

## مقاله پژوهشی اصیل

# اثر سیستم کانابینوئیدی ناحیه CA1 هیپوکامپ بر حافظه موش‌های صحرایی حساس شده با آپومرفین

### محمد ناصحی<sup>۱</sup>

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد علوم  
و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی

### دکتر محمدرضا زرین‌دست

گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی و مرکز  
ملی مطالعات اعتیاد، دانشگاه علوم پزشکی  
تهران

### دکتر علی حائری روحانی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه  
تهران

### دکتر موسی صاحبقرانی

گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه  
علوم پزشکی تهران

**هدف:** در این پژوهش آثار تزریق دوطرفه آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های کانابینوئیدی در هیپوکامپ پشتی (CA1) بر حافظه موش‌های صحرایی حساس شده با آپومرفین بررسی شد. **روش:** روش اجتنابی مهاري (غیرفعال) با مدل دوطرفه برای بررسی حافظه در موش‌های صحرایی نژاد ویستار به کار گرفته شد و حافظه حیوان ۲۴ ساعت بعد از آموزش مورد بررسی قرار گرفت. **یافته‌ها:** نتایج تزریق درون مغزی آگونیست گیرنده‌های CB1 و CB2، WIN55, 212-2 (۰/۲۵، ۰/۵ μg/rat) به صورت وابسته به مقدار به تخریب حافظه حیوانات در روز آزمون منجر شد. در حالی که تزریق درون مغزی آنتاگونیست اختصاصی CB1، AM251 (۸۰۰ ng/rat)، ۵۰، ۲۵ اثری روی حافظه نداشت. تزریق درون مغزی AM251، ۲ دقیقه قبل از تزریق درون مغزی WIN55, 212-2 (۰/۲۵ μg/rat) اثری بر تخریب حافظه ناشی از WIN55, 212-2 (۰/۲۵ μg/rat) نداشت. هر چند که اثر تخریبی WIN55, 212-2 (۰/۲۵ μg/rat) به دنبال تزریق سه‌روزه آپومرفین (۸ mg/kg, S.C، ۰/۵)، پنج روز قبل از تزریق WIN55, 212-2 کاملاً از بین رفته و این اثر برگشتی حافظه در پی تزریق آنتاگونیست گیرنده D2 دوپامینی، سولپیراید (۸ mg/kg, S.C) نیز از بین رفته و ۳۰ دقیقه قبل از تزریق آپومرفین مهار شد، در حالی که آنتاگونیست گیرنده D1، SCH23390 (۸ mg/kg, S.C، ۰/۰۷، ۰/۰۲، ۰/۰۱) هیچ اثری بر پاسخ آپومرفین نداشت. **نتیجه‌گیری:** هیپوکامپ پشتی نقش مهمی در فراموشی ناشی از کانابینوئیدها داشته و تزریق سه‌روزه آپومرفین ممکن است منجر به حساسیت گیرنده D2 دوپامینی شده و از این طریق در فراموشی ناشی از تحریک گیرنده CB1 اثر گذارد.

کلیدواژه‌ها: کانابینوئیدها، هیپوکامپ، حساسیت‌زایی، آپومرفین، یادگیری، روش اجتنابی مهاري، موش صحرایی

## مقدمه

کانابینوئیدها ترکیبات موجود در گیاه شاهدانه و آنالوگ‌های صنعتی از مشتقات اسیدهای چرب به ویژه اسید آراشیدونیک می‌باشند. آثار کانابینوئیدها عبارتند از کاهش حرکت<sup>۲</sup>، بی‌حرکتی همراه با سفتی<sup>۳</sup>، کاهش دمای بدن<sup>۴</sup>، آثار ضد دردی<sup>۵</sup> در مدل Tail-flick و یا Hot-plate. هزاران سال

است که حشیش و ماری‌جوانا که هر دو از گیاه شاهدانه هندی با نام علمی *sativa cannabis* به دست می‌آیند به علت آثار دارویی و نیز مقلد حالات روانی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. تاکنون دو نوع گیرنده کانابینوئیدی به نام‌های CB1 و CB2 شناسایی شده‌اند. گیرنده CB1 اغلب در سیستم عصبی مرکزی بوده اما در سایر اندام‌ها نیز یافت می‌شود، در حالی که گیرنده

2- hypolocomotion  
4- hypothermia

3- rigid immobility  
5- antinociception

۱- نشانی تماس: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

Email: mo58na@yahoo.com

مزولیمیک به عنوان میانجی گر حساسیت رفتاری ناشی از تزریق مزمن داروهای محرک روانی تأکید دارند (زرین دست و رضایوف، ۲۰۰۴). حساسیت رفتاری به افزایش پاسخ رفتاری در پاسخ به مصرف مزمن مستقیم (آپومرفین و کوپین پیرول) یا غیرمستقیم آگونیست‌های دوپامین اطلاق می‌شود (وزینا<sup>۳۰</sup>، لورراین<sup>۳۱</sup>، آرنولد<sup>۳۲</sup>، یوستین<sup>۳۳</sup> و سیوتو<sup>۳۴</sup>، ۲۰۰۲). پژوهش‌های قبلی ما نشان دادند که تزریق مزمن آپومرفین تعدادی از اثرات رفتاری را به عنوان مثال افزایش فعالیت حرکتی (حیدری، صاحبقرانی، ریاضی و زرین دست، ۲۰۰۶) و مهار ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین (ناصرحی، رستمی، زرین دست و رضایوف، ۱۳۸۵) را باعث می‌شود.

از طرف دیگر هیپوکامپ پشتی (CA1) منطقه‌ای از مغز است که ورودی دوپامینی را از ناحیه تگمنتوم شکمی<sup>۳۵</sup> (VTA) دریافت کرده و دارای گیرنده‌های متفاوت دوپامینی می‌باشد (میدور-ودراف<sup>۳۶</sup>، ۱۹۹۴). لذا با توجه به اینکه بسیاری از اثرات کانابینوئیدها و اپیوئیدها مشابه هم بوده و در پژوهش‌های قبلی ما تزریق مزمن آپومرفین توانسته است اثرات مرفین را تحت تأثیر قرار دهد و این مورد در هیچ پژوهشی با کانابینوئیدها کار نشده است بنابراین در این پژوهش آثار تزریق درون مغزی کانابینوئیدها بر تشکیل حافظه در موش‌های صحرایی در الگوی یادگیری اجتنابی مهاري مورد بررسی گرفت و بعد تأثیر تیمار با آپومرفین بر این حافظه مورد بررسی قرار گرفت.

CB2 فقط در بافت‌های محیطی یافت می‌شود (چاپرون<sup>۱</sup> و تی-بوت<sup>۲</sup>، ۱۹۹۹). گیرنده CB1 به مقدار زیادی در هیپوکامپ (آمری<sup>۳</sup>، ۱۹۹۹) ساختاری که هم در یادگیری (ایزکیوایردو<sup>۴</sup> و مدینا<sup>۵</sup>، ۱۹۹۵) و هم در حافظه (بلیس<sup>۶</sup> و کول لینگریج<sup>۷</sup>، ۱۹۹۳) نقش دارد، عقده‌های قاعده‌ای و مخچه وجود دارد (ویلسون<sup>۸</sup> و نیکول<sup>۹</sup>، ۲۰۰۲). بنابراین بسیاری از آثار عصب‌روان-روان‌شناختی کانابینوئیدهای درون‌زاد توسط گیرنده CB1 میانجی‌گری شده و در تأیید این مطلب تحقیقات گسترده‌ای وجود دارد (دالیورا آلوارز<sup>۱۰</sup> و همکاران، ۲۰۰۵).

مطالعات رفتاری تداخل مستقیم بین کانابینوئیدها و بعضی از سیستم‌های میانجی گر عصبی شامل سیستم‌های دوپامینرژیک (رودریگز و فونسکا<sup>۱۱</sup>، سبیرا<sup>۱۲</sup>، فرناندز-ریوز<sup>۱۳</sup>، ناوارو<sup>۱۴</sup> و راموس<sup>۱۵</sup>، ۱۹۹۱)، سروتونرژیک (مولینا-هولگادو<sup>۱۶</sup>، ایميرو<sup>۱۷</sup>، گنزالس<sup>۱۸</sup>، آلوارز<sup>۱۹</sup> و لرت<sup>۲۰</sup>، ۱۹۹۶)، گاباثرژیک (گارسیا-گیل<sup>۲۱</sup> و همکاران، ۱۹۹۹) و اپیوئیدرژیک (ولا<sup>۲۲</sup> و همکاران، ۱۹۹۸) را پیشنهاد می‌کنند که از طریق این سیستم‌ها تغییر الگوهای رفتاری را باعث شوند (یوروس<sup>۲۳</sup>، لیورنت<sup>۲۴</sup>، مورنو<sup>۲۵</sup> و ماکرو<sup>۲۶</sup>، ۲۰۰۵).

قابل توجه اینکه هر دو گیرنده‌های کانابینوئیدی و اپیوئیدی در غشاء پیش سیناپسی قرار گرفته و منجر به کاهش رهاسازی میانجی‌گرهای عصبی می‌شوند و هر دو سیستم در بسیاری از مناطق مغز اثرات مشابه و هم‌پوشانی<sup>۲۷</sup> دارند، به عنوان مثال مهار آدنیلات سیکلاز، مهار کانال کلسیم، فعال‌سازی کانال پتاسیم و از طرف دیگر پاسخ‌های اپیوئیدها و کانابینوئیدها به ترتیب توسط آنتاگونیست‌های کانابینوئیدها و اپیوئیدها مهار می‌شوند (فاتتور<sup>۲۸</sup> و همکاران، ۲۰۰۵) بنابراین احتمال داده می‌شود سیستم‌های مشابهی در هر دو نقش داشته باشند.

مطالعات گسترده‌ای نقش که مسیر دوپامینرژیک سیستم مزولیمیک را در آثار پاداشی ناشی از مواد و داروهای محرک روانی، مثل کانابینوئیدها نشان داده اند (هرز<sup>۲۹</sup>، ۱۹۹۷). از طرف دیگر بسیاری مطالعات دیگر بر نقش سیستم دوپامینی

- |                            |                         |
|----------------------------|-------------------------|
| 1- Chaperon                | 2- Thiebot              |
| 3- Ameri                   | 4- Izquierdo            |
| 5- Medina                  | 6- Bliss                |
| 7- Collingridge            | 8- Wilson               |
| 9- Nicoll                  | 10- de Oliveira Alvares |
| 11- Rodriguez de Fonseca   | 12- Cebeira             |
| 13- Fernandez-Ruiz         | 14- Navarro             |
| 15- Ramos                  | 16- Molina-Holgado      |
| 17- Amaro                  | 18- Gonzalez            |
| 19- Alvarez                | 20- Leret               |
| 21- Garcia-Gil             | 22- Vela                |
| 23- Viveros                | 24- Llorente            |
| 25- Moreno                 | 26- Marco               |
| 27- overlapping            | 28- Fattore             |
| 29- Herz                   | 30- Vezina              |
| 31- Lorrain                | 32- Arnold              |
| 33- Austin                 | 34- Suto                |
| 35- ventral tegmental area | 36- Meador-Woodruff     |

## روش

در آزمایش‌ها از موش صحرایی نر نژاد ویستار<sup>۱</sup> به وزن تقریبی ۲۵۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. به منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوان‌ها لمس می‌شدند. هر حیوان فقط یک بار استفاده شده و در گروه هشت‌تایی قرار داده می‌شد. همه آزمایش‌ها در طول روز انجام می‌شد.

### دستگاه

دستگاه یادگیری اجتنابی مهارتی (غیرفعال)<sup>۲</sup>، مدل step-through، به وسیله دیواره‌ای به دو قسمت با ابعاد ۲۰×۲۰×۳۰ سانتی‌متر تقسیم می‌شود. درون دیواره بین دو قسمت در کشویی تعبیه شده است. این دستگاه دارای دو بخش سفید و سیاه می‌باشد و در کف دارای میله‌های فولادی با فاصله یک سانتی‌متر بوده، که به دستگاه تحریک کننده متصل می‌شوند

### داروها

بلافاصله قبل از آزمایش‌ها داروهای اپومرفین و SCH23390 در سرم فیزیولوژیک استریل ۰/۹ درصد استریل حل شدند، برای حل کردن سولپیراید علاوه بر سرم از یک قطره اسید استیک گلاسیال استفاده شد (حامل<sup>۳</sup>). داروهای WIN55-212-2 و AM251 در محلول حاملی حل شدند که ۹۰ درصد آن سرم فیزیولوژیک و ۱۰ درصد باقی مانده آن دی‌متیل سولفو کسید بود که سرانجام به محلول فوق یک قطره روغن توئین ۸۰ اضافه می‌شد.

### روش جراحی و کانول‌گذاری در هیپوکامپ پستی (CA1)

حیوان‌ها توسط تزریق درون صفاقی<sup>۴</sup> کتامین و زایلین ۱۰ درصد به میزان (۲ mlit/kg) بیهوش می‌شدند و سپس با استفاده از دستگاه استریوتاکسی و اطلس پاکسینوس<sup>۵</sup> منطقه CA1 هیپوکامپ (V=-۳، ML=±۲، AP=-۳/۲) کانول‌گذاری شد. پس از جراحی و قبل از تزریق درون‌مغزی دارو به حیوان ۵ تا ۷ روز استراحت داده شد.

## آزمون‌های رفتاری

روش اجتنابی مهارتی در دو روز متوالی انجام می‌شود. روز اول یا روز آموزش، روز دوم یا روز آزمون. مرحله آموزش: هر حیوان در بخش روشن دستگاه قرار داده می‌شود، پس از گذشت ۵ ثانیه در کشویی باز شده و بلافاصله بعد از ورود حیوان به خانه سیاه در کشویی بسته می‌شود و بعد از ۱۰ ثانیه حیوان به آرامی به قفس برگردانده می‌شود. پس از گذشت ۳۰ دقیقه حیوان دوباره به بخش سفید منتقل شده و در کشویی باز می‌شود. با ورود حیوان به بخش تاریک، در کشویی بسته شده، حیوان تحریک الکتریکی به شدت یک میلی-آمپر و مدت ۳ ثانیه دریافت می‌کند. ۲۰ ثانیه بعد حیوان به قفس منتقل می‌شود. پس از گذشت دو دقیقه مرحله دوم آموزش تکرار می‌شود و میزان تأخیر ورود حیوان به بخش تاریک دستگاه ثبت می‌گردد. زمان یادگیری موفق ۱۲۰ ثانیه می‌باشد. حداکثر آموزش برای هر موش جهت مشخص کردن میزان عملکرد دستگاه و موش‌ها سه بار در نظر گرفته شد و نتایج آماری در صورتی مورد بررسی قرار گرفتند که بین تعداد آموزش‌ها در روز آموزش هیچ‌گونه تفاوت معناداری وجود نداشته باشد.

مرحله آزمون: حیوان در بخش روشن قرار داده شده، بعد از پنج ثانیه در کشویی باز شده، زمان تأخیر حیوان در ورود به بخش تاریک به عنوان معیار حافظه در نظر گرفته می‌شود. بیشترین مقدار تأخیر برای ورود به بخش تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شود.

### تزریق درون مغزی دارو

برای تزریق دارو از کانولی که یک میلی‌متر بزرگ‌تر از کانول راهنما بود استفاده شد. برای تزریق از سرنگ هامیلتون ۲ میکرولیتر استفاده شد و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو به مدت ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق شد.

1- Wistar  
2- inhibitory (passive) avoidanse apparatus  
3- vehicle  
4- intraperitoneal injection  
5- Paxinos

**بافت شناسی**

پس از کشتن حیوان‌ها با تزریق رنگ متیلن بلو ۱٪ (۱ μl) (۰/۵) به درون هر دو کانول، مغز از درون مجسمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار می‌گرفت. بعد از ده روز مغزها برش داده شدند.

**تجزیه و تحلیل آماری**

به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایش، از روش تحلیل واریانس<sup>۱</sup> یک‌طرفه و آزمون توکی<sup>۲</sup> استفاده گردید. اختلاف در سطح  $p < 0.05$  به عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

**تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده**

**آزمایش اول - اثر تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2**  
بر حافظه اجتنابی مهارتی: گروه اول و دوم بلافاصله پس از آموزش سالیین و حامل، و سه گروه باقیمانده مقادیر مختلف WIN55, 212-25 (۱ μg/rat، ۰/۵، ۰/۲۵) را دریافت کردند.  
**آزمایش دوم - اثر تزریق پس از آموزش AM251**  
حافظه اجتنابی مهارتی: گروه اول بلافاصله پس از آموزش حامل و سه گروه باقی مانده مقادیر مختلف AM251 (۱۰۰ ng/rat) و (۵۰، ۲۵) را دریافت کردند.

**آزمایش سوم - اثر تزریق درون مغزی AM251 بر حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2**: گروه اول بلافاصله پس از آموزش سالیین و چهار گروه باقی مانده مقادیر مختلف AM251 (۱۰۰ mg/rat، ۵۰، ۲۵، ۰) را دریافت کردند. دو دقیقه پس از تزریق اول همه گروه‌ها WIN55, 212-2 (۱ μg/rat) دریافت کردند.

**آزمایش چهارم - اثر تزریق سه‌روزه آپومرفین بر حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2**: حیوانات سالیین (۱ ml/kg) و آپومرفین (۱ mg/kg و ۰/۵، ۰/۲۵) روزانه یک بار، در سه روز متوالی به صورت زیرجلدی دریافت کردند. پنج روز بعد، حیوانات بلافاصله پس از آموزش سالیین (۱ μg/rat) و WIN55, 212-2 (۰/۲۵ μg/rat) را دریافت کردند.

**آزمایش پنجم - اثر تزریق SCH23390 بر بهبود حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2** در موش‌های صحرایی پیش‌تیمار شده با تزریق سه‌روزه آپومرفین: حیوان‌ها سالیین (۱ ml/kg) و SCH23390 (۰/۱ mg/kg و ۰/۰۷، ۰/۰۲، ۰/۰۱) را به صورت زیرجلدی، روزانه، طی سه روز متوالی، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق آپومرفین (۰/۵ mg/kg) دریافت کردند. پس از پنج روز همه حیوان‌ها بلافاصله پس از آموزش WIN55, 212-2 (۱ μg/rat) دریافت کردند.

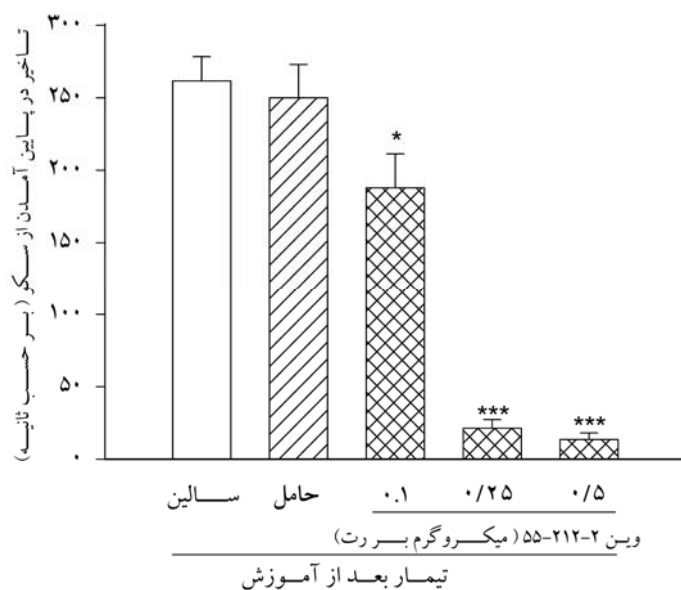
**آزمایش ششم - اثر تزریق سولپیراید بر بهبود حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2** در موش‌های صحرایی پیش‌تیمار شده با تزریق سه‌روزه آپومرفین: چهار گروه حیوانی سالیین (۱ ml/kg) و سولپیراید (۱ mg/rat، ۰/۵، ۰/۲۵) را به صورت زیرجلدی، روزانه، طی سه روز متوالی دریافت کردند. پس از پنج روز همه حیوانات بلافاصله بعد از آموزش WIN55, 212-2 (۱ μg/rat) و سولپیراید (۱ mg/kg و ۰/۵، ۰/۲۵) را دریافت کردند. چهار گروه دیگر حامل (۱ ml/kg) و سولپیراید (۱ mg/kg و ۰/۵، ۰/۲۵) را به صورت زیرپوستی، روزانه، در سه روز متوالی ۳۰ دقیقه قبل از تزریق آپومرفین (۰/۵ mg/kg) دریافت کردند. بعد از پنج روز تمام حیوانات بلافاصله بعد از آموزش WIN55, 212-2 (۰/۲۵ μg/rat) را به صورت درون مغزی دریافت کردند.

**یافته‌ها**

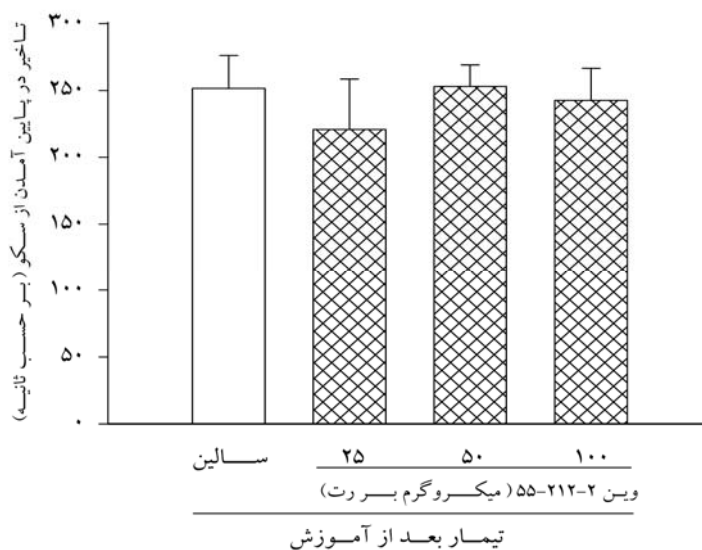
**آزمایش اول - نتایج تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2**  
بر روی حافظه اجتنابی مهارتی: آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 حافظه اجتنابی مهارتی را تغییر می‌دهد [ $p < 0.001$ ،  $F(۴,۳۵)=۷۴/۴۱$ ] (شکل ۱). همچنین در تحلیل واریانس یک‌طرفه بین تعداد آموزش‌ها برای یادگیری در پنج گروه آزمایشی تفاوت معناداری مشاهده نشد [ $p > 0.05$ ،  $F(۴,۳۵)=۰/۱۵$ ].

1- Analysis of Variance (ANOVA)

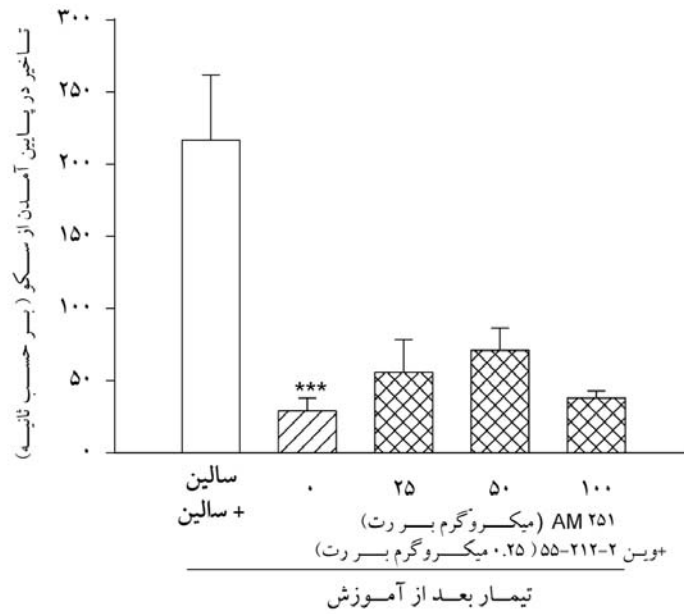
2- Tukey's test



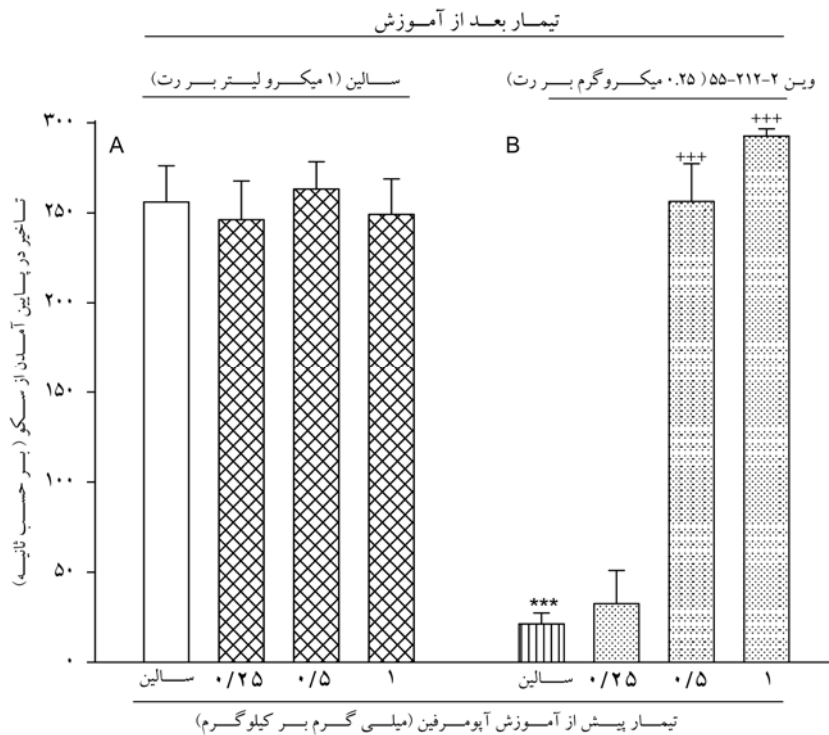
شکل ۱- آثار تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 بر حافظه اجتنابی مهاری.  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه سالیین می‌باشد



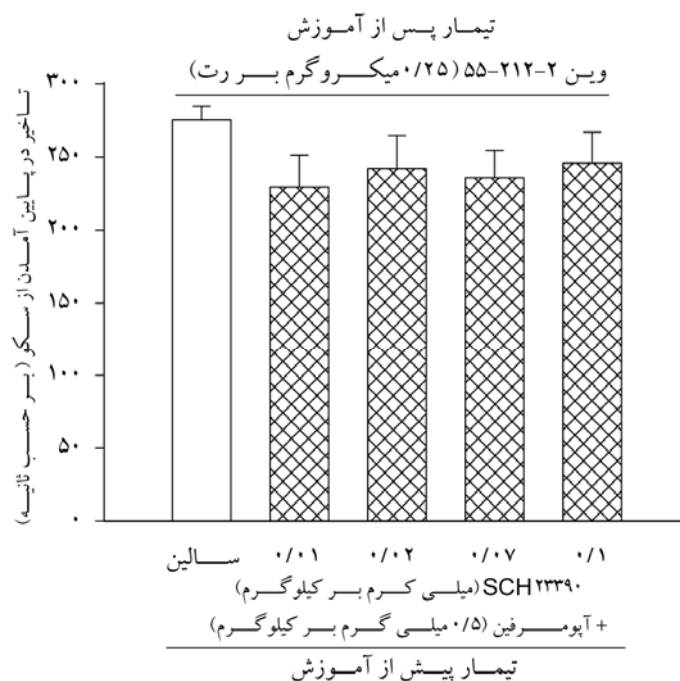
شکل ۲- آثار تزریق پس از آموزش AM251 بر روی حافظه اجتنابی مهاری



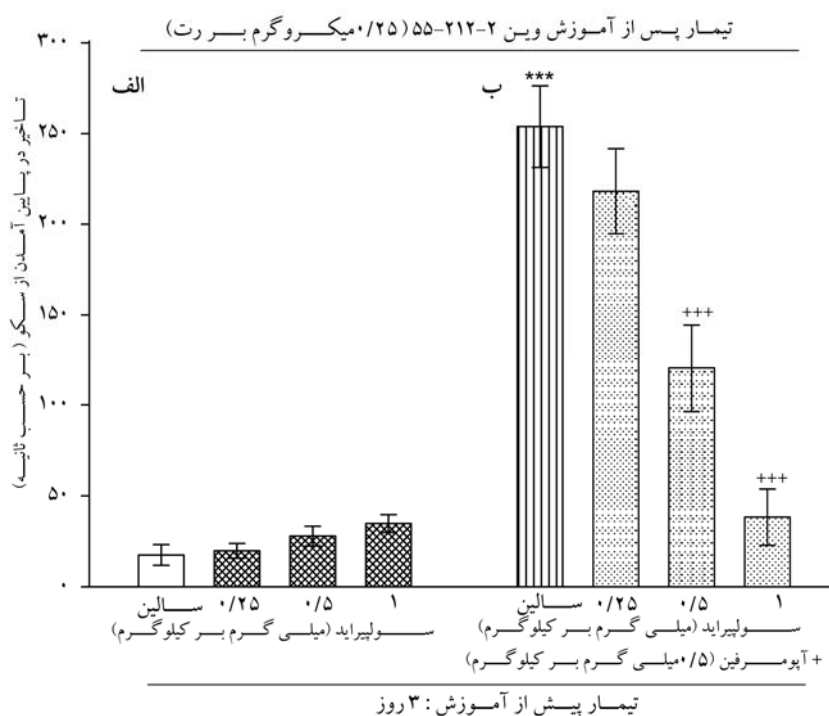
شکل ۳- اثر تزریق AM251 بر حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2 ( $p < 0.001$ ) در مقایسه با گروه سالین می‌باشد.



شکل ۴- اثر تزریق سه روزه آپومورفین بر حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2 ( $p < 0.001$ ) در مقایسه با گروه سالین / سالین و ( $p < 0.001$ ) در مقایسه با گروه سالین / WIN55, 212-2.



شکل ۵- اثر تزریق SCH23390 روی بهبود حافظه خراب شده توسط WIN55, 212-2 در موش‌های صحرائی پیش‌تیمار شده با تزریق سه روزه آپومرفین.



شکل ۶- اثر تزریق سولپیراید روی بهبود حافظه خراب شده توسط WIN55, 212-2 در موش‌های صحرائی پیش‌تیمار شده با تزریق سه روزه آپومرفین  
 $p < 0.001$  در مقایسه با گروه حامل WIN55, 212-2/  $p < 0.001$  و  $p < 0.001$  در مقایسه با گروه حامل + آپومرفین / WIN55, 212-2

تعداد آموزش‌ها تفاوت معناداری را نشان نداد [ $F_{(35,4)}=0/05$ ,  $p>0/05$ ] (شکل ۵).

آزمایش ششم - نتایج تزریق سولپیراید بر روی بهبود حافظه  
تخریب شده توسط WIN55, 212-2 در موش‌های صحرایی پیش‌تیمار شده با تزریق سه‌روزه آپومرفین: تحلیل تعقیبی توکی نشان داد تزریق روزانه سولپیراید طی سه روز متوالی، پنج روز قبل از تزریق داخل مغزی WIN55, 212-2 بر روی حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2 اثر نداشت [ $F_{(28,3)}=2/46$ ] (شکل ۶ الف). همچنین نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که بهبود حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2 در موش‌های صحرایی پیش‌تیمار شده با تزریق سه‌روزه آپومرفین توسط تزریق سولپیراید کاهش پیدا کرد [ $F_{(28,3)}=20/36$ ] (شکل ۶ الف). به علاوه تحلیل واریانس یک‌طرفه بین تعداد آموزش‌ها برای یادگیری در چهار گروه آزمایشی شکل [ $F_{(28,3)}=0/37$ ,  $p>0/05A$ ] یا [ $F_{(28,3)}=0/47$ ,  $p>0/05B$ ] تفاوت معناداری نشان نداد.

## بحث

در این پژوهش آثار تزریق دوطرفه آگونیست (WIN55, 212-2) و آنتاگونیست (AM251) کانابینوئیدی در هیپوکامپ پشتی (CA1) بر روی حافظه موش‌های صحرایی حساس شده با آپومرفین به روش اجتنابی مهارتی (غیرفعال) با استفاده از الگوی دوطرفه بررسی شد. نتایج نشان داد که تزریق درون-مغزی مقادیر مختلف WIN55, 212-2 بلافاصله بعد از آموزش به صورت وابسته به مقدار به کاهش حافظه اجتنابی مهارتی در روز آزمون منجر می‌شود. این نتایج مطابق با یافته-ای دیگر است که بیان می‌کنند تزریق آگونیست گیرنده CB1 به فراموشی منجر می‌شود (دیویس<sup>۱</sup>، پوتو<sup>۲</sup> و ریدل<sup>۳</sup>، ۲۰۰۲). گیرنده‌های CB1 در غشاء پیش‌سیناپسی پایانه‌های آکسونی هستند و فعال شدن آنها به مهار آزادسازی گلوتامات (شن<sup>۴</sup>،

آزمایش دوم - نتایج تزریق پس از آموزش AM251 بر روی حافظه اجتنابی مهارتی: تحلیل تعقیبی توکی نشان داد که تزریق پس از آموزش AM251 هیچ‌گونه اثری بر حافظه نشان نداد [ $F_{(4,35)}=0/44$ ,  $p>0/05$ ] (شکل ۲). همچنین تحلیل واریانس یک‌طرفه بین تعداد آموزش‌ها برای یادگیری در چهار گروه آزمایشی نیز تفاوت معناداری نشان نداد [ $F_{(35,4)}=1/07$ ].

آزمایش سوم - نتایج تزریق درون مغزی AM251 بر حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2: تحلیل تعقیبی توکی نشان داد که تزریق پس از آموزش AM251، ۲ دقیقه قبل از تزریق WIN55, 212-2 اثر تخریبی WIN55, 212-2 بر روی حافظه اجتنابی را مهار نمی‌کند [ $F_{(4,35)}=10/17$ ] (شکل ۳). به علاوه بین تعداد آموزش‌ها برای یادگیری در پنج گروه آزمایشی تفاوت معناداری نشان نداد [ $F_{(4,35)}=1/07$ ,  $p>0/05$ ].

آزمایش چهارم - نتایج تزریق سه‌روزه آپومرفین بر حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2: تحلیل تعقیبی توکی نشان داد تزریق سه‌روزه آپومرفین اثری بر حافظه اجتنابی ندارد [ $F_{(28,3)}=0/41$ ,  $p>0/05$ ] (شکل ۴ الف). همچنین تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که حافظه اجتنابی تخریب شده توسط WIN55, 212-2 در موش‌هایی که تزریق سه‌روزه آپومرفین را دریافت کردند به طور معناداری کاهش یافته است [ $F_{(28,3)}=99/19$ ,  $p<0/001$ ] (شکل ۴ ب). همچنین تحلیل واریانس یک‌طرفه بین تعداد آموزش‌ها برای یادگیری در چهار گروه آزمایشی شکل «الف» [ $F_{(28,3)}=0/60$ ,  $p>0/05$ ] یا «ب» [ $F_{(28,3)}=0/05$ ,  $p>0/05$ ] تفاوت معناداری نشان نداد.

آزمایش پنجم - نتایج تزریق SCH23390 بر روی بهبود حافظه تخریب شده توسط WIN55, 212-2 در موش‌های صحرایی پیش‌تیمار شده با تزریق سه‌روزه آپومرفین: نتایج تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد که بهبود حافظه خراب شده توسط WIN55, 212-2 موش‌های صحرایی پیش‌تیمار شده با تزریق سه‌روزه آپومرفین توسط SCH23390 تغییری نشان نمی‌دهد [ $F_{(35,4)}=0/82$ ,  $p>0/05$ ]. به علاوه تحلیل واریانس یک‌طرفه بین

1- Davies  
3- Riedel

2- Pertwee  
4- Shen



در ادامه آزمایش‌ها مشخص شد که تزریق درون مغزی آنتاگونیست گیرنده AM251, CB1، بلافاصله بعد از آموزش هیچ گونه اثری بر روی حافظه نداشته و این مطابق با نتایج محققین دیگر می‌باشد (دا<sup>۴۴</sup> و تاکاهاشی<sup>۴۵</sup>، ۲۰۰۲). هرچند نتایجی دال بر افزایش بهبودی حافظه متعاقب مصرف AM251 وجود است (تاکاهاشی، پامپلونا<sup>۴۶</sup> و فرناندز<sup>۴۷</sup>، ۲۰۰۵). احتمالاً نتایج گزارش شده به دنبال مصرف سیستمیک AM251 بوده و تناقض مشاهده شده در نتیجه گزارش‌ها به علت توزیع غیرمتعادل گیرنده CB1 در سیستم عصبی مرکزی بوده (داولیورا آلوارز و همکاران، ۲۰۰۵) و برای مشخص کردن نقش واقعی AM251 در مناطق مختلف مغز باید فنون هیستوشیمی، الکتروفورز و همچنین رفتاری در هسته‌های مختلف به طور جداگانه صورت گیرد.

در آزمایش دیگر آثار تزریق درون مغزی مقادیر مختلف AM251 بر روی تخریب حافظه توسط WIN55, 212-2 بررسی شد. نتایج ما نشان داد که تزریق درون مغزی مقادیر مختلف AM251 بلافاصله بعد از آموزش و دو دقیقه قبل از تزریق درون مغزی مقدار مؤثر WIN55, 212-2 قادر به مهار کردن پاسخ مهاری القا شده توسط WIN55, 212-2 نیست. بنابراین یک پیشنهاد مطرح می‌کند که احتمالاً مکانیسم دیگری غیر از گیرنده CB1 در کاهش حافظه ناشی از WIN55, 212-2 دخالت دارد.

پسر<sup>۱</sup>، سیبولد<sup>۲</sup> و تایر<sup>۳</sup> (۱۹۹۶)، استیل کولین (گیفورد<sup>۴</sup>، سامین<sup>۵</sup>، کاتلی<sup>۶</sup> و اشبی<sup>۷</sup>، ۱۹۹۷) و نورآدرنالین (شلیکر<sup>۸</sup>، تیم<sup>۹</sup>، زنتنر<sup>۱۰</sup> و گوترت<sup>۱۱</sup>، ۱۹۹۷) در سلول‌های کشت داده شده هیپوکامپ موش صحرایی منجر می‌شود. کاهش رهائش میانجی‌های عصبی و مهار تقویت طولانی مدت<sup>۱۲</sup> (LTP) در هیپوکامپ به علت مهار آنزیم آدنیلات سیکلاز و کانال‌های کلسیمی نوع N به دنبال تحریک گیرنده CB1 می‌باشد (امری، ۱۹۹۹). احتمالاً WIN55, 212-2 از طریق یک یا چند مکانیسم زیر باعث کاهش حافظه می‌شود: (۱) گیرنده‌های CB1 در غشاء پیش‌سیناپسی پایانه‌های آکسونی نورون‌های گابائثرژیک به کاهش آزادسازی گابا منجر شده، این امر باعث فعالیت بیش از حد نورون‌ها شده، تداخل نورونی به وجود می‌آید (هرو<sup>۱۳</sup> و اورلند<sup>۱۴</sup>، ۱۹۹۳). (۲) کاهش رهائش گابا به موازات کاهش رهائش کوله‌سیستو کینین<sup>۱۵</sup> است. (هرو و اورلند، ۱۹۹۳). مطالعات گسترده‌ای نشان می‌دهند که مهار کردن گیرنده کوله-سیستو کینین به خرابی حافظه منجر می‌شود (اکیوس<sup>۱۶</sup>، پیسانو<sup>۱۷</sup>، ماروکو<sup>۱۸</sup> و دی‌چیارا<sup>۱۹</sup>، ۲۰۰۰). (۳) تحریک گیرنده CB1 به تعدیل در رهائش میانجی‌های عصبی دیگر در هیپوکامپ به عنوان مثال دوپامین (نیوا<sup>۲۰</sup>، کارتا<sup>۲۱</sup>، باتاسی<sup>۲۲</sup> و جیسا<sup>۲۳</sup>، ۲۰۰۰) و استیل کولین منجر شده، رهائش ممکن است بیشتر یا کمتر شود (کاتمن<sup>۲۴</sup>، وبر<sup>۲۵</sup> و چلیکر<sup>۲۶</sup>، ۲۰۰۱). (۴) فعال شدن گیرنده CB1 احتمالاً از طریق مهار انتقال تحریکی باعث تخریب حافظه می‌شود (پونتیرو<sup>۲۷</sup>، کونتی<sup>۲۸</sup>، زوکچی<sup>۲۹</sup>، فیسچی<sup>۳۰</sup> و اوزی<sup>۳۱</sup>، ۱۹۹۹). (۵) تزریق حاد مواد کانابینوئیدی در هیپوکامپ فعالیت عمومی نورون‌ها را کاهش می‌دهد (بلوم<sup>۳۲</sup>، تریشنر<sup>۳۳</sup>، فولر<sup>۳۴</sup> و استین<sup>۳۵</sup>، ۱۹۹۷). (۶) مصرف طولانی مدت کانابینوئیدها در هیپوکامپ به سمیت نورونی (چن<sup>۳۶</sup>، هیندس<sup>۳۷</sup>، ایمپی<sup>۳۸</sup> و استورم<sup>۳۹</sup>، ۱۹۹۸) یا کاهش تعداد سیناپس‌ها و سلول‌ها منجر می‌شود (لاوستون<sup>۴۰</sup>، بورل<sup>۴۱</sup>، راینسون<sup>۴۲</sup> و ویتاکر-آزمیتیا<sup>۴۳</sup>، ۲۰۰۰). تعیین نقش واقعی این مکانیسم‌ها در تخریب حافظه نیازمند تحقیقات بیشتری هم مولکولی و هم رفتاری دارد.

1- Piser	2- Seybold
3- Thayer	4- Gifford
5- Samiian	6- Gatley
7- Ashby	8- Schlicker
9- Timm	10- Zentner
11- Gothert	12- long term potential
13- Harro	14- Oreland
15- Colecystokinine (CCK)	16- Acquas
17- Pisanu	18- Marrocu
19- Di Chiara	20- Nava
21- Carta	22- Battasi
23- Gessa	24- Kathmann
25- Weber	26- Schlicker
27- Pontieri	28- Conti
29- Zocchi	30- Fieschi
31- Orzi	32- Bloom
33- Tershner	34- Fuller
35- Stein	36- Chan
37- Hinds	38- Impey
39- Storm	40- Lawston
41- Borella	42- Robinson
43- Whitaker-Azmitia	44- Da
45- Takahashi	46- Pamplona
47- Fernandes	

بیان می‌دارند مصرف مکرر آگونیست گیرنده دوپامین، آپومرفین، به حساسیت گیرنده دوپامین منجر می‌شود (ناصری و همکاران، ۱۳۸۵).

در مطالعه بعدی برای نشان دادن نقش گیرنده دوپامینی در پاسخ حساسیتی از آنتاگونیست‌های گیرنده‌های دوپامینی D1 و D2 استفاده کردیم. نتایج ما نشان داد که تزریق آنتاگونیست گیرنده D1، SCH23390، ۱۵ دقیقه قبل از تزریق آپومرفین بهبودی حافظه القا شده توسط آپومرفین اثری ندارد. همچنین نتایج ما نشان داد که تزریق آنتاگونیست گیرنده D2 دوپامینی، سولپیراید، روزانه یک بار، به تنهایی قادر به تغییر فراموشی ناشی از WIN55, 212-2 نیست. در عوض بهبودی حافظه ایجاد شده به وسیله WIN55, 212-2 در موش‌های صحرایی که توسط آپومرفین تیمار شده، به دنبال تزریق سولپیراید ۳۰ دقیقه قبل از تزریق آپومرفین کاهش یافت. در مجموع نتایج ما نشان می‌دهند تزریق پس از آموزش WIN55, 212-2 منجر به تخریب حافظه شده و احتمالاً تنظیم مثبت گیرنده D2 دوپامینی توسط تزریق سه روزه آپومرفین در بهبود حافظه خراب شده توسط WIN55, 212-2 نقش دارد و در آخر این نتایج خیلی شبیه به نتایج حاصل از کار مشابه بر روی اپیوئیدها بوده و تشابه عملکردی این دو سیستم را بیان می‌کنند.

## سپاسگذاری

نگارندگان لازم می‌دانند که از آقای دکتر مرتضی پیری به دلیل ارائه نظرات و پیشنهادهای سازنده تقدیر و تشکر نمایند.

دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۵/۲۵ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۸/۱۶

- |            |                      |
|------------|----------------------|
| 1- Hoffman | 2- Lupica            |
| 3- Nguyen  | 4- Abel              |
| 5- Kandel  | 6- Keababian         |
| 7- Calne   | 8- Nucleus Accumbens |
| 9- Kalivas | 10- Duffy            |

در تأیید این موضوع مطالعات دیگری بیان کننده وجود احتمال گیرنده کانابینوئیدی جدیدی است که آنتاگونیست انتخابی CB1 بر روی آن اثری ندارد. (هافمن<sup>۱</sup> و لویپکا<sup>۲</sup>، ۲۰۰۰) و نیاز به مطالعات مولکولی بیشتری برای شناسایی آن وجود دارد.

هیپوکامپ یکی از مناطق مهم مغز است که در یادگیری و حافظه نقش مهمی را بر عهده دارد (نگیوین<sup>۳</sup>، ایبل<sup>۴</sup> و کاندل<sup>۵</sup>، ۱۹۹۴). به علاوه ناحیه CA1 هیپوکامپ جزء مناطقی از مغز است که ورودی‌های دوپامینی را از ناحیه تگمنتوم شکمی (VTA) دریافت می‌کند. براساس مطالعات بیوشیمی و فارماکولوژی هر دو نوع گیرنده دوپامینی D1 و D2 در ناحیه CA1 هیپوکامپ شناسایی شده که گیرنده D1 محرک ساخته شدن آدنیلات سیکلاز و گیرنده D2 مهار کننده آن می‌باشند (کبابین<sup>۶</sup> و کالن<sup>۷</sup>، کالن<sup>۷</sup>، ۱۹۷۹).

بر اساس مطالعات قبلی، افزایش حساسیت گیرنده‌های پس-سیناپسی D1 و D2 دوپامینی یا کاهش حساسیت گیرنده‌های اتورسپتوری D2 دوپامینی ممکن است در بروز حساسیت رفتاری نقش داشته باشند. هر دو مورد مذکور در هسته‌های آکومبنس<sup>۸</sup> و تگمنتوم شکمی مشاهده شده است (کالیواس<sup>۹</sup> و دافی<sup>۱</sup>، ۱۹۹۳). هم چنین مطالعات قبلی ما گزارش می‌کنند که تزریق تحت مزمن آپومرفین حساسیت گیرنده‌های دوپامین را تغییر می‌دهد (زرین دست، اعظمی، رستمی و رضایوف، ۲۰۰۶).

در این مطالعه حساسیت آپومرفین (آگونیست گیرنده D1 و D2 دوپامینی) متعاقب تزریق سه‌روزه آپومرفین و پنج روز قطع آن به دست آمد. نتایج نشان می‌دهند که خرابی حافظه القا شده از طریق تزریق درون مغزی WIN55, 212-2 به طور معناداری در موش‌های حساس شده توسط آپومرفین کاهش پیدا کرده است. این موضوع بیانگر این می‌باشد که ممکن است فراموشی القا شده توسط WIN55, 212-2 در ناحیه CA1 در موش‌هایی که توسط آپومرفین تیمار شده‌اند تغییر کند. بنابراین تزریق مکرر آپومرفین به افزایش حافظه منجر شده، این اثر ممکن است به علت این باشد که حساسیت القا شده توسط آپومرفین بر فرآیند حافظه در ناحیه CA1 تأثیر دارد. این نتایج مطابق با نتایج قبلی می‌باشد که

منابع

ناصری، م.، رستمی، پ.، زرین دست، م.، و رضایوف، آ. (۱۳۸۵). تغییر حساسیت گیرنده D1 دوپامینی در ناحیه پستی هیپوکامپ (CA1) و تأثیر آن بر روی ترجیح مکان شرطی شده ناشی از مرفین (CPP). فصلنامه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، ۱(۱)، ۴۵-۵۲.

Acquas, E., Pisanu, A., Marrocu, P., & Di Chiara, G. (2000). Cannabinoid CB1 receptor agonists increase rat cortical and hippocampal acetylcholine release in vivo. *European journal of pharmacology*, 401(2), 179-185.

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

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

Bloom, A. S., Tershner, S., Fuller, S. A., & Stein, E. A. (1997). Cannabinoid-induced alterations in regional cerebral blood flow in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 57, 625-631.

Chan, G. C., Hinds, T. R., Impey, S., & Storm, D. R. (1998). Hippocampal neurotoxicity of Delta <sup>9</sup>-tetrahydrocannabinol. *Journal of Neuroscience*, 18, 5322-5332.

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

Da, S., & Takahashi, R. N. (2002). SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 26, 321-325.

Davies, S. N., Pertwee, R. G., & Riedel, G. (2002). Functions of cannabinoid receptors in the hippocampus. *Neuropharmacology*, 42, 993-1007.

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

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

Garcia-Gil, L., de Miguel, R., Romero, J., Perez, A., Ramos, J. A., & Fernandez-Ruiz, J. J. (1999). Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure augmented the

magnitude of motor inhibition caused by GABA(B), but not GABA(A), receptor agonists in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 21, 277-283.

Gifford, A. N., Samiian, L., Gatley, S. J., & Ashby, Jr. C. R. (1997). Examination of the effect of the cannabinoid receptor agonist, CP 55,940, on electrically evoked transmitter release from rat brain slices. *European journal of pharmacology*, 324, 187-192.

Harro, J., & Oreland, L. (1993). Cholecystokinin receptors and memory: A radial maze study. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 44, 509-517.

Heidari, P., Sahebgharani, M., Riazi, G., & Zarrindast, M. R. (2006). Influence of morphine and dopamine receptor sensitization on locomotor activity in mice. *Pharmacology*, 78(4), 185-92.

Herz, A., (1997). Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology*, 129, 99-111.

Hoffman, A. F., & Lupica, C. R. (2000). Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA-A synaptic transmission in the hippocampus. *Journal Neuroscience*, 20, 2470-2479.

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

Kathmann, M., Weber, B., & Schlicker, E. (2001). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice. *Naunyn-*

*Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 363, 50-56.

Kalivas, P. W., & Duffy, P. (1993). Time course of extracellular dopamine and behavioral sensitization to cocaine. II. Dopamine perikarya. *Journal of Neuroscience*, 13(1), 276-284.

Kebabian, J. W., & Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277 (5692), 93-96.

Lawston, J., Borella, A., Robinson, J. K., & Whitaker-Azmitia, P. M. (2000). Changes in hippocampal morphology following chronic treatment with the

- synthetic cannabinoid WIN 55,212-2. *Brain Research*, 877, 407-410.
- Meador-Woodruff, J. H. (1994). Update on dopamine receptors. *Annals of Clinical Psychiatry*, 6, 79-90.
- Molina-Holgado, F., Amaro, A., Gonzalez, M. I., Alvarez, F.J., & Leret, M. L. (1996). Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *European Journal of Pharmacology*, 316, 39-42.
- Nava, F., Carta, G., Battasi, A. M., & Gessa, G. L. (2000). D(2) dopamine receptors enable delta(9)-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *British Journal of Pharmacology*, 130, 1201-1210.
- Nguyen, P. V., Abel, T., & Kandel, E. R. (1994). Requirement of a critical period of transcription for induction of a late phase of LTP. *Science*, 265, 1104-1107.
- Pontieri, F. E., Conti, G., Zocchi, A., Fieschi, C., & Orzi, F. (1999). Metabolic mapping of the effects of WIN 55212-2 intravenous administration in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 21, 773-776.
- Rodriguez de Fonseca, F., Cebeira, M., Fernandez-Ruiz, J. J., Navarro, M., & Ramos, J. A. (1991). Effects of pre- and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience*, 43, 713-723.
- Schlicker, E., Timm, J., Zentner, J., & Gothert, M. (1997). Cannabinoid CB1 receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 356, 583-589.
- Shen, M., Piser, T. M., Seybold, V. S., & Thayer, S. A. (1996). Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures. *Journal Neuroscience*, 16, 4322-4334.
- Takahashi, R. N., Pamplona, F. A., & Fernandes, M. S. (2005). The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neuroscience Letters*, 380, 270-275.
- Vela, G., Martin, S., Garcia-Gil, L., Crespo, J. A., Ruiz-Gayo, M., Javier Fernandez-Ruiz, J., Garcia-Lecumberri, C., Pelaprat, D., Fuentes, J. A., Ramos, J. A., & Ambrosio, E. (1998). Maternal exposure to delta9-tetrahydrocannabinol facilitates morphine self-administration behavior and changes regional binding to central mu opioid receptors in adult offspring female rats. *Brain Research*, 807, 101-109.
- Vezina, P., Lorrain, D. S., Arnold, G. M., Austin, J. D., & Suto, N. (2002). Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity promotes the pursuit of amphetamine. *Journal Neuroscience*, 22, 4654-4662.
- Viveros, M. P., Llorente, R., Moreno, E., & Marco, E. M. (2005). Behavioural and neuroendocrine effects of cannabinoids in critical developmental periods. *Behavioural Pharmacology*, 16, 353-362.
- Wilson, R. I., & Nicoll, R. A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science*, 296, 678-682.
- Zarrindast, M. R., Azami, B. N., Rostami, P., & Rezayof, A. (2006). Repeated administration of dopaminergic agents in the nucleus accumbens and morphine-induced place preference. *Behavioural Brain Research*, 169, 248-255.
- Zarrindast, M. R., & Rezayof, A. (2004). Morphine state-dependent learning: Sensitization and interactions with dopamine receptors. *European Journal of Pharmacology*, 497, 197-204.