* 178 (2001) 107-115.
- [34] Rodriguez de Fonseca F, Del Arco I, Bermudez-Silva FJ, Bilbao A, Cippitelli A, Navarro M, The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol Alcohol* 40 (2005) 2-14.
- [35] Rubino T, Guidali C, Vigano D, Realini N, Valenti M, Massi P, Parolaro D, CB1 receptor stimulation in specific brain areas differently modulate anxiety-related behaviour. *Neuropharmacology* 54 (2008) 151-160.
- [36] Stein DJ, Ipser JC, Seedat S, Pharmacotherapy for post traumatic stress disorder (PTSD). *Cochrane Database Syst Rev* 1 (2006) CD002795.
- [37] Stretch RH, Marlowe DH, Wright KM, Bliese PD, Knudson KH, Hoover CH, Post-traumatic stress disorder symptoms among Gulf War veterans. *Mil Med* 161 (1996) 407-410.
- [38] Sullivan JM, Mechanisms of cannabinoid-receptor-mediated inhibition of synaptic transmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 82 (1999) 1286-1294.
- [39] Summerfield D, Hume F, Persistent post-traumatic stress disorder. May not need treatment in war veterans. *BMJ* 309 (1994) 873.
- [40] Svizenska I, Dubovy P, Sulcova A, Cannabinoid receptors 1 and 2 (CB1 and CB2), their distribution, ligands and functional involvement in nervous system structures--a short review. *Pharmacol Biochem Behav* 90 (2008) 501-511.
- [41] TambaroS, Bortolato M, Cannabinoid-related agents in the treatment of anxiety disorders: current knowledge and future perspectives. *Recent Pat CNS Drug Discov* 7

- (2012) 25-40.
- [42] Tzavara ET, Wade M, Nomikos GG, Biphasic effects of cannabinoids on acetylcholine release in the hippocampus: site and mechanism of action. *J Neurosci* 23 (2003) 9374-9384.
- [43] Uhl GR, Ishiguro H, Onaivi ES, Zhang PW, Akinshola BE, Lin Z, Hope B, Leonard CM, Liu QR, Molecular neurobiological methods in marijuana-cannabinoid research. *Methods Mol Med* 123 (2006) 1-17.
- [44] Wang T, Collet JP, Shapiro S, Ware MA. Adverse effects of medical cannabinoids: a systematic review. *CMAJ* 178 (2008) 1669-1678.
- [45] Yamamoto S, Morinobu S, Takei S, Fuchikami M, Matsuki A, Yamawaki S, Liberzon I, Single prolonged stress: toward an animal model of posttraumatic stress disorder. *Depress Anxiety* 26 (2009) 1110-1117.