



## بررسی اثر آنتاگونیست D1 سیستم دوپامینرژیک ناحیه بازولترال آمیگدال بر حافظه ترس ناشی از ACPA در موش کوچک آزمایشگاهی نر

مریم حاجیان<sup>۱</sup>، محمدرضا زرین دست<sup>۲\*</sup>، محمد ناصحی<sup>۳</sup>، مریم بنانج<sup>۱</sup>

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

۲- پژوهشکده علوم شناختی، تهران، ایران

۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرمسار، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران

مستول مکاتبات: zarinmr@ams.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۹

### چکیده

مسیر دوپامینرژیک دارای نقش اساسی در بروز رفتار هیجانی بویژه ترس است. کانابینوئیدها دسته‌ای از مواد روان‌گردان و مخرب حافظه هستند. هدف از این تحقیق، نقش سیستم دوپامینرژیک در حافظه‌ی ترس می‌باشد. در این پژوهش اثر تزریق درون مغزی آنتاگونیست گیرنده D1 سیستم دوپامینرژیک و ACPA (Arachidonyl cyclo propyl amide) مخرب حافظه بر بروز رفتار ترس در موش نر بررسی شد. یک هفته بعد از جراحی گروه‌ها در دستگاه شرطی سازی ترس، درصد مدت زمان بی‌حرکتی و مدت زمان تاخیر تا اولین بی‌حرکتی ثبت شد. طبق تحلیل واریانس یک‌طرفه و دوطرفه و آزمون مکمل توکی در فاز ۵ دقیقه و ۳ دقیقه، درصد مدت زمان بی‌حرکتی ACPA دوز ۰/۱ میلی‌گرم برکیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل، کاهش معنادار و مدت زمان تاخیر تا اولین بی‌حرکتی نیز افزایش معناداری داشته است. درصد مدت زمان بی‌حرکتی دوز ۰/۰۸ میکروگرم بر موش SCH23390 در مدت ۵ دقیقه کاهش معنادار و در مدت ۳ دقیقه دوز ۰/۰۴ میکروگرم بر موش افزایش معنادار در مدت زمان تاخیر تا اولین بی‌حرکتی نشان داد. طبق تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون مکمل توکی مشخص شد که تزریق همزمان دوز بی‌اثر ۰/۰۲ میکروگرم بر موش SCH23390 بصورت درون مغزی با دوزهای ACPA در فاز ۵ دقیقه و ۳ دقیقه سبب کاهش معنی دار درصد و مدت زمان تاخیر تا اولین بی‌حرکتی شده است. طبق نتایج به نظر می‌رسد که تزریق دوزهای بالای ACPA سبب تخریب حافظه و کاهش ترس شده و تزریق SCH23390 به عنوان آنتاگونیست D1 سبب بروز ترس می‌گردد.

کلمات کلیدی: ACPA، SCH23390، دستگاه fear conditioning، ترس، دوپامین

### مقدمه

آزمایش از یک محرک بی‌آزار (محرک شرطی CS) به صورت مکرر با یک محرک آزاردهنده مثل شوک (محرک غیرشرطی) استفاده می‌شود [۱]. محرک شرطی می‌تواند بر محرک غیرشرطی منطبق شده و شرایط ترس را ایجاد کند. در شرطی شدن، محرک خنثی از ابتدا محرک شرطی نامیده نمی‌شود و بعد از اینکه همابندی بین محرک خنثی و غیرشرطی رخ داد و شرطی شدن انجام گرفت محرک خنثی به محرک شرطی تبدیل می‌شود [۱]. مطالعات

شرطی شدن ترس (fear conditioning)، نوعی یادگیری است که هنگام خطر اتفاق می‌افتد. به عنوان مثال، در حیات وحش، وقتی حیوانی با یک حیوان درنده روبرو می‌شود، ممکن است فرار کند و یا بی‌حرکت (freezing) شود و یا حمله کند [۱]. همچنین حیوانات با نشانه‌هایی مثل بو یا صدا خطر را حس می‌کنند [۱]. در آزمایشگاه، دستگاه شرطی سازی ترس پائولوف روش اصلی آموزش و یادگیری حافظه ترس است. در این



و گلوتاماترژیک [۱۸] را از طریق مهار انتقال سیناپسی دستخوش تغییر کرده و به عنوان یک سیستم تعدیل‌کننده سایر سیستم‌های پیام‌رسان عمل میکند. بر هم خوردن تعادل این سیستم در مغز از طریق مواجهه با آگونیست-های خارجی می‌تواند نقش سیستم کانابینوئیدی را در فرایندهای مختلف، نظیر یادگیری و حافظه، از طریق به هم خوردن تنظیم سایر سیستم‌های پیام‌رسان مانند سیستم دوپامینی دستخوش تغییر نماید [۱، ۲، ۷]. هدف ما از این مطالعه بررسی نقش گیرنده‌های دوپامینی ناحیه بازولترال آمیگدال در فراموشی ناشی از آگونیست‌های کانابینوئیدی می‌باشد.

#### مواد و روش کار

**حیوانات:** در این تحقیق از موش‌های آزمایشگاهی نر بالغ نژاد NMRI با میانگین وزنی (g ۲۵-۳۰) جهت جراحی استفاده گردید. حیوانات در قفس‌های مخصوص نگهداری می‌شدند و آب و غذای مخصوص، به میزان کافی، بجز در زمان آزمایش، در دسترس آنها قرار می‌گرفت. محل نگهداری حیوانات از نظر شرایط فیزیکی دارای دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی ۸ صبح) و نیز دمای  $22^{\circ}\text{C}$  بود. تمامی آزمایشات بین ساعت ۹-۱۵ انجام گردید.

**جراحی:** در ابتدا موش را وزن کرده، داروی بیهوشی که از ترکیب کتامین هیدروکلراید، زایلازین و سالین تهیه شده بود مطابق با وزن موش به صورت درون صفاقی تزریق گردید. پس از بیهوشی کامل سر موش در دستگاه استرئوتاکس ثابت شد. مطابق اطلس پاکسینوس و فرانکلین مختصات محل کانول گذاری برای ناحیه BLA با مشخصات از برگما  $-0.4\text{mm}$  (Area postrema = AP)،  $\pm 3\text{mm}$  (Lateral=L)،  $-3.7\text{mm}$  (Ventral=V) جراحی شدند. سپس کانول راهنما به طول  $1.0\text{mm}$ ، تهیه شده از سر سرنگ ۲۲ گیج به عمق یک میلی‌متر بالاتر از ناحیه BLA در درون سوراخ قرار

شرطی‌سازی در حیوانات از طریق میزان بی‌حرکتی یعنی بی‌حرکتی مطلق محاسبه می‌شود [۱]. طبق تحقیقات انجام شده منطقه اصلی یادگیری و شرطی‌سازی، آمیگدال بوده که اختلال و یا تخریب این ناحیه سبب عدم یادگیری و بیان ترس می‌شود [۲].

سه هسته اصلی در منطقه آمیگدال نقش اصلی در فرایند کنترل ترس دارند که عبارتند از: جانبی (Lateral) [۱۲] و قاعده‌ای جانبی (Basolateral) [۱۸] و مرکزی (Central) [۲]. هسته قاعده‌ای جانبی آمیگدال (BLA) نقش کلیدی در تنظیم و تعدیل ترس و اضطراب بازی می‌کند [۱۸]. توانایی اثرگذاری این هسته روی فرایند تحکیم حافظه از طریق وابران‌های این هسته اعمال می‌شود [۱۸]. علاوه بر این آمیگدال و کورتکس پره‌فرونتال ارتباط دو طرفه و نزدیکی با هم دارند و تغییر فعالیت یکی از این دو می‌تواند نقش دیگری را به خصوص در فرایندهای شناختی نظیر حافظه تحت تاثیر قرار دهد [۱۳]. از سوی دیگر، در مکانیزم‌های مولکولی فرایند حافظه، سیستم‌های مختلف عصبی از جمله: سیستم‌های گلوتاماترژیک، دوپامینرژیک، گابا و کولینرژیک نقش آفرینی می‌کنند که در این میان گیرنده‌های دوپامینی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند [۱۸]. اعتقاد بر این است که سیستم دوپامینی، با تنظیم مکانیسم LTP (Long-term potentiation) [۲۰] در سیستم مزولیمبیک جوندگان، نقش مهمی در مکانیسم سلولی یادگیری و حافظه ایفاء می‌کند [۲۰]. کانابینوئیدها دسته‌ای از مواد شیمیایی روان-گردان هستند که از طریق اثر بر روی گیرنده‌های ویژه خود، تأثیر خود را بر سیستم عصبی به جا می‌گذارند [۲، ۷]. حداقل دو نوع گیرنده کانابینوئیدی موسوم به CB1 و CB2 [۲، ۷] شناسایی شده است که از طریق تعاملات پیچیده با سایر سیستم‌ها، تأثیرات ناشی از اتصال لیگاند را میانجی‌گری می‌کنند، به عنوان مثال؛ فعال شدن گیرنده‌های کانابینوئیدی نوع اول (CB1) در مغز، فعالیت سایر سیستم‌های پیام‌رسان عصبی مانند سیستم‌های دوپامینرژیک [۲، ۷]، سروتونرژیک [۳]، گابائرژیک [۱۸]



**جلسه آموزش:** روز آموزش موش‌ها به صورت انفرادی به اتاق تست منتقل شدند. هر موش در داخل جعبه قرار گرفت. دو دقیقه به موش اجازه جستجو در محیط داده شد. سپس به مدت ۳۰ ثانیه صوتی با مشخصات ۴۰۰۰ هرتز و ۹۰ دسیبل پخش شد. در دو ثانیه آخر صوت، شوک به مشخصات ۱ میلی آمپر به حیوان داده شد. بعد از ۳۰ ثانیه حیوان از داخل جعبه درآورده شد.

**جلسه آزمون و ارزیابی حافظه:** برای ارزیابی و اندازه‌گیری اثر داروها جلسه تست ۲۴ ساعت بعد از آموزش و از نظر روش، مشابه جلسه آموزش بود به جز اینکه هیچ شوکی وجود نداشت. تست بین ساعات ۹ صبح تا ۱۵ عصر انجام شد و دمای اتاق و تاریخ نیز ثبت گردید. حیوان ابتدا به مدت ۵ دقیقه بدون شوک و صدا قرارگرفت سپس بعد از ۱ ساعت استراحت فضای داخل اتاق را تعویض کرده و با ۳ دقیقه صدا قرار داده شد با این تفاوت که شوک به حیوان داده نمی‌شد. مدت زمان بی‌حرکتی ثبت گردید و میزان آن به صورت درصد بیان شد. همچنین رفتارهای دیگر از قبیل مدت زمان تاخیر تا اولین بی‌حرکتی در طول فاز ۵ دقیقه و فاز ۳ دقیقه اندازه‌گیری شد.

**تهیه برش‌های مغزی جهت تایید صحت جراحی مغز و محل تزریق دارو:** پس از انجام آزمایشات، حیوانات توسط کلروفورم کشته شدند و با تزریق رنگ متیلن بلو ۱ درصد (۰/۶ میکرولیتر) داخل هر دو کانول، محل جراحی رنگ آمیزی گردید. سپس مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار می‌گرفت. پس از یک هفته با استفاده از دستگاه ویروسلایس برش‌هایی تهیه شد و محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. پس از کسب اطمینان از محل قرارگیری کانول‌ها در نواحی مورد نظر، اطلاعات حاصل از حیوان مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مابقی حذف شدند.

داده شد. سپس توسط سیمان دندانپزشکی که از مخلوط آکریل و مونومر به دست می‌آمد کانول تثبیت شد و کانول دوم را به همین ترتیب قرار دادیم. بعد از ۷ روز موش آماده تزریق گردید.

**تزریق دارو در هسته بازولترال آمیگدال:** داروهای موثر بر سیستم دوپامینرژیک (SCH23390) آنتاگونیست D1 و ACPA (آگونیست CB1) در سالیین حل شدند. جهت تزریق از کانول تزریق، سر سرنگ ۲۷ دندان‌پزشکی که ۱ میلی متر بلندتر از کانول راهنما (۱۱ میلی‌متر) بریده شده بود توسط رابط پلی‌اتیلن شماره ۴ متصل به سرنگ همیلتون به حجم ۲ میکرولیتر استفاده شد. سپس کانول تزریق را به آرامی وارد کانول راهنما کرده به مدت ۶۰ ثانیه ۰/۳ میکرولیتر دارو به هر طرف از ناحیه BLA تزریق شد. ACPA (دوزهای ۰/۰۱، ۰/۰۲ و ۰/۱ میلی-گرم بر موش) به صورت درون صفاقی (I.P) ۱۵ دقیقه قبل از آموزش و SCH23390 (دوزهای ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸ میکروگرم بر موش) به صورت درون مغزی (I.C.V) ۵ دقیقه قبل از آموزش تزریق شد.

**دستگاه شرطی سازی ترس:** جهت سنجش حافظه ترس از دستگاه Fear conditioning استفاده شد. این دستگاه شامل جعبه چوبی به ابعاد ۶۷×۵۵×۵۳ سانتی‌متر مکعب می‌باشد. در سقف جعبه دوربینی برای مشاهده حیوان و دو عدد بلندگو برای پخش صوت نصب شده است این بلندگوها به کامپیوتری که در آن برنامه تولیدکننده صوت نصب شده است متصل است. یک لامپ بانور ۲۵ وات در گوشه‌ای از جعبه نصب گردیده است. جعبه شرطی‌سازی با ابعاد ۲۵×۲۵×۲۵ سانتی‌متر مکعب در داخل جعبه آکوستیک قرار می‌گیرد. در کف این جعبه میله‌های موازی از جنس استیل با قطر ۰/۳ سانتی‌متر و به فاصله موازی ۱ سانتی‌متر قرار دارد که به دستگاه شوکر متصل است. پس از هر بار استفاده از دستگاه کف آن توسط اسپری اتانول تمیز می‌شد.



دوز (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم) ACPA سبب افزایش معنی دار مدت زمان تاخیر تا اولین بی حرکتی و مابقی دوزها کاملاً بی اثر بوده اند (جدول ۲-نمودار ۲).

**بررسی منحنی اثر SCH23390 آنتاگونیست D1 بر حافظه‌ی ترس:** تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون مکمل توکی نشان می‌دهد که تزریق دوزهای (۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸ میکروگرم بر موش) بصورت درون مغزی ۵ دقیقه قبل از آموزش بی معنا بوده (جدول ۳ و نمودار ۳) و در ۳ دقیقه دوز (۰/۰۴ میکروگرم بر موش) افزایش معنادار در مدت زمان تاخیر تا اولین بی حرکتی نشان داد (جدول ۴ و نمودار ۴).

**بررسی منحنی اثر SCH23390 آنتاگونیست D1 بر حافظه ترس ناشی از ACPA:** تحلیل واریانس دوطرفه و آزمون مکمل توکی در مقایسه با گروه کنترل نشان می‌دهد که تزریق همزمان دوز بی اثر  $0.02 \mu\text{g}/\text{mice}$  SCH23390 بصورت درون مغزی ۵ دقیقه قبل از آموزش با دوزهای ACPA درون صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از آموزش در فاز ۵ دقیقه سبب کاهش معنی دار مدت زمان تاخیر تا اولین بی حرکتی (جدول ۵ و نمودار ۵) و ۳ دقیقه سبب کاهش معنی دار مدت زمان تاخیر تا اولین بی حرکتی و درصد مدت زمان بی حرکتی شده است (جدول ۶ و نمودار ۶).

**روش حل کردن و مصرف داروها:** داروهای مورد استفاده در این مطالعه ( Arachidonyl cyclo propyl amide یا آگونیست CB1) و SCH23390 (آنتاگونیست D1 دوپامینی) بودند که به میزان استاندارد در نرمال سالین حل شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری:** اطلاعات حاصل از این پژوهش در نتیجه بررسی حافظه‌ی ترس در دستگاه شرطی سازی ترس (fear conditioning) با ثبت درصد زمان بی- حرکتی (F%) و مدت زمان تأخیر تا اولین بی حرکتی (latency) حیوانات درون دستگاه به عنوان معیاری از میزان حافظه توسط محقق ثبت شد. داده‌های بدست آمده در نرم افزار SPSS 20 وارد شدند. برای تحلیل داده‌ها از تحلیل واریانس یکطرفه و دوطرفه و برای مقایسه بین گروه‌ها از آزمون مکمل توکی و برای رسم نمودارها از نرم افزار Sigma plot 10 استفاده شد و داده‌ها در سطح  $P < 0.05$  معنی دار تلقی شدند.

## نتایج

**بررسی منحنی اثر ACPA آگونیست CB1 بر حافظه ترس:** تحلیل واریانس یک طرفه و آزمون مکمل توکی نشان می‌دهد که در فاز ۵ دقیقه تزریق دوز ۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم ACPA بصورت درون صفاقی ۱۵ دقیقه قبل از آموزش معنی دار بوده است زیرا درصد مدت زمان بی حرکتی را به شدت کاهش داده و سبب افزایش معنی دار مدت زمان تاخیر تا اولین بی حرکتی شده است. ولی دوزهای ۰/۰۱ و ۰/۰۲ میلی گرم بر کیلوگرم دوزهای بی اثر شناخته شده‌اند (جدول ۱ و نمودار ۱). در فاز ۳ دقیقه



جدول ۱- نتایج آنالیز آماری اثر ACPA بر حافظه ترس و اضطراب در فاز ۵ دقیقه Fear condition

The effect of ACPA upon fear memory & anxiety in male mice					
Dependent variable	Groups	One-way Anova results	Significance	Pvalue	Significance results
Freezing Time% 5 min	Saline	F ( 3 , 28 ) =4.825 Sig=0.008	0.398 0.995 0.045	P > 0.05 P > 0.05 P < 0.05	Non-Significant Non-Significant Significant
	ACPA 0.01				
	ACPA 0.02				
	ACPA 0.1				
Latency Freezing 5 min	Saline	F ( 3 , 28 ) =52.741 Sig= 0.000	0.633 0.964 0.000	P > 0.05 P > 0.05 P < 0.05	Non-Significant Non-Significant Significant
	ACPA 0.01				
	ACPA 0.02				
	ACPA 0.1				

جدول ۲- نتایج آنالیز آماری اثر ACPA بر حافظه ترس و اضطراب در فاز ۳ دقیقه Fear condition

The effect of ACPA upon fear memory & anxiety in male mice					
Dependent variable	Groups	One-way Anova results	Significance	Pvalue	Significance results
Freezing Time% 3min	Saline	F ( 3 , 28 ) =1.964 Sig=0.142	0.439 0.859 0.878	P > 0.05 P > 0.05 P > 0.05	Non-Significant Non-Significant Non-Significant
	ACPA 0.01				
	ACPA 0.02				
	ACPA 0.1				
Latency Freezing 3min	Saline	F ( 3 , 28 ) = 15.451 Sig=0.000	0.996 1.000 0.000	P > 0.05 P > 0.05 P < 0.05	Non-Significant Non-Significant Significant
	ACPA 0.01				
	ACPA 0.02				
	ACPA 0.1				

جدول ۳- نتایج آنالیز آماری اثر SCH23390 بر حافظه ترس و اضطراب در فاز ۵ دقیقه Fear condition

The effect of SCH23390 upon fear memory & anxiety in male mice					
Dependent variable	Groups	One-way Anova results	Significance	Pvalue	Significance results
Freezing Time% 5 min	Saline	F ( 3,28 ) = 0.843 Sig=0.482	0.883 0.888 0.926	P > 0.05 P > 0.05 P > 0.05	Non-Significant Non-Significant Non Significant
	SCH23390 0.02				
	SCH23390 0.04				
	SCH23390 0.08				
Latency Freezing 5 min	Saline	F ( 3,28 ) = 1.973 Sig=0.141	0.548 0.307 0.994	P > 0.05 P > 0.05 P > 0.05	Non-Significant Non-Significant Non-Significant
	SCH23390 0.02				
	SCH23390 0.04				
	SCH23390 0.08				



جدول ۴- نتایج آنالیز آماری اثر SCH23390 بر حافظه ترس و اضطراب در فاز ۳ دقیقه Fear condition

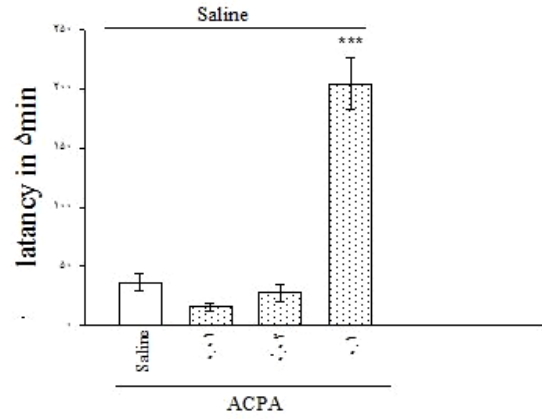
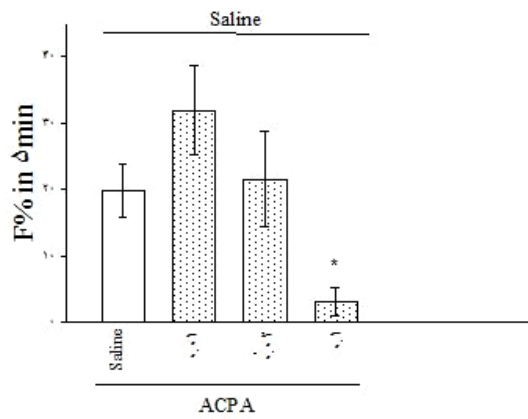
The effect of SCH23390 upon fear memory & anxiety in male mice					
Dependent variable	Groups	One-way Anova results	Significance	Pvalue	Significance results
Freezing Time% 3 min	Saline	F ( 3,28) = 3.120 Sig=0.042	0.779	P > 0.05	Non-Significant
	SCH23390 0.02		0.815	P > 0.05	Non-Significant
	SCH23390 0.04		0.990	P > 0.05	Non-Significant
	SCH23390 0.08				
Latency Freezing 3 min	Saline	F ( 3,28) = 5.510 Sig=0.004	0.766	P > 0.05	Non-Significant
	SCH23390 0.02		0.007	P < 0.05	Significant
	SCH23390 0.04		1.000	P > 0.05	Non-Significant
	SCH23390 0.08				

جدول ۵- نتایج آنالیز آماری اثر SCH23390 بر حافظه ترس و اضطراب القاء شده توسط ACPA در فاز ۵ دقیقه Fear condition

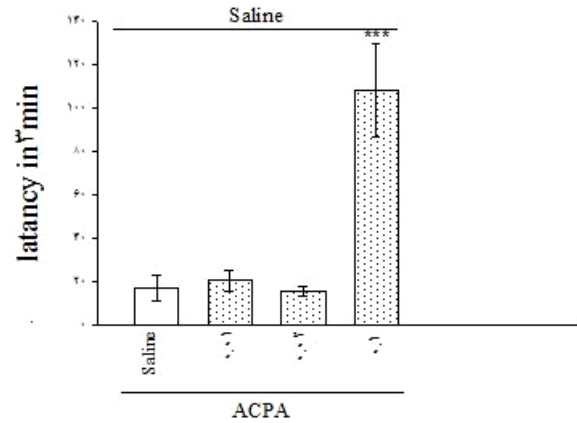
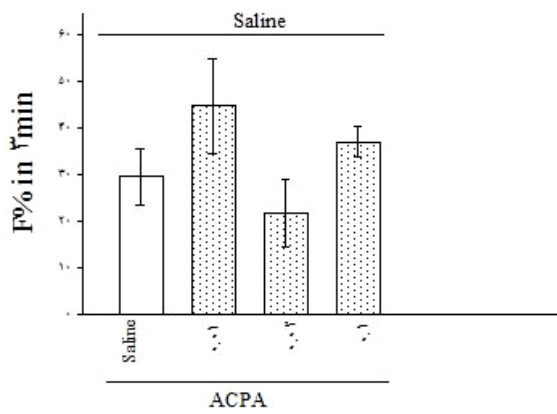
The effect of SCH23390 upon fear memory & anxiety induced by ACPA in male mic						
Dependent variable	Groups	Two-way Anova results	Significance Two-way	Significance One-way	Pvalue	Significance results
Freezing Time% 5 min	11.....12	Gr: F ( 3,56) = 4.746 Fear: F ( 1,56) = 0.275 Gr*Fear:( 3,56) = 0.728	0.005	0.999	P > 0.05	Non-Significant
	21.....22		0.602	0.933	P > 0.05	Non-Significant
	31.....32		1.000	1.000	P > 0.05	Non-Significant
	41.....42		0.540	0.991	P > 0.05	Non-Significant
Latency Freezing 5min	11.....12	Gr: F ( 3,56) = 32.800 Fear: F ( 1,56) = 6.112 Gr*Fear:( 3,56) =24.927	0.000	0.304	P > 0.05	Non-Significant
	21.....22		0.016	0.883	P > 0.05	Non-Significant
	31.....32		1.000	1.000	P > 0.05	Non-Significant
	41.....42		0.000	0.000	P < 0.05	Significant

جدول ۶- نتایج آنالیز آماری اثر SCH23390 بر حافظه ترس و اضطراب القاء شده توسط ACPA در فاز ۵ دقیقه Fear condition

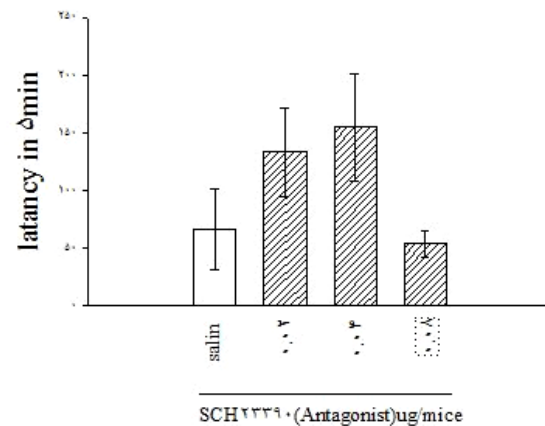
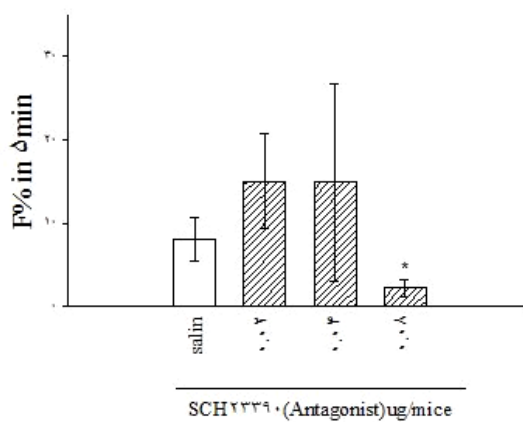
The effect of SCH23390 upon fear memory & anxiety induced by ACPA in male mic						
Dependent variable	Groups	Two-way Anova results	Significance Two-way	Significance One-way	Pvalue	Significance results
Freezing Time% 3min	11.....12	Gr: F ( 3,56) = 2.175 Fear: F ( 1,56) = 0.021 Gr*Fear:( 3,56) = 4.852	0.101	1.000	P > 0.05	Non-Significant
	21.....22		0.885	0.997	P > 0.05	Non-Significant
	31.....32		0.005	0.180	P > 0.05	Non-Significant
	41.....42		0.005	0.035	P < 0.05	Significant
Latency Freezing 3min	11.....12	Gr: F ( 3,56) = 11.350 Fear: F ( 1,56) = 9.921 Gr*Fear:( 3,56) =16.039	0.000	0.974	P > 0.05	Non-Significant
	21.....22		0.003	1.000	P > 0.05	Non-Significant
	31.....32		1.000	1.000	P > 0.05	Non-Significant
	41.....42		0.000	0.000	P < 0.05	Significant



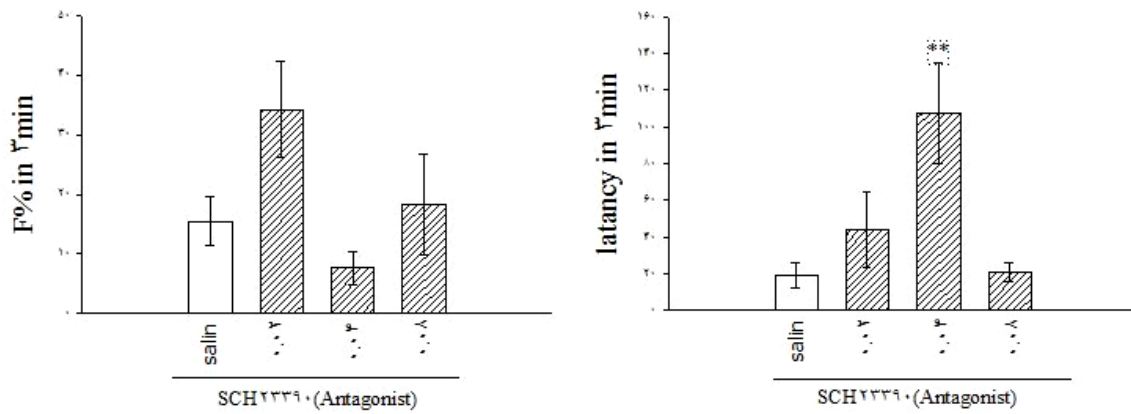
نمودار ۱- اثر ACPA بر حافظه ترس در مدت ۵ دقیقه



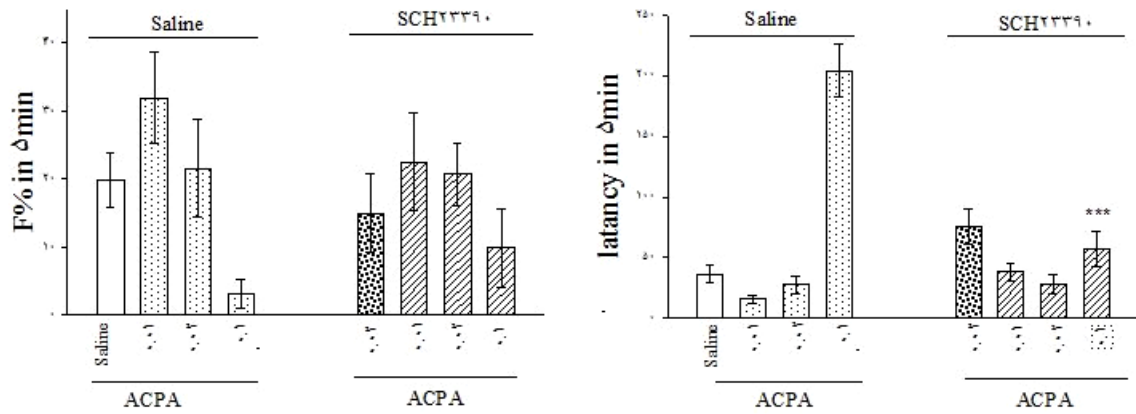
نمودار ۲- اثر ACPA بر حافظه ترس در مدت ۳ دقیقه



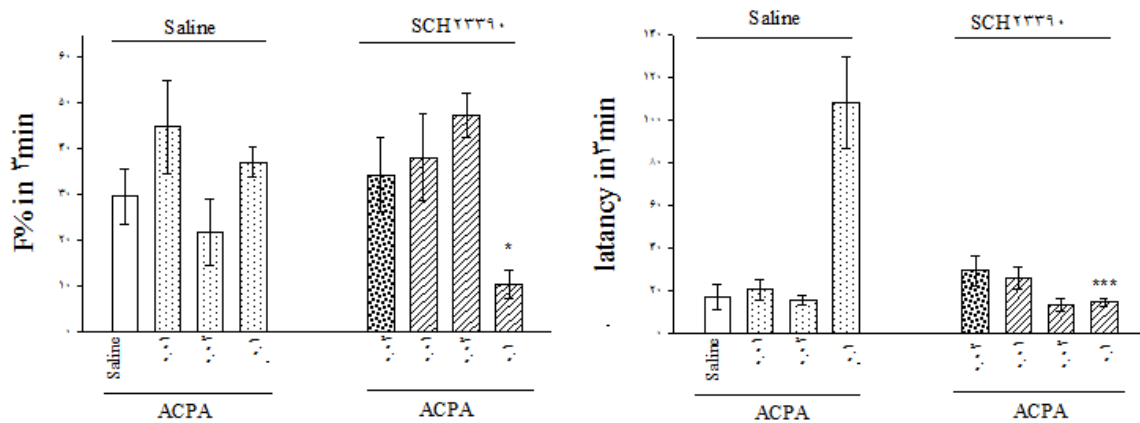
نمودار ۳- اثر SCH23390 بر حافظه ترس در مدت ۵ دقیقه



نمودار ۴- اثر SCH23390 بر حافظه ترس در مدت ۳ دقیقه



نمودار ۵- اثر SCH23390 القا شده توسط ACPA بر حافظه ترس در مدت ۵ دقیقه



نمودار ۶- اثر SCH23390 القا شده توسط ACPA بر حافظه ترس در مدت ۳ دقیقه





## بحث

کانابینوئیدها (خوراکی یا تزریقی) آزادسازی دوپامین را افزایش می‌دهد [۷] به طوری که دوپامین در فضای خارج سلولی آزاد و منجر به بالابردن سطح دوپامین خارج سلولی می‌گردد [۱۴]. در نهایت فعالیت رسپتورهای آلفا آدرنرژیک به وسیله دوپامین جلوگیری و منجر به خالی شدن منابع کلسیم خارج سلولی با آزادسازی کلسیم می‌شوند [۱۸]. با خالی شدن منابع کلسیم، رسپتورهای گلوتاماتی متابوتروپیک نوع ۱ از فعالیت سیناپتیک جلوگیری و در واقع نورون‌های دوپامینی تولید ایمپالس‌های مهاری می‌کنند [۱۸]. طی مطالعاتی، گزارش شده است که اندوکانابینوئیدها بر رسپتورهای CB1 در آمیگدال و سیستم لیمبیک اثر گذاشته و از طریق یک تاثیر مهاری بر روی شبکه‌های نورونی توسط نورون‌های GABA موجب کمبود حافظه می‌شوند [۱۴]. گیرنده‌های CB1 و CB2 اغلب در سیستم عصبی مرکزی شناسایی شده‌اند [۲]. اما گیرنده CB2 در سایر اندام‌ها بویژه بافت‌های محیطی نیز یافت می‌شود [۲]، بنابراین بسیاری از آثار عصب روانشناختی کانابینوئیدهای درونزاد توسط گیرنده CB1 میانجیگری شده است [۱۴]. از آنجایی که این گیرنده در غشاء پیش سیناپسی و متصل به پروتئین G قرار گرفته، بعد از فعال شدن (تزریق درون صفاقی) در غشا اینفرا لیمبیک، به طور منفی از طریق پروتئین‌های مهاری Gi (G inhibitory) به آنزیم آدنیلات سیکلاز متصل شده، باعث بستن کانال‌های کلسیمی، باز کردن کانال‌های پتاسیمی، مهار فعالیت آدنیلات سیکلاز، متعاقباً کاهش تولید cAMP سیتوزولی و تحریک کینازهایی می‌شود که در پروتئین‌ها بقایای تیروزین، سرین و ترونین را فسفریله کرده و مسیر MAPK (Mitogen-activated protein kinase) را تحریک می‌کند [۲] و [۷]. گیرنده‌های CB1، علاوه بر آن، از طریق Gi منجر به کاهش رهاسازی میانجیگرهای عصبی مختلف مانند گلوتامات، استیل کولین، گابا، دوپامین و نورآدرنالین می‌شود [۲، ۷، ۱۸]. سپس به دنبال کاهش میانجیگرها، پیام

در این پژوهش با استفاده از شرطی‌سازی ترس توسط دستگاه fear conditioning (که روشی قابل قبول برای بررسی حافظه ترس در حیوان آزمایشگاهی می‌باشد) اثر تزریق درون‌مغزی دوزهای مختلف داروی آنتاگونیست گیرنده D1 سیستم دوپامینرژیک در ناحیه بازولترال آمیگدال (BLA)، بر حافظه ترس موش‌های نر کوچک آزمایشگاهی حساس شده با ACPA داروی آگونیست CB1، به صورت درون صفاقی بررسی شد. همسو با مطالعات گذشته، نتایج مطالعات ما نیز نشان می‌دهد که تزریق درون صفاقی مقادیر بالای ACPA به عنوان آگونیست CB1 قبل از آموزش، به کاهش و تخریب حافظه ترس در روز آزمون منجر شد [۴]. طبق مطالعات قبلی، کانابینوئیدها ترکیبات موجود در گیاه شاهدانه هندی با نام علمی *Cannabis sativa* از مشتقات اسیدهای چرب به ویژه اسید آراشیدونیک می‌باشند که سبب حالات روانی می‌شوند [۱۶]. طبق مطالعات بالینی و آزمایشگاهی، THC (Tetra hydro cannabinol) ماده موثر کانابینوئیدهای روان‌گردان، فعالیت نورون‌های دوپامینرژیکی را در مسیر VTA (Ventral tegmental area) افزایش می‌دهند [۸]. VTA ناحیه‌ای در سیستم لیمبیک و یکی از سیستم‌های مهم دوپامینرژیکی در ساقه مغز می‌باشد [۸]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که نورون‌های دوپامینرژیکی در VTA، تحت کنترل عملکرد بازدارندگی اینترنورون‌های گابارژیک هستند، که مهار گابا به وسیله رسپتورهای اپیوئیدی باعث افزایش آزادسازی دوپامین در پایانه‌های نورون‌های دوپامینرژیک در هسته آکومبیس می‌شود [۸]. همچنین مشخص شد که کانابینوئیدها فعالیت و آزادسازی دوپامین را در مسیر مزولیمبیک از VTA به هسته آکومبیس افزایش می‌دهند [۱، ۸]. هسته‌های آکومبیس پایانه‌های مهمی از فیبرها را دارا هستند و اهمیت ویژه‌ای در مصرف داروهای اعتیادآور دارند [۱] البته مکانیسم آن نیز هنوز ناشناخته است. مطابق با تحقیقات انجام شده، مصرف

دوپامینی در پالیدوم شکمی و تعدادی از هسته‌های آمیگدال مشاهده شده است که قادر به تولید cAMP می‌باشد [۱]، در صورتی که گیرنده D<sub>2</sub> دوپامینی تولید cAMP را مهار می‌کند [۱، ۱۸]. گیرنده D<sub>1</sub> دوپامینی پس از اتصال، باعث فعال‌سازی Gs (G stimulus) می‌شود [۱]. این G پروتئین‌ها، با اثر بر پیامبرهای ثانویه (cAMP، آدنیلیل سیکلاز، کانال‌های کلسیمی و پتاسیمی و آراشیدونیک اسید)، فعالیت سلول را تنظیم می‌کنند [۱، ۱۸] در طی مطالعات انجام شده SCH۲۳۳۹۰ (آنتاگونیست گیرنده D<sub>1</sub>)، می‌تواند با میل ترکیبی بالا به گیرنده‌های 5-HT<sub>2</sub> (گیرنده درون‌زاد سروتونینی متصل به پروتئین G) مغز بچسبد [۳] و سپس موجب ره‌ایش کتکول‌آمین‌ها شده و موجب سنتز دوپامین و نوروترانسمیترهای سیستم آدرنرژیک در هسته اینفرا لیمبیک و در نهایت سبب برگشت حافظه و ترس گردد [۱، ۳، ۱۳]. با این حال این مکانیسم هنوز به طور واضح مشخص نشده است. در آزمایش دیگری مشخص شد، که موش‌های فاقد گیرنده‌های CB<sub>1</sub> کانابینوئیدی، قادر به فعال کردن مسیر دوپامینی در مغز نیستند [۷]. به هر حال نتایج ما با بررسی‌های پیشین که نشان می‌دهد آگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی مسبب تخریب حافظه است [۷]، مطابقت دارد.

### نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، که تزریق و تداخل هم‌زمان ACPA با SCH23390 آنتاگونیست گیرنده D<sub>1</sub> دوپامینی ناحیه BLA، سبب جلوگیری فراموشی ناشی از ACPA شده است اما مکانیسم القای فراموشی ACPA و مکانیسم اثر آنتاگونیست گیرنده D<sub>1</sub> بر روی فراموشی القا شده با آگونیست گیرنده کانابینوئید، نیازمند مطالعات بیشتری می‌باشد.

ترس از طریق پایانه‌های نورونی به آمیگدال جانبی منتقل نشده و به BLA نمی‌رسد [۲، ۱۲، ۱۸]. در نتیجه حیوان ترسی را احساس نمی‌کند و بدین طریق مولفه‌های اصلی یادگیری و حافظه که شامل تثبیت و به خاطرآوری است را تحت تاثیر قرار می‌دهند [۷]. مطالعه حاضر نشان داد که تزریق درون‌مغزی آنتاگونیست گیرنده D<sub>1</sub> (SCH23390) سیستم دوپامینی، قبل از آموزش، به تنهایی سبب افزایش ترس شد. یافته‌های ما با مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد. زیرا نشان می‌دهد نورون‌های دوپامینرژیک، اثرات مهمی در تحریک ترس دارند [۱]. ترس از جمله اختلالاتی است که با شدت‌های متفاوتی می‌تواند موجب بروز مشکلاتی در زندگی فردی و اجتماعی انسان گردد [۲].

نوروترانسمیترهای مختلفی از جمله دوپامین، سروتونین، کوله‌سیستوکینین، گابا، گلوتامات، در بروز رفتار ترس دخیل می‌باشند [۲، ۱۸]. همچنین با مطالعه و شناسایی برخی مراکز و مسیرهای عصبی ترس و اضطراب و تاثیر نوروترانسمیترهای مختلف در این پدیده رفتاری می‌توان به نقش عمده دوپامین به عنوان عمده‌ترین نوروترانسمیتر در این پدیده رفتاری پی برد [۲، ۱۶، ۱۸]. دوپامین یکی از میانجی‌های عصبی در سیستم اعصاب مرکزی شناخته شده است و شواهدی مبنی بر اینکه مسیر دوپامینرژیک مزولیمبیک دارای نقش اساسی در میانجی‌گری رفتارهای هیجانی وجود دارد، دلیل بر اهمیت بیشتر جایگاه‌های عملکردی دوپامین و گیرنده‌های آن در پدیده رفتار ترس می‌باشد [۱۸]. به طور کلی دوپامین به عنوان یکی از مهمترین و فراوان ترین میانجی‌های عصبی کاتکول‌آمینی در مغز پستانداران است که از هیدروکسیسیلاسیون و دکربوکسیلاسیون اسید آمینه تیروزین به وجود می‌آید [۱۰]. بر اساس شواهد فارماکولوژیک وجود دو زیر گروه عمده برای گیرنده‌های دوپامینی به نام D<sub>1</sub> و D<sub>2</sub> وجود دارد [۱۰] و اساس این طبقه بندی توانایی و عدم توانایی دوپامین برای تحریک آدنیلات سیکلاز و تولید cAMP است [۱۰، ۱۸]. طبق یافته‌ها، متوسط تراکم گیرنده D<sub>1</sub>



## منابع

- involvement of the endocannabinoid system. *The International Journal of neuropsychopharmacology/ Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*, 16(6): 1407-19.
- 7- Castellano C., C. Rossi-Arnaud, V. Cestari, M. Costanzi (2003), Cannabinoids and memory: animal studies. Current drug targets CNS and neurological disorders. 2(6): 389-402.
- 8- De Souza Caetano K.A., A.R. de Oliveira, M.L. Brandao (2013), Dopamine D2 receptors modulate the expression of contextual conditioned fear: role of the ventral tegmental area and the basolateral amygdala. *Behavioural pharmacology*. 24(4): 264-74.
- 9- Gonzalez S.C., I.G. Karniol, E.L. Carlini (1972), Effects of Cannabis sativa extract on conditioned fear. *Behavioral Biology*, 7(7):83-94.
- 10- Garcia-Amado M., L. Prensa (2013), Distribution of dopamine transporter immunoreactive fibers in the human amygdaloid complex. *The European Journal of Neuroscience*. Sep 16. PubMed PMID: 24102648.
- 11- Haaker J., S. Gaburro, A. Sah, N. Gartmann, T.B. Lonsdorf, K. Meier (2013), Single dose of L-dopa makes extinction memories context-independent and prevents the return of fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(26): E2428-36.
- 12- Kim D., D. Pare, S.S. Nair (2013), Mechanisms contributing to the induction and storage of Pavlovian fear memories in the lateral amygdala. *Learning & Memory*, 20(8): 421-30.
- 13- Kuhnert S., C. Meyer, M. Koch (2013), Involvement of cannabinoid receptors in
- 1- Albrechet-Souza L., M.C. Carvalho, M.L. Brandao (2013), D(1)-like receptors in the nucleus accumbens shell regulate the expression of contextual fear conditioning and activity of the anterior cingulate cortex in rats. *The International Journal of Neuropsychopharmacology/ Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum*, 16(5): 1045-57.
- 2- Bergstrom H.C., C.G. McDonald, S. Dey, H. Tang, R.G. Selwyn, L.R. Johnson (2013), The structure of Pavlovian fear conditioning in the amygdala. *Brain Structure & Function*, 218(6):1569-89.
- 3- Campos A.C., V. de Paula Soares, M.C. Carvalho, F.R. Ferreira, M.A. Vicente, M.L. Brandao (2013), Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. *Psychopharmacology*, 226(1): 13-24.
- 4- Campos A.C., F.A. Moreira, F.V. Gomes, E.A. Del Bel, F.S. Guimaraes (2012), Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 367(1607): 3364-78.
- 5- Campos A.C., V. de Paula Soares, M.C. Carvalho, F.R. Ferreira, M.A. Vicente, M.L. Brandao (2013), Involvement of serotonin-mediated neurotransmission in the dorsal periaqueductal gray matter on cannabidiol chronic effects in panic-like responses in rats. *Psychopharmacology*, 226(1): 13-24.
- 6- Campos A.C., Z. Ortega, J. Palazuelos, M.V. Fogaca, D.C. Aguiar, J. Diaz-Alonso (2013), The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis:



modulation of defensive responses. *Journal of psychopharmacology*, 1: 40-55.

18- Rezayof A., P. Habibi, M.R. Zarrindast (2010), Involvement of dopaminergic and glutamatergic systems of the basolateral amygdala in amnesia induced by the stimulation of dorsal hippocampal cannabinoid receptors. *Neuroscience*, 175:118-26.

19- Rezayof A., P. Habibi, M.R. Zarrindast (2011), Involvement of dopaminergic and glutamatergic systems of the basolateral amygdala in amnesia induced by the stimulation of dorsal hippocampal cannabinoid receptors. *Neuroscience*, 175: 118-26.

20- Rossato J.I., L.R. Bevilaqua, I. Izquierdo, J.H. Medina, M. Cammarota (2009), Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science*, 325(5943): 1017-20.

21- Shionoya K., C. Hegoburu, B.L. Brown, R.M. Sullivan, V. Doyere, A.M. Mouly (2013), It's time to fear! Interval timing in odor fear conditioning in rats. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 7: 128.

the amygdala and prefrontal cortex of rats in fear learning, consolidation, retrieval and extinction. *Behavioural Brain Research*, 250: 274-84.

14- Lutz B. (2004), On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochemical Pharmacology*, 68(9):1691-8.

15- Lutz B. (2004), On-demand activation of the endocannabinoid system in the control of neuronal excitability and epileptiform seizures. *Biochemical Pharmacology*, 68(9):1691-8.

16- McHugh S.B., A. Marques-Smith, J. Li, J.N. Rawlins, J. Lowry, M. Conway (2013), Hemodynamic responses in amygdala and hippocampus distinguish between aversive and neutral cues during Pavlovian fear conditioning in behaving rats. *The European Journal of Neuroscience*, 37(3): 498-507. P

17- Moreira F.A., D.C. Aguiar, L.B. Resstel, S.F. Lisboa, A.C. Campos, F.V. Gomes (2012), Neuroanatomical substrates involved in cannabinoid