



Interaction between cannabinoid receptors and inhibition of L-type calcium channel on passive avoidance learning and memory in male rats

Bahareh Bashir Gonbadi^{1,2}, Alireza Komaki^{2,3*}, Sima Nasri¹, Siamak Shahidi^{2,3}, Abdolrahman Sarihi^{2,3}

1. Dept. of Biology, Payamenoor University of Tehran, Tehran, Iran

2. Neurophysiology Research Center, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

3. Dept. of Physiology, School of Medicine, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran

Received: 9 June 2012

Accepted: 3 Sept 2012

Abstract

Introduction: There is currently a debate over the interaction between Ca²⁺ channels and cannabinoid system on learning and memory processing. In this study, we examined the effect of acute injection of cannabinoid agonist (Win-55212-2) (Win) or antagonist (AM251), following chronic injection of verapamil, as a L-type Ca²⁺ channels blocker, on passive avoidance (PA) test in male Wistar rats.

Methods: Male Wistar rats weighing 200-250 g were used. The animals were randomly divided into two main groups. Firstly, these two groups were treated with i.p injection of verapamil (25 mg/kg) or saline for 13 days (once daily). Before PA training, each group was divided into three subgroups, which received verapamil (or saline), Win (1 mg/kg) or AM251 (1 mg/kg). Then, PA training (acquisition test) was performed and retrieval test was done 24 h after the training.

Results: The results showed that Win as a cannabinoid receptor agonist and verapamil as an L-type Ca²⁺ channels blocker decreased the acquisition and retrieval of PA task, but AM251 as a cannabinoid antagonist improved PA task. Meanwhile, acute use of an antagonist, simultaneous with verapamil, prevent verapamil induced PA impairment effect.

Conclusion: The results of the present study indicate that acute injection of cannabinoid agonist and chronic injection of verapamil decrease memory in the PA task, whereas acute injection of cannabinoid antagonist has the opposite effect on memory. Furthermore, there is an interaction between functions of L-type Ca²⁺ channels and cannabinoid system on learning and memory.

Key words: CB1 receptor, Win-55212-2, AM251, Verapamil, Memory

* Corresponding author e-mail: alirezakomaki@gmail.com
Available online at: www.phypha.ir/ppj

تداخل بین گیرنده های کانابینوئیدی و مهارکننده کانال های کلسیمی نوع L در فرآیند یادگیری و حافظه احترازی موش صحرائی نر

بهاره بشیر گنبدی^{۱،۲}، علیرضا کمکی^{۲،۳*}، سیما نصری^۱، سیامک شهیدی^{۲،۳}، عبدالرحمن صریحی^{۲،۳}

۱. گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور استان تهران، تهران،

۲. مرکز تحقیقات نوروفیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان

۳. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان

پذیرش: ۱۳ شهریور ۹۱

دریافت: ۲۰ خرداد ۹۱

چکیده

مقدمه: در مورد تداخل کانال های کلسیمی و سیستم کانابینوئیدی در یادگیری و حافظه ابهامات زیادی وجود دارد. در این مطالعه ما اثر تجویز حاد آگونیست گیرنده های کانابینوئیدی (Win) (Win-55212-2) و آنتاگونیست آنها (AM251) که به دنبال تجویز مزمن وراپامیل (بلوکه کننده کانال کلسیمی نوع L) صورت گرفته است را بر تست یادگیری احترازی غیرفعال (PA) در راتهای نر نژاد ویستار مورد بررسی قرار دادیم.

روش ها: در این مطالعه از راتهای نر نژاد ویستار با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده گردید. ابتدا راتها به دو گروه کلی تقسیم شدند. یک گروه با وراپامیل (25 mg/kg) و گروه دیگر با سالین بعنوان حلال وراپامیل یک بار در روز (بصورت داخل صفاقی) به مدت ۱۳ روز تیمار شدند. در روز انجام آزمایش، هر یک از این دو گروه به سه زیر گروه تقسیم شده و قبل از انجام تست PA یک تزریق تک دوز از وراپامیل (و یا سالین)، AM251 (1 mg/kg) و یا Win (1 mg/kg) (بسته به گروه حیوان مورد آزمایش) دریافت می کردند. سپس تست یادگیری (Acquisition) انجام می شد. تست بخاطر آوری (Retrieval) ۲۴ ساعت بعد از یادگیری صورت می گرفت.

یافته ها: نتایج حاکی از آن است که مصرف Win به عنوان آگونیست کانابینوئیدی و وراپامیل به عنوان مهار کننده کانال های کلسیمی نوع L سبب کاهش حافظه در تست PA گردیده است، اما تزریق AM251 به عنوان آنتاگونیست کانابینوئیدی اثر عکس در تست PA نشان داده است. این تحقیق همچنین نشان داد که تجویز آنتاگونیست به دنبال تجویز مزمن وراپامیل از اثرات مهار وراپامیل در تست PA تا حدودی جلوگیری می نماید.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که تزریق حاد آگونیست و تزریق مزمن وراپامیل سبب تضعیف حافظه رات های سالم می گردد، در حالیکه تزریق حاد آنتاگونیست نتیجه عکس روی حافظه دارد. همچنین یک تداخل عمل بین کانال های کلسیمی نوع L و سیستم کانابینوئیدی در مورد یادگیری و حافظه وجود دارد.

واژه های کلیدی: گیرنده CB1، Win-55212-2، AM251، وراپامیل، حافظه

مقدمه

(Cannabis sativa) که شامل ماری جوانا و حشیش می شود، بعد از نیکوتین و الکل در رده بعدی قرار گرفته است [۷۱]. عمده ترین ماده روان گردان حشیش تتراهیدروکانابینول (Δ^9 -THC) است. ماری جوانا مخلوطی از برگ یا جوانه خشک شده گیاه ماده است، در حالی که حشیش به ترکیب حاصل از ترشح رزینی قهوه ای رنگ این گیاه گفته می شود که حاوی حدود ۲۰ درصد Δ^9 -THC می باشد [۴۶]. علت مصرف این

بر اساس گزارش اداره مبارزه با مواد مخدر و جرائم سازمان ملل (UNODC) مصرف مشتقات حاصل از گیاه شاهدانه

alirezakomaki@gmail.com

www.phypha.ir/ppj

* نویسنده مسئول مکاتبات:

وبگاه مجله:

باعث اختلال در تثبیت حافظه در یادگیری احترازی شده است [۱۴].

بر اساس یکسری از مطالعات گزارش گردیده است که مسدود کننده های کانالهای کلسیمی اثر تخریبی و یا اختلالی در ایجاد و بقای یادگیری و حافظه دارند [۳۴، ۴۷]. از طرف دیگر بعضی از محققین بیان نمودند که مسدود کننده های کانالهای کلسیمی تأثیری بر یادگیری و بخاطرآوری حافظه ندارند [۱۰، ۳۰]. مشخص گردیده است که تغییر غلظت کلسیم درون سلولی در القای اشکال مختلف شکل پذیری سیناپسی مانند تقویت طولانی مدت (LTP) و تضعیف طولانی مدت (LTD) نقش برجسته ای دارد [۵، ۴۲]. همچنین اطلاعات ضد و نقیضی در مورد بلوک کانالهای کلسیمی نوع L و تأثیر آن بر حافظه و یادگیری وجود دارد [۳۴، ۴۵]. این تناقض در مورد عملکرد ترکیبات دی هیدروپیریدینی نیز بر حافظه و یادگیری دیده می شود. آنتاگونیستهای کانالهای کلسیمی می توانند باعث بهبود و افزایش اکتساب و عملکرد حافظه شده و یا باعث مختل و ضعیف شدن حافظه و یادگیری گردند [۷، ۳۷، ۳۸، ۴۵، ۴۷، ۵۰، ۶۰، ۶۶]. مطالعات زیادی نشان دادند که بلوکرهای کانالهای کلسیمی باعث تقویت جنبه های مختلف حافظه و یادگیری هم در انسان و هم در حیوانات شده اند [۷، ۳۸، ۵۰، ۶۰، ۶۶]. برعکس بر اساس گزارش های دیگری بلوکرهای کانالهای کلسیمی نوع L باعث اختلال در حافظه و یادگیری شده اند [۳۴، ۳۷، ۴۷]. در همین راستا مطالعات رفتاری و الکتروفیزیولوژی توسط لشگری و همکاران [۳۴] بیانگر آن است که تجویز مزمن وراپامیل باعث کاهش حافظه و القای LTP می شود. این یافته های متناقض باعث نوعی سردرگمی در نقش کانالهای کلسیمی نوع L در مراحل مختلف یادگیری و حافظه می گردد [۴۵].

اندوکانابینوئیدها از نورونهای پس سیناپسی آزاد شده و به صورت رتروگراد باعث فعال شدن گیرنده های CB1 در نورونهای پیش سیناپسی شده و بدنبال آن باعث کاهش ورود کلسیم و مهار آزادسازی نوروترانسمیترها از این نورونها می شوند [۱۹، ۲۸]. اگرچه مطالعه دیگری نشان داده است که Win-55212-2 (Win) به عنوان آگونیست گیرنده های CB1 باعث افزایش کلسیم درون سلولی گردیده است [۳۵]. علاوه بر کانالهای کلسیمی نوع N و P/Q که تحت تأثیر

ترکیبات آرامش و رهایی از ترس، سرخوشی و کاهش استرس ذکر گردیده است [۵۳، ۶۲]. مصرف طولانی مدت حشیش باعث بروز عوارض جسمی و روانی شدید مانند ناهنجاری در جنین، آتروفی مغز، اختلال در پردازش اطلاعات، افسردگی، تحلیل نیروی کار در اجتماع، اختلال در حافظه، پارانوئیا، تبلی و بی حرکتی و فقدان انگیزه کاری می گردد [۱۷، ۲۱]. اثرات این ترکیبات از طریق اتصال به دو نوع گیرنده کانابینوئیدی یعنی CB1 و CB2 ظاهر می گردد [۱۸، ۳۱، ۳۶، ۴۱، ۶۲]. اخیراً گیرنده جدیدی (GPR55) برای ترکیبات کانابینوئیدی علاوه بر CB1 و CB2 شناسایی گردیده است [۳۶]. در مقایسه با سایر داروهای مضر و سمی، مکانیسم اثر این ترکیبات که در مغز عمدتاً به وسیله گیرنده های CB1 اعمال می شود کمتر شناخته شده است [۵۳].

مطالعات مختلف نشان دهنده دخالت سیستمهای مختلف نوروترانسمیتری در حافظه و یادگیری هستند [۴۲، ۶۲]. علارغم مطالعات زیادی که در مورد تأثیر سیستم کانابینوئیدی بر حافظه و یادگیری صورت گرفته است، نتایج متناقضی در این ارتباط وجود دارد [۴]. وجود گیرنده های CB1 و دو نوع کانابینوئید آندوژن یعنی آندامید و 2-AG و مشتقات متابولیک آنها در هیپوکامپ بیانگر ایفای نقش سیستم نوروشیمیایی کانابینوئیدی در فرآیندهای حافظه و یادگیری می باشد [۲۶]. همچنین تحقیقات اخیر نشان می دهد که سیستم کانابینوئیدی مؤلفه های اصلی یادگیری و حافظه که شامل تثبیت و بخاطرآوری است را تحت تأثیر قرار می دهد [۶۲]. در سطح مولکولی، اندوکانابینوئیدها در تنظیم الکتروفیزیولوژیکی مرتبط با یادگیری و شکل پذیری سیناپسی نقش مهمی دارند [۱۱، ۳۱]. مطالعات نشان می دهند که رسپتور CB1 کانابینوئیدی نقش مهمی را در شکل پذیری سیناپسی طولانی مدت هیپوکامپ ایفا می کند [۱۱، ۱۸، ۳۱، ۴۱، ۴۲]. ماری جوانا و ترکیب اصلی آن Δ^9 -THC از سالها قبل به عنوان مختل کننده جنبه های مختلف حافظه شناخته شده است [۵۱، ۶۲]. در این راستا تجویز آگونیستهای سنتتیک کانابینوئیدها نیز باعث اختلال حافظه در مدل های مختلف حافظه در جوندگان گردیده است [۲۷]. از طرف دیگر تجویز Post-training ترکیب آندامید اثر تسهیل کنندگی بر حافظه نشان داده است [۱۶]. همچنین، AM251 به عنوان آنتاگونیست گیرنده های CB1

مرحله دوم: ۳۰ دقیقه بعد موش صحرایی را در قسمت روشن جعبه گذاشته و ۲ دقیقه به حیوان مهلت داده می‌شد تا وارد محفظه تاریک شود، به محض ورود به محفظه تاریک درب آن را بسته و شوک یک میلی آمپر به مدت ۱/۵ ثانیه با فرکانس ۵۰ هرتز به حیوان داده می‌شد. سپس موش صحرایی از محفظه تاریک خارج گشته و به قفس بر گردانده می‌شد [۳۴، ۵۵، ۵۷، ۶۳].

مرحله سوم: این مرحله بلافاصله دو دقیقه بعد از مرحله دوم انجام می‌گرفت. موش صحرایی در قسمت روشن دستگاه قرار داده شده و درب بین دو قسمت تاریک و روشن بالا کشیده می‌شد تا تست یادگیری (Acquisition) انجام شود. به اینصورت که اگر در مدت ۲ دقیقه موش صحرایی وارد محفظه تاریک نمی‌شد به این مفهوم بود که یادگیری صورت گرفته، اما اگر وارد محفظه تاریک می‌شد، باید مرحله شوک را به همین صورت قبل تکرار می‌کردیم و با فاصله زمانی ۲ دقیقه‌ای این کار آنقدر تکرار می‌شد تا موش صحرایی یاد بگیرد وارد محفظه تاریک نشود.

مرحله چهارم (Retrieval): در این مرحله که ۲۴ ساعت بعد انجام می‌گرفت، موش را در محفظه روشن قرار داده و رفتار حافظه او را به مدت ۱۰ دقیقه بررسی می‌کردیم [۳۴، ۴۸، ۶۱]. گروه‌های آزمایشی شامل:

۱- گروه شاهد: این گروه هم حجم تزریقات تزریقی به گروه‌های دیگر، به مدت ۱۳ روز متوالی و به شکل تزریق مزمن داخل صفاقی سالین دریافت می‌کردند. در روز انجام نیز سالین تزریق شده، و با مکث زمانی حدود ۳۰ دقیقه آزمایش روی آنها انجام می‌گردید.

۲- گروه وراپامیل: در این گروه وراپامیل (25 mg/kg) به مدت ۱۳ روز متوالی و به شکل تزریق مزمن داخل صفاقی تزریق می‌گردید و یک روز بعد از آخرین تزریق مراحل آزمایش شروع می‌شد.

۳- گروه آگونیسست گیرنده CB1 کانابینوئیدی: این گروه به مدت ۱۳ روز متوالی و به شکل تزریق مزمن داخل صفاقی سالین دریافت می‌کردند. در روز انجام آزمایش، این گروه آگونیسست (Win) (1 mg/kg) را به صورت تزریق حاد داخل صفاقی و نیم ساعت قبل از انجام آزمایش دریافت می‌کردند [۲، ۳، ۴۸، ۴۹].

کانابینوئیدها قرار می‌گیرند [۸، ۲۲، ۲۹، ۳۵، ۴۳، ۴۴، ۵۹، ۶۸]. کانالهای کلسیمی نوع L نیز تحت تأثیر این ترکیبات واقع می‌شوند [۱۳، ۲۰، ۲۸، ۲۹، ۳۵، ۵۹، ۶۴].

گزارش گردیده است که ورود کلسیم از طریق کانالهای کلسیمی نوع L منجر به افزایش سنتز کانابینوئیدها می‌گردد [۲۳]. همچنین بدنبال سؤال در مورد اینکه آیا بلوک کانالهای کلسیمی نوع L می‌تواند فعالیت ترکیبات کانابینوئیدی داخلی و خارجی را تحت تأثیر قرار دهد، مشخص گردیده است که قسمتی از اثرات ضد تشنجی کانابینوئیدها از طریق کانالهای کلسیمی نوع L وساطت می‌شود [۵۶]. با توجه به اینکه سیستم کانابینوئیدی و کانالهای کلسیمی بر روی حافظه و یادگیری موثر هستند، و همچنین با توجه به اینکه ممکن است قسمتی از مکانیسم اثر کانابینوئیدها بر دو فرآیند فوق، با وساطت کانالهای کلسیمی صورت گرفته باشد، با این حال خیلی از پاسخ‌های متناقض قابل توجیه نمی‌باشد. در تحقیق حاضر تداخل بین سیستم کانابینوئیدی و کانالهای کلسیمی نوع L بر روی حافظه و یادگیری مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیقات قبلی این موضوع مورد مطالعه قرار نگرفته است. با نتایج حاصل از این تحقیق سعی شده است تا حدودی به ابهامات موجود در ارتباط با تأثیر این سیستم بر حافظه و یادگیری و نقش احتمالی کانالهای کلسیمی نوع L در ایجاد نتایج ضد و نقیض پاسخ داده شود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در چهار مرحله انجام گرفت:

مرحله اول (Habituation): در این مرحله موش‌های هر گروه یکی یکی با فاصله زمانی حدود ۸ دقیقه ابتدا درون Shuttle box احترازی غیر فعال قرار داده شد، بعد از ۵ ثانیه درب بین دو محفظه را برداشته و به مدت دو دقیقه به موش‌ها اجازه داده شد آزادانه در دو محفظه تاریک و روشن رفت و آمد کنند، که معمولاً در این مرحله موش صحرایی به طور طبیعی تمایل دارد بلافاصله وارد محفظه تاریک شود. در این فاصله زمانی اگر موشی تمایل به ورود به ناحیه تاریک نداشت و تمامی زمان را در ناحیه روشن سپری می‌کرد از مطالعه حذف می‌گردید.

طرفه و Post-hoc متناسب داده ها (Tukey) استفاده شد. داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار میانگین برای هر گروه در نظر گرفته می شود. در تمامی مراحل $P < 0.05$ به عنوان سطح معنی دار بودن در نظر گرفته شد.

یافته ها

مقایسه گروهها در تأخیر ورود به بخش تاریک در آزمون بخاطر آوری نشان داد موشهای گروه وراپامیل ($P < 0.01$)، گروه Win ($P < 0.01$)، گروه Win + وراپامیل ($P < 0.001$)، گروه AM251 + وراپامیل ($P < 0.05$) و همچنین وراپامیل + وراپامیل ($P < 0.001$) در مقایسه با گروه سالین با تأخیر کمتری وارد قسمت تاریک شدند، در حالیکه موشهای گروه AM251 با تأخیر بیشتری وارد قسمت تاریک شدند ($P < 0.05$). همچنین موشهای گروه وراپامیل + AM251 در مقایسه با گروه AM251 با تأخیر کمتری ($P < 0.05$) و در مقایسه با گروه وراپامیل + وراپامیل با تأخیر بیشتری وارد قسمت تاریک شدند ($P < 0.01$) (شکل ۱).

مقایسه زمان سپری شده در قسمت تاریک دستگاه برای تمامی گروهها در روز آزمون بخاطر آوری نیز اختلاف معنی داری را بین گروههای مختلف نشان داد. در بین گروههای مختلف دریافت کننده وراپامیل، Win، AM251، وراپامیل + Win، وراپامیل + AM251، وراپامیل + وراپامیل و گروه

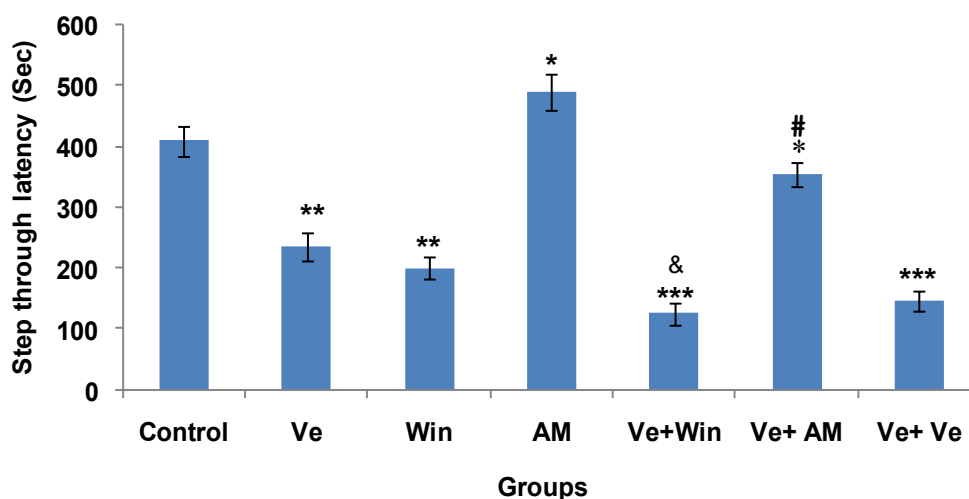
۴- گروه آنتاگونیست گیرنده CB1 کانابینوئیدی: این گروه به مدت ۱۳ روز متوالی و به شکل تزریق مزمن داخل صفاقی سالین دریافت می کردند. در روز انجام آزمایش، این گروه آنتاگونیست (AM251) (1mg/kg) را به صورت تزریق حاد داخل صفاقی و نیم ساعت قبل از انجام آزمایش دریافت می کردند.

۵- گروه مهار کننده کانال کلسیمی + آگونیست گیرنده CB1 کانابینوئیدی حاد: آگونیست گیرنده CB1 کانابینوئیدی بصورت حاد، یک روز بعد از آخرین تزریق مزمن ۱۳ روزه مهار کننده کانال کلسیمی، تزریق می گردید.

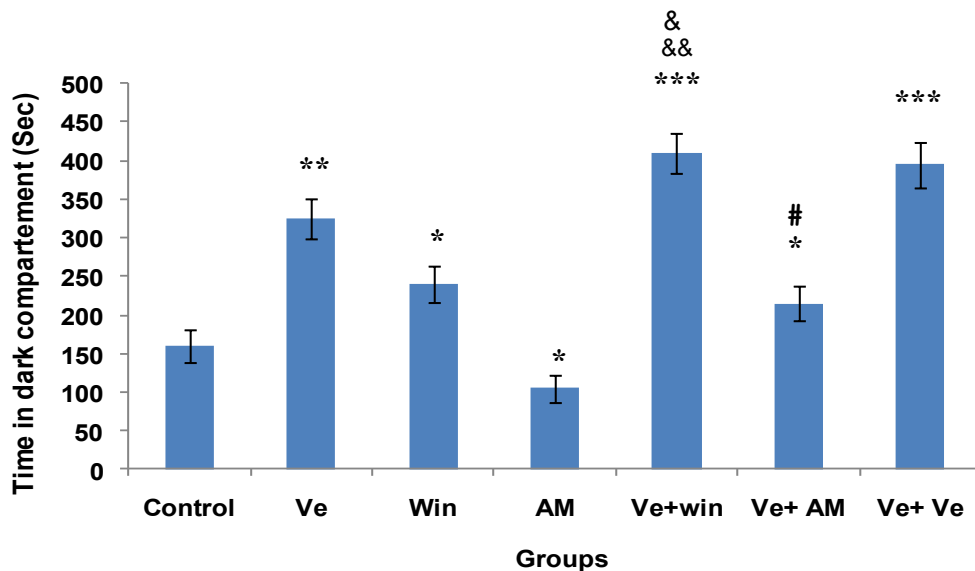
۶- گروه مهار کننده کانال کلسیمی + آنتاگونیست گیرنده CB1 کانابینوئیدی حاد: آنتاگونیست گیرنده CB1 کانابینوئیدی بصورت حاد، علاوه بر مهار کننده کانال کلسیم که بصورت تزریق مزمن داخل صفاقی تجویز گردیده است، نیم ساعت قبل از انجام آزمایش تزریق می گردید.

۷- گروه مهار کننده کانالهای کلسیمی + مهار کننده کانالهای کلسیمی: مهار کننده کانالهای کلسیمی را بصورت حاد تک دوزی علاوه بر تزریق مزمن داخل صفاقی مهار کننده کانال کلسیم و نیم ساعت قبل از انجام آزمایش دریافت می کردند.

تجزیه و تحلیل آماری: در این تحقیق، برای بررسی وجود تفاوت معنی دار بین گروهها از آنجا که داده ها بصورت نرمال توزیع شده بود، از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) یک



شکل ۱- تاثیر وراپامیل، Win، AM251، وراپامیل + Win، وراپامیل + AM251، وراپامیل + وراپامیل در مقایسه با سالین بر تأخیر ورود به بخش تاریک در آزمون بخاطر آوری. داده ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار میانگین نشان داده شده است. $P < 0.05$ * و $P < 0.01$ ** و $P < 0.001$ *** در مقایسه با گروه کنترل، $P < 0.05$ # در مقایسه با گروه وراپامیل و AM251، $P < 0.05$ & در مقایسه با گروه وراپامیل و Win



شکل ۲- تأثیر وراپامیل، Win، AM251، وراپامیل + Win، وراپامیل + AM251، وراپامیل + وراپامیل در مقایسه با سالین بر زمان سپری شده در قسمت تاریک دستگاه در آزمون بخاطرآوری. داده‌ها بصورت میانگین \pm انحراف معیار میانگین نشان داده شده است. $*=P<0.05$ و $**=P<0.01$ و $***=P<0.001$ در مقایسه با گروه کنترل، $\# = P<0.05$ در مقایسه با گروه وراپامیل و AM251، $\& = P<0.05$ در مقایسه با گروه وراپامیل و $\&\& = P<0.01$ در مقایسه با گروه Win

این ترکیبات بر حافظه و یادگیری مورد مطالعه قرار نگرفته است. این یافته بیانگر وجود نوعی تداخل در عملکرد سیستم کانابینوئیدی و کانالهای کلسیمی نوع L می‌باشد.

در تأیید یافته‌های این تحقیق مشخص شده است که آنتاگونیستهای کانابینوئیدی باعث تقویت حافظه می‌گردند [۶۲]. همچنین در مطالعات اخیر نشان داده شده که سیستم کانابینوئید آندوژن نقش مهمی در حافظه احترازی غیر فعال بازی می‌کند [۶۲، ۶]. از طرف دیگر در حافظه‌های مختلف سیستم کانابینوئیدی ممکن است اثرات متفاوتی نشان دهد [۴]. مشخص شده است که $\Delta^9\text{-THC}$ باعث اختلال در حافظه انسان و حیوانات آزمایشگاهی گردیده است [۹، ۱۲، ۵۲]. این ترکیب باعث مختل شدن حافظه کاری و فضایی می‌شود [۳۹]. در همین راستا مطالعات اخیر نشان داده است که انواع مختلف حافظه بدنبال استفاده از Win به طور انتخابی مختل می‌گردند [۱، ۲۴، ۳۲]. Win در تزریق قبل و بعد از Train اثر متضاد نشان داده است. در حالیکه تجویز Pre-test این ترکیب باعث افزایش به بخاطرآوری شده است، تجویز Post-training آن به صورت وابسته به دوز باعث تضعیف حافظه گردیده است [۵۸]. از طرف دیگر تجویز Post-training ترکیب آناندامید به عنوان یک کانابینوئید آندوژن اثر تسهیل‌کنندگی بر حافظه نشان داده است [۱۶]. همچنین، AM251 به عنوان آنتاگونیست گیرنده-های CBI باعث اختلال در تثبیت حافظه در یادگیری احترازی

سالین، در روز آزمون بخاطرآوری، به غیر از گروه AM251 تمامی گروهها در مقایسه با گروه سالین مدت زمان بیشتری را در قسمت تاریک دستگاه سپری کردند. گروههای وراپامیل + Win و وراپامیل + وراپامیل در مقایسه با گروه Win ($P<0.01$) و همچنین گروه وراپامیل تنها ($P<0.05$) زمان بیشتری را در بخش تاریک دستگاه سپری کردند. همچنین گروه وراپامیل + AM251 در مقایسه با گروه AM251 زمان بیشتری و در مقایسه با گروه وراپامیل + وراپامیل زمان کمتری را در بخش تاریک دستگاه سپری کرده است ($P<0.05$) (شکل ۲).

بحث

بطور کلی نتایج حاکی از آن است که مصرف Win به عنوان آگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی سبب کاهش حافظه شده است، در حالیکه تزریق AM251 به عنوان آنتاگونیست این گیرنده‌ها حافظه را افزایش داده است. همچنین وراپامیل به عنوان بلوکه‌کننده کانالهای کلسیمی نوع L نیز باعث کاهش حافظه و یادگیری گردیده است. این تحقیق همچنین نشان داد که تجویز آنتاگونیست بدنبال تجویز مزمن وراپامیل از اثرات مهارتی بلوکر کانالهای کلسیمی نوع L بر حافظه و یادگیری تا حدودی جلوگیری می‌نماید. در تحقیقات قبلی اثر تجویز توأم

شده است [۱۴].

بر اساس گزارشات دیگری ناکوت گیرنده های CB₁ و یا استفاده از آنتاگونیستهای سیستم کانابینوئیدی تأثیر مثبت بر یادگیری نشان داده‌اند [۶۹]. تفاوت ایجاد شده در پاسخ کانابینوئیدها بر حافظه و یادگیری شاید مربوط به زمان تزریق، محل و دوز تزریق باشد [۴، ۱۵]. SR141716 که آنتاگونیست گیرنده های CB₁ می‌باشد، وقتی که قبل و یا بلافاصله بعد از Training بکار برده شده (دوز 1 mg/kg) باعث بهبود حافظه گردیده است، در حالیکه وقتی قبل از تست به بخاطر آوری مورد استفاده قرار گرفته است چنین اثری را نشان نداده است. همچنین دوزهای پایین (0.5 mg/kg) و بالای (2 mg/kg) این ترکیب این اثر را نشان نداده است. میزان دوز و زمان تجویز نقش مهمی در تأثیر این ترکیب ایفا می‌کند [۶۷].

با توجه به تراکم بالای گیرنده های کانابینوئیدی در نواحی از مغز مانند کورتکس، هیپوکامپ، آمیگدال، عقده های قاعده ای، مخچه و نقش این نواحی در حافظه و یادگیری، می‌توان گفت که کانابینوئیدها می‌توانند روی عملکردهای ادراکی موثر واقع شوند [۶۵، ۶۶، ۷۰]. شواهد متعدد بیانگر این است که هیپوکامپ، بیشترین ناحیه درگیر در یادگیری، نقش اصلی را در میانجیگری هم اثرات کانابینوئیدهای اگزوژن و هم اثرات اندوکانابینوئیدها روی حافظه بر عهده دارد [۲۶، ۷۰].

مقبول‌ترین فرضیه بیولوژیک در مورد حافظه، ذخیره شدن آن بواسطه تقویت ارتباطات بین نورونی است که اولین بار توسط Ramon Cajal در ۱۹۱۱ مطرح و سپس در سال ۱۹۴۹ توسط Hebb رسماً ارائه گشت [۲۵]. تغییرات در کارائی انتقال سیناپسی (پلاستیسیته سیناپسی)، که بعنوان عامل ایجاد حافظه در نظر گرفته شده است شامل LTP و LTD می‌باشد [۴۱، ۴۲]. مکانیسم دقیق تأثیر کانابینوئیدها بر حافظه و یادگیری مشخص نشده است. با این حال، مطالعات اولیه تأثیر کانابینوئیدها روی انعطاف پذیری سیناپسی، نشان داد که آگونیست های CB₁ سبب از هم گسیختگی LTP می‌شود، این پدیده اولین بار در هیپوکامپ مشاهده شد [۶۲، ۷۰]. یک مکانیسم مقبول ارائه شده برای از هم گسیختگی LTP القا شده توسط کانابینوئیدها این است که گیرنده های پیش سیناپسی CB₁ آزادسازی گلوتامات لازم برای دپلاریزاسیون

نورون پس سیناپسی و آزادسازی گیرنده های NMDA از بلوک منیزیم تحت شرایط نرمال را مهار می‌کند [۴۰، ۷۰]. باز شدن گیرنده های NMDA و به دنبال آن جریان کلسیم سیستم پیامبر ثانویه وابسته به کلسیم را فعال می‌کند، که این تغییر به نوبه خود القاء LTP را آغاز می‌کند [۶۲، ۷۰].

در تایید اثر مهارى وراپامیل بر حافظه و یادگیری که در تحقیق حاضر مشاهده گردید، لشگری و همکاران [۳۳، ۳۴]. اثر تجویز طولانی مدت وراپامیل بر LTP و کارایی مهار راجعه را بررسی کرده و نشان دادند که کانال‌های کلسیمی نوع L در پلاستیسیته نورونهای ناحیه DG حائز اهمیت بوده و احتمالاً در اعمال هیپوکامپ مثل یادگیری و حافظه نقش دارند. در مطالعه دیگری لی و همکارانش هم اثر مرکزی وراپامیل و نیفیدپین را در شکنج دندان‌ه ای هیپوکامپ بر روی Retention حافظه مورد بررسی قرار داده و بیان نمودند که وراپامیل و نیفیدپین در دوز متوسط اثر کاهشی داشته در حالیکه دوز بالا و پایین تأثیری را نشان ندادند [۳۷]. همچنین Morgan و Teyler در سال ۱۹۹۰ در تحقیقی که در شرایط *in vivo* با داروی نیفیدپین انجام شده است اثر سیستمیک وراپامیل (۱۰ mg/kg) و نقش LTP کانالهای کلسیمی وابسته به ولتاژ را بر حافظه کاری و رفرانس به روش ماز هشت پر مورد بررسی قرار داده و بیان نموده وراپامیل باعث افزایش خطا در حافظه کاری و رفرانس شده است [۵۴].

نتایج این مطالعه نشان داد که بلوکر کانالهای کلسیمی نوع L باعث تضعیف اثرات تحریکی آنتاگونیست گیرنده های کانابینوئیدی بر حافظه و یادگیری می‌گردد. این نتایج بیانگر این است که یک مکانیسم عصبی وابسته به کلسیم در ایجاد اثرات کانابینوئیدها بر حافظه و یادگیری نقش دارد. نتایج این تحقیق می‌تواند کمک زیادی به درک متقابل تأثیر کانابینوئیدها و بلوکرهای کانالهای کلسیمی نوع L بر سیستم عصبی نموده و همچنین می‌تواند به روشن شدن مکانیسم اثر این ترکیبات کمک نماید. نتایج این تحقیق علاوه بر کمک به شناخت مکانیسم اثر کانابینوئیدها و بلوکرهای کانالهای کلسیمی در فرآیندهای حافظه و یادگیری، می‌تواند در درمان اعتیاد به کانابینوئیدها نیز نقش داشته باشد.

سیاسگزاری

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی همدان که در انجام این تحقیق همکاری فراوانی نموده‌اند، کمال تشکر را دارند.

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان که حمایت مالی این پروژه را بر عهده داشتند قدردانی می‌گردد.

Reference

- [1] Abush H, Akirav I, Cannabinoids modulate hippocampal memory and plasticity. *Hippocampus* 20 (2010) 1126-38.
- [2] Adám AS, Wenger T, Csillag A, The cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant dose-dependently inhibits memory recall in the passive avoidance task in domestic chicks (*Gallus domesticus*). *Brain Res Bull* 76 (2008) 272-4.
- [3] Akirav I, The role of cannabinoids in modulating emotional and non-emotional memory processes in the hippocampus. *Front Behav Neurosci* 34 (2011) 1-11.
- [4] Arenos JD, Musty RE, Bucci DJ, Blockade of cannabinoid CB1 receptors alters contextual learning and Memory. *E J Pharmacol* 539 (2006) 177-183.
- [5] Ascher P, Nowak L, The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurons in culture. *J Physiol (Lond)* 339 (1988) 247-266.
- [6] Auclair N, Otani S, Soubrie P, Crepel F, Cannabinoids modulate synaptic strength and plasticity at glutamatergic synapses of rat prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 83 (2000) 3287-93.
- [7] Batuecas A, Pereira R, Centeno C, Pulido JA, Hernández M, Bollati A, Effects of chronic nimodipine on working memory of old rats in relation to defects in synaptosomal calcium homeostasis. *Eur J Pharmacol* 350 (1998) 141-150.
- [8] Bonhaus DW, Chang LK, Kwan J, Martin GR, Dual activation and inhibition of adenylyl cyclase by cannabinoid receptor agonists: evidence for agonist-specific trafficking of intracellular responses. *J Pharmacol Exp Ther* 287 (1998) 884-888.
- [9] Carlini EA, Hamaoui A, Bieniek D, Korte F, Effects of (-) delta-9-trans-tetrahydrocannabinol and a synthetic derivative on maze performance of rats. *Pharmacology* 4 (1970) 359-368.
- [10] Clements MP, Rose SP, Tiunova A, Omega-Conotoxin GVIA disrupts memory formation in the day-old chick. *Neurobiol Learn Mem* 64 (1995) 276-84.
- [11] Davies SN, Pertwee RG, Riedel, Function of cannabinoid receptor in the hippocampus. *Neuropharmacology* 42 (2002) 993-1007.
- [12] Da Silva GE, Takahashi RN, SR 141716A prevents delta-9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris water maze in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 26 (2002) 321-325.
- [13] Demuth DG, Molleman A, Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78 (2006) 549-563.
- [14] De Oliveira Alvares L, De Oliveira LF, Camboim C, Diehl F, Genro BP, Lanziotti VB, Quillfeldt JA, Amnestic effect of intrahippocampal AM251, a CB1-selective blocker, in the inhibitory avoidance, but not in the open field habituation task, in rats. *Neurobiol Learn Mem* 83 (2005) 119-124.
- [15] De Oliveira Alvares L, Genro BP, Vaz Breda R, Pedrosa MF, Da Costa JC, Quillfeldt JA, AM251, a selective antagonist of the CB1 receptor, inhibits the induction of long-term potentiation and induces retrograde amnesia in rats. *Brain Res* 1075(2006) 60-7.
- [16] De Oliveira Alvares L, Pasqualini Genro B, Diehl F, Quillfeldt JA. Differential role of the hippocampal endocannabinoid system in the memory consolidation and retrieval mechanisms. *Neurobiol Learn Mem* 90 (2008) 1-9.
- [17] Fergusson DM, Horwood LJ, Beautrais AL. Cannabis and educational achievement. *Addiction* 98 (2003) 1681-92.
- [18] Freund TF, Katona I, Piomelli D, Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiol Rev* 83 (2003) 1017-66.
- [19] Frider E, Endocannabinoids in the central nervous system: from neuronal networks to behavior. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 4 (2005) 633-42.
- [20] Gebremedhin D, Lange AR, Campbell WB, Hillard CJ, Harder DR, Cannabinoid CB1 receptor of cat cerebral

- arterial muscle functions to inhibit L-type Ca²⁺ channel current. *Am J Physiol* 276 (1999), H2085-H2093.
- [21] Glass M, The role of cannabinoids in neurodegenerative disease. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry* 25 (2001) 743-765.
- [22] Guo J, Ikeda SR, Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 65 (2004) 665-74.
- [23] Haj-Dahmane S, Shen RY, Regulation of plasticity of glutamate synapses by endocannabinoids and the cyclic-AMP/protein kinase A pathway in midbrain dopamine neurons. *J Physiol* 588 (2010) 2589-2604.
- [24] Hampson RE, Miller F, Palchik G, Deadwyler SA, Cannabinoid Receptor Activation Modifies NMDA Receptor Mediated Release of Intracellular Calcium: Implications for Endocannabinoid Control of Hippocampal Neural Plasticity. *Neuropharmacology* 60 (2011) 944-952.
- [25] Hebb DO, editor. *The organization of behavior*. New York: John Wiley and Sons, 1949.
- [26] Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, De Costa BR, Rice KC, Characterization and localization of cannabinoid receptors in the brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11 (1991) 563-583.
- [27] Heyser CJ, Hampson RE, Deadwyler SA, Effects of delta-9-tetrahydrocannabinol on delayed match to sample performance in rats: alterations in short-term memory associated with changes in task specific firing of hippocampal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 264 (1993) 294-307.
- [28] Howlett AC, Cannabinoid receptor signaling. *Handb Exp Pharmacol* 168 (2005) 53-79.
- [29] Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas P, Devane WA, Felder CC, Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG, International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol Rev* 54 (2002) 161-202.
- [30] Isaacson RL, Maier DL, Mandel AH, Post-training or pretest administration of nimodipine fails to affect retention of a simple learned association. *Physiol Behav* 46 (1989) 191-3.
- [31] Kano M, Ohno- Shosaku T, Hashimoto-dani Y, Uchigashima M, Watanabe M, Endocannabinoid-Mediated Control of Synaptic Transmission. *Physiol Rev* 89 (2009) 309-380.
- [32] Kim J, Alger BE, Reduction in endocannabinoid tone is a homeostatic mechanism for specific inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 13 (2010) 592-600.
- [33] Lashgari R, Motamedi F, Noorbakhsh SM, Zahedi-Asl S, Komaki A, Shahidi S, Haghparast A, Assessing the long-term role of L-type voltage dependent calcium channel blocker verapamil on short-term presynaptic plasticity at dentate gyrus of hippocampus. *Neurosci Lett* 415 (2007) 174-8.
- [34] Lashgari R, Motamedi F, Zahedi Asl S, Shahidi S, Komaki A, Behavioral and Electrophysiological studies of chronic oral administration of L-type calcium channel blocker verapamil on learning and memory in rats. *Behav Brain Res* 171 (2006) 324-8.
- [35] Lauckner JE, Hille B, Mackie K, The cannabinoid agonist WIN55,212-2 increases intracellular calcium via CB1 receptor coupling to Gq/11 G proteins. *PNAS* 102 (2005) 19144-9.
- [36] Lauckner JE, Jensen JB, Chen HY, Lu HC, Hille B, Mackie K, GPR55 is a cannabinoid receptor that increases intracellular calcium and inhibits M current. *PNAS* 105 (2008) 2699-2704.
- [37] Lee EHY, Lin WR, Nifedipine and verapamil block the memory-facilitating effect of corticotropin-releasing factor in rats. *Life Sci* 48 (1991) 1333-40.
- [38] Levy A, Kong RM, Stillman MJ, Shukitt-Hale B, Kadar T, Rauch TM, Nimodipine improves spatial working memory and elevates hippocampal acetylcholine in young rats. *Pharmacol Biochem Behav* 139 (1991) 781-86.
- [39] Lichtman AH, Martin BR, Delta 9-tetrahydrocannabinol impairs spatial memory through a cannabinoid receptor mechanism. *Psychopharmacology (Berl)* 126 (1996) 125-131.
- [40] Liu Q, Bhat M, Bowen WD, Cheng J, Signaling Pathways from Cannabinoid Receptor-1 Activation to Inhibition of N-Methyl-D-Aspartic Acid Mediated Calcium Influx. and Neurotoxicity in Dorsal Root Ganglion Neurons. *J Pharmacol Expe Therape* 331 (2009) 1062-1070.
- [41] Lovinger DM, Presynaptic modulation by endocannabinoids. *Handb Exp Pharmacol* 184 (2008)

- 435-477.
- [42] Lynch MA, Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84 (2004) 87-136.
- [43] Mackie K, Hille B, Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (1992) 3825-3829.
- [44] Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R, Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15 (1995) 6552-6561.
- [45] Martin LJ, Fournier NM, Galic MA, Emond MH, Chronic administration of the L-type calcium channel blocker nimodipine can facilitate the acquisition of sequence learning in a radial-arm maze. *Behav Pharmacol* 15 (2004) 133-139.
- [46] Mathias R, Student's use of Marijuana, other illicit drugs and cigarettes continued to rise in 1995. *NIDA Notes* 11 (1996) 8-9.
- [47] Maurice T, Bayle J, Privat A, Learning impairment following acute administration of the calcium channel antagonist nimodipine in mice. *Behav Pharmacol* 6 (1995) 167-175.
- [48] Mazzola C, Medalie J, Scherma M, Panlilio LV, Solinas M, Tanda G, Drago F, Cadet JL, Goldberg SR, Yasar S, Fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibition enhances memory acquisition through activation of PPAR- α nuclear receptors. *Learn Mem* 16 (2009) 332-337.
- [49] Mazzola C, Micale V, Drago F, Amnesia induced by beta-amyloid fragments is counteracted by cannabinoid CB1 receptor blockade. *Eur J Pharmacol* 477 (2003) 219-25.
- [50] McMonagle-Strucko K, Fanelli RJ (1993). Enhanced acquisition of reversal training and spatial learning task in rats treated with chronic nimodipine. *Pharmacol Biochem Behav* 44:827-835.
- [51] Mendizábal VE, Adler-Graschinsky E, Cannabinoid system as a potential target for drug development in the treatment of cardiovascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 3 (2003) 301-13.
- [52] Miller L, Cornett T, Brightwell D, McFarland D, Drew WG, Wikler A, Marijuana and memory impairment: the effect of retrieval cues on free recall. *Pharmacol Biochem Behav* 5 (1976) 639-643.
- [53] Moreira FA, Kaiser N, Monory K, Lutz B, Reduced anxiety-like behaviour induced by genetic and pharmacological inhibition of the endocannabinoid-degrading enzyme fatty acid amide hydrolase (FAAH) is mediated by CB1 receptors. *Neuropharmacology* 54 (2008) 141-150.
- [54] Morgan SL, Teyler TJ, VDCCs and NMDARs underlie two forms of LTP in CA1 hippocampus in vivo. *J Physiol* 82 (1999) 736-740.
- [55] Motamedi F, Ghasemi M, Davoodi FG, Naghdi N, Comparison of Learning and Memory in Morphine Dependent Rats using Different Behavioral Models. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 4 (2003) 225-230.
- [56] Naderi N, Ahmad-Molaei L, Mazar-Atabaki A, Ronaghi A, Shirazi-zand Z, Motiei-Langroudi SM, Eslahkar S, L-Type Calcium Channel Mediates Anticonvulsant Effect of Cannabinoids in Acute and Chronic Murine Models of Seizure. *Neurochem Res* 37 (2012) 279-287.
- [57] Narayanan SN, Kumar RS, Potu BK, Nayak S, Bhat PG, Mailankot M, Effect of radio-frequency electromagnetic radiations (RF-EMR) on passive avoidance behaviour and hippocampal morphology in Wistar rats. *Ups J Med Sci* 115 (2010) 91-96.
- [58] 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* 100 (2010) 297-304.
- [59] Pan X, Ikeda SR, and Lewis DL, Rat brain cannabinoid receptor modulates N-type Ca₂₊ channels in a neuronal expression system. *Mol Pharmacol* 49 (1996) 707-714.
- [60] Quevedo J, Vianna M, Daroit D, Born AG, Kuyven CR, Roesler R, L-type voltage-dependent calcium channel blocker nifedipine enhances memory retention when infused into the hippocampus. *Neurobiol Learn Mem* 69 (1998) 320-325.
- [61] Rasuli B, Rasuli S, Komaki A, Study the Effects of Endogenous Cannabinoid Breakdown Inhibitor on Learning and Memory in Rat. *Cell J (Yakhteh)* 12 (2011) 33-34.
- [62] Riedel G, Davies SN, Cannabinoid function in learning, memory and plasticity. *Handb Exp Pharmacol* 168 (2005) 445-477.
- [63] Senik MH, Mansor SM, Tharakan KJ, Bin Abdullah JM,

- Effect of acute administration of *Mitragyna speciosa* learning and memory. *J Medi Plants Res* 6 (2012) 1007-1014.
- [64] Straiker A, Stella N, Piomelli D, Mackie K, Karten HJ, Maguire G, Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 14565-70.
- [65] Squire LR, Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99 (1992) 195-231.
- [66] Sze KH, Sim TC, Wong E, Cheng S, Woo J, Effect of nimodipine on memory after cerebral infarction. *Acta Neurol Scand* 97 (1998) 386-392.
- [67] Takahashi RN, Pamplona FA, Fernandes MS, The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory Korth. standardized methanol extract in animal model of acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett* 380 (2005) 270-275.
- [68] Twitchell W, Brown S, Mackie K, Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78 (1997) 43-50.
- [69] Varvel SA, Anum EA, Lichtman AH, Disruption of CB1 receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology (Berl)* 179 (2005) 863-872.
- [70] Varvel SA, Lichtman AH, Role of the endocannabinoid system in learning and Memory. In: Mechoulam R, editors, *Cannabinoids as Therapeutics*. Birkhauser Verlag/Switzerland, 2005, 111-140.
- [71] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *World drug report*. UNODC, Geneva, 2007.