

## اثر تنظیمی آگونیست گیرنده 5-HT<sub>4</sub> بر حافظه ترس در هیپوکامپ پستی موش کوچک آزمایشگاهی

مریم فرهی زاده<sup>۱\*</sup>، محمدرضا زرین دست<sup>۲</sup>، محمد ناصحی<sup>۳</sup>، مریم بناج<sup>۱</sup>

۱) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران

۲) پژوهشکده علوم شناختی تهران، ایران

۳) گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانسار، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۰

تاریخ دریافت: ۹۳/۱/۳۱

### چکیده

**مقدمه:** RS67333 آگونیست انتخابی گیرنده ۴ سیستم سروتونرژیک (5-HT<sub>4</sub>) و ACPA (Arachidonylcyclopropylamide) آگونیست انتخابی گیرنده ۱ سیستم کانابینرژیک (CB1) می باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر تزریق دو طرفه RS67333 در هیپوکامپ پستی (CA1)، بر فرایند تشکیل حافظه ترس القاء شده توسط ACPA در موش های کوچک آزمایشگاهی نر بالغ بوده است.

**مواد و روش ها:** ۱۲۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI در محدوده وزنی ۲۸-۲۳ گرم در گروه های کنترل و تجربی در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. برای این منظور، از روش شرطی شدن ترس توسط دستگاه شرطی سازی ترس (Fear conditioning) استفاده شد و ۲۴ ساعت پس از آموزش حافظه حیوان مورد بررسی قرار گرفت.

**یافته های پژوهش:** تزریق درون صفاقی ACPA (۰/۵، ۰/۰۵، ۰/۰۰۵ mg/kg) باعث تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گردید. به علاوه، تزریق درون مغزی RS67333 (۰/۵، ۰/۰۵، ۰/۰۰۵ μg/mouse) نیز در بالاترین دوز انتخابی، تخریب حافظه ترس و فراموشی را به دنبال داشت. اما تزریق هم زمان دوز بی اثر RS67333 (۰/۰۰۵ μg/mouse) با تمام دوز های ACPA، سبب تشدید تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گردید. (P<0.05) **بحث و نتیجه گیری:** سیستم سروتونرژیک (آگونیست 5-HT<sub>4</sub>) ناحیه CA1 در تخریب حافظه ترس القاء شده با ACPA اثر می گذارد

واژه های کلیدی: سیستم کانابینرژیک، هیپوکامپ پستی، سیستم سروتونرژیک، RS67333، دستگاه شرطی سازی ترس

\* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ایران

Email: m.farrahi-zadeh@gmail.com

و... است. سروتونین نقش مهمی در فرآیندهای شناختی دارد و انتقال عصبی سروتونین در برخی فرآیندهای یادگیری، ثبت حافظه و تنظیم آن مورد نیاز است، (۸،۹). مطالعات رفتاری تداخل مستقیم بین کانابینوئیدها و بعضی از سیستم های میانجی گر عصبی شامل سیستم های دوپامینرژیک، سروتونرژیک، گابانرژیک و اپیوئیدرژیک را پیشنهاد می کنند. به طوری که آگونیست گیرنده CB1 موجب کاهش آزادسازی سروتونین، آدرنالین و دوپامین می شود، (۱۴-۱۰). هیپوکامپ به ویژه ناحیه پستی هیپوکامپ (CA1) از مهم ترین بخش های مغز مهره داران مخصوصاً پستانداران است و نقش مهمی در تبدیل حافظه کوتاه مدت به بلند مدت، حافظه فضایی و نیز جهت یابی دارد. آسیب به این ناحیه منجر به اختلالات جدی در عملکرد حافظه از جمله ایجاد فراموشی، آلزایمر و دیگر مشکلات حافظه ای خواهد شد، (۱۵). با توجه به مطالب گفته شده و پژوهش های صورت گرفته، به بررسی سیستم سروتونرژیک CA1 (آگونیست گیرنده ۴) بر فراموشی ترس ناشی از ACPA با استفاده از متد شرطی سازی ترس پرداخته شد که تا کنون چنین بررسی انجام نگرفته است.

#### مواد و روش ها

در این پژوهش موش های کوچک آزمایشگاهی نر نژاد NMRI در ۱۲ گروه ۱۰ تایی (کنترل و تجربی) در محدوده وزنی ۲۸-۲۳ گرم و محدوده سنی ۲ ماه مورد مطالعه قرار گرفتند. حیوانات در شرایط آزمایشگاهی کنترل شده با دوره روشنایی- تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ۷ صبح) و دمای  $22 \pm 2$  سانتی گراد نگهداری می شدند. آب و غذا به جز در هنگام جراحی و آزمایش ها، به طور کامل در اختیار حیوانات قرار داده می شد. در هر گروه ۱۰ حیوان و از هر حیوان تنها یک بار استفاده شد. به منظور جلوگیری از تنش کار، هر روز حیوان ها لمس می شدند. همه تست ها در روز بین ساعات ۹ الی ۱۵ در اتاق با نور کم انجام گرفت. تمام حیوانات متعلق به حیوانخانه پژوهشکده علوم شناختی بوده و همه آزمایش ها نیز در آزمایشگاه این پژوهشکده انجام گرفت.

دستگاه: دستگاه fear conditioning شامل جعبه ای به ابعاد ۵۵×۵۳×۶۷ می باشد. دیواره های داخلی جعبه توسط صفحات آکوستیک پوشیده شده است. 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 تولید کننده صوت نصب شده است، متصل می

پاک سازی خاطرات را به طور کلی می توان مقوله ای درمانی به شمار آورد. بسیاری از مردم از عوارض تجربه ها و خاطرات ناگوار خود مدام در رنج و عذابند و در آن ها ناراحتی های روانی مزمن ایجاد می شود. در حال حاضر، معمول ترین کاری که برای تسکین دردهای این گروه از مردم از دستمان بر می آید، روان درمانی و تجویز آرام بخش است. طبیعی است که بهترین مرهم برای چنین دردهایی آن است که از ریشه، آن ها را براندازد. یعنی آن که این تصورات ترسناک را به طور کلی از ذهن ها بزاید، (۱)، البته تا رسیدن به این هدف و کاربردی کردن آن، مطالعات بسیاری لازم است، و این موضوع باید از زوایای مختلف مورد بررسی قرار گیرد، اما به هر حال دانشمندان علوم اعصاب تا کنون به دستاوردهای بسیار ارزنده ای در این زمینه دست یافته اند.

کانابینوئیدها ترکیبات موجود در گیاه ماری جوانا و از مشتقات اسیدهای چرب به ویژه اسیدآراشیدونیک می باشند. آثار کانابینوئیدها عبارتند از کاهش حرکت، بی حرکتی همراه با سفتی، کاهش دمای بدن، آثار ضددردی و غیره. هزاران سال است ماری جوانا که از گیاه شاهدانه (Cannabis) به دست می آید (از گونه شاهدانه آمریکای مرکزی با نام علمی *Cannabis sativa*) به علت آثار دارویی و نیز مقلد حالات روانی مورد استفاده قرار گرفته است، (۲)، تاکنون سه نوع گیرنده کانابینوئیدی به نام های CB1، CB2 و CB3 شناسایی شده اند. گیرنده های CB1 به مقدار زیاد در بخش های مختلف سیستم عصبی مرکزی، مانند قشر مغز، عقده های قاعده ای، آمیگدال و تشکیلات هیپوکامپ که نقش اساسی در حافظه و یادگیری دارند، بیان می شود، اما به مقدار کم در بافت های محیطی نیز یافت می شود، در حالی که گیرنده های CB2 بیشتر در سلول های ایمنی محیطی بیان می شوند و بیان آن در سیستم عصبی مرکزی بسیار کمتر است، (۳-۵). مطالعات گسترده نشان داده است که سروتونین (۵- هیدروکسی تریپتامین) ماده شیمیایی مهمی در مغز است که به عنوان نوروترانسمیتر شناخته می شود. بسیاری از فعالیت های بدن، از جمله حالات روحی، بدون مقدار کافی سروتونین، تحت تأثیر قرار می گیرند، (۶،۷). سروتونین مسئول کنترل فعالیت های فیزیولوژیک بسیاری از جمله: ۱- خواب ۲- تعدیل حالات و رفتارهای روانی ۳- اشتها ۴- حافظه ۵- فعالیت های جنسی ۶- تحریک حرکات دودی روده ۷- آزاد شدن پلاکت در طی فرایند انعقاد خون

سازی با ابعاد ۲۵×۲۵×۲۵ درون جعبه آکوستیک قرار می گیرد. در کف این جعبه میله های موازی

باشد. یک لامپ با نور ۲۴ وات در گوشه ای از جعبه نصب گردیده است. جعبه شرطی

شکل شماره ۱. دستگاه Fear conditioning جهت سنجش حافظه ترس شرطی شده



دستگاه مذکور ساخت شرکت برج صنعت ایران می باشد. تصویر دستگاه در شکل شماره ۱ مشاهده می شود.

از جنس استیل با قطر ۰/۳ cm و به فاصله موازی ۱ cm قرار دارد که به دستگاه شوکر متصل است.

جدول شماره ۱. داروهای مصرفی در پژوهش و دسته های دارویی مربوطه

نام دارو	دسته دارویی
ACPA	آگونیست گیرنده CB1 سیستم کانابینرژیک
RS67333	آگونیست گیرنده 5-HT4 سیستم سروتونرژیک

می باشند.

روش جراحی و کانول گذاری در هیپوکامپ پستی: حیوانات با محلول رقیق شده کتامین و زایلازین به نسبت ۲ به ۱ بیهوش می شدند و جهت تعبیت و مختصات برداری در دستگاه استرنوتاکی قرار می گرفتند. با استفاده از اطلس پاکسینوس محل کانول گذاری (هیپوکامپ پستی ۲ طرفه)

داروهای مصرفی و طرز تهیه محلول های دارویی

همه داروهای مصرفی در سالیین حل شدند و بعد از حل شدن، دور از نور و در ظرف های مخصوص، درون فریزر (دمای حدود ۴-) نگهداری می شدند. بالاترین و غلیظ ترین دوز به عنوان دوز مادر تهیه و دوزهای رقیق تر از آن ساخته شدند. همه دارو ها ساخت شرکت آمریکایی Toctris

مشخص شد. سپس با استفاده از سیمان دندان پزشکی، کانول‌ها بر روی جمجمه تثبیت می‌گردند.

ML = ±2 mm (از خط وسط)

DV = -2/1 mm (از سطح جمجمه)

پس از بهبودی محل جراحی (۷-۵ روز پس از کانول گذاری)، تزریق دارو و آموزش به حیوان آغاز شد.

آزمون‌های رفتاری: سنجش حافظه به روش fear conditioning در دو روز متوالی انجام شد. روز اول مرحله آموزش، روز دوم مرحله آزمون.

مرحله آموزش (روز اول): ابتدا حیوان را به مدت ۲ دقیقه در اتاقک شرطی سازی نگه داشتیم تا به محیط انس بگیرد. سپس حیوان به مدت ۳۰-۲۸ ثانیه در معرض صدا و تزریق درون صفاقی و درون مغزی دارو: برای تزریق داروی درون صفاقی (IP) (ACPA) از سرنگ انسولین ۱ سی سی استفاده شد. به ازای هر گرم وزن حیوان 0.01 cc داروی درون صفاقی تزریق گردید. برای تزریق داروی درون مغزی (ICV) (RS67333) از طریق کانول راهنما، از سرنگ همیلتون ۲ میکرولیتر استفاده شد و در هر کانول ۰/۵ میکرولیتر دارو به مدت ۹۰-۶۰ ثانیه تزریق شد.

بافت شناسی: حیوان‌ها پس از کشته شدن توسط تنفس مقدار اندکی کلروفورم و تزریق رنگ متیلن بلو (۱ درصد) ۰/۵ به درون هر کانول، مغز از درون جمجمه بیرون آورده شده و درون فرمالین ۱۰ درصد قرار گرفت. پس از یک هفته با استفاده از دستگاه ویبرواسلایس برش‌هایی تهیه شد و محل ورود کانول به مغز به وسیله میکروسکوپ لوپ مورد مطالعه قرار گرفت. جهت مطالعه مقاطع بافتی تهیه شده، از اطلس پاکسینوس استفاده شد. پس از کسب اطمینان از محل قرارگیری کانول‌ها در نواحی مورد نظر، اطلاعات حاصل از حیوان مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور تعیین وجود اختلاف معنادار بین گروه‌های آزمایش، از روش تحلیل واریانس یک طرفه و دوطرفه و آزمون توکی استفاده گردید. اختلاف در سطح  $P \leq 0.05$  به عنوان تفاوت معنادار در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار sigma plot 10 و برای انجام محاسبات آماری از نرم افزار SPSS 19 استفاده شد.

گروه‌های مورد آزمایش: در هر آزمایش چهار گروه موش (هر گروه شامل ۱۰ سر موش کوچک آزمایشگاهی) مورد استفاده قرار گرفت. تمامی گروه‌ها تحت جراحی مغز قرار گرفتند.

مختصات ناحیه CA1:

AP = -۳/۲ mm (از نقطه برگما)

بلافاصله پس از آن به مدت ۲ ثانیه تحت تأثیر شوک قرار گرفت و ۱۰ ثانیه پس از دریافت آخرین شوک حیوانات را از اتاق خارج و به حیوان خانه منتقل نمودیم.

مرحله آزمون (روز دوم): انجام آزمون ۲۴ ساعت پس از مرحله آموزش صورت گرفت. آزمون ۲ مرحله داشت. حیوان به مدت ۵ دقیقه بدون صدا و شوک درون اتاقک شرطی سازی قرار گرفت و پس از یک ساعت حیوان به مدت ۳ دقیقه درون اتاقک شرطی سازی در معرض صدا قرار گرفت. از Freezing time در این ۲ مرحله به عنوان معیاری برای سنجش یادگیری و حافظه استفاده شد.

آزمایش اول: بررسی اثر ACPA بر حافظه ترس: گروه اول (به عنوان گروه کنترل) سالیین را ۱۵ دقیقه پیش از آموزش، و گروه‌های دوم و سوم و چهارم هر یک ACPA را به ترتیب با دوزهای (۰/۰۵، ۰/۰۵، ۰/۰۰۵ mg/kg) به صورت درون صفاقی و هر چهار گروه ۵ دقیقه پیش از آموزش، ۰/۵ μl/side (۱ μl/mouse) سالیین را به صورت تزریق درون CA1 دریافت کردند.

آزمایش دوم: بررسی اثر RS67333 بر حافظه ترس: هر چهار گروه ۱۵ دقیقه پیش از آموزش سالیین را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. گروه اول (به عنوان گروه کنترل) ۵ دقیقه پیش از آموزش سالیین و گروه‌های دوم، سوم و چهارم هر یک RS67333 را به ترتیب با دوزهای (۰/۰۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۵ μg/mouse) ۰/۵ μl/side (۱ μl/mouse) به صورت تزریق درون CA1 دریافت کردند.

آزمایش سوم: بررسی اثر RS67333 بر حافظه ترس القاء شده توسط ACPA: گروه اول (به عنوان گروه کنترل)، سالیین را ۱۵ دقیقه پیش از آموزش به صورت درون صفاقی و ۵ دقیقه پیش از آموزش، ۰/۵ μl/side (۱ μl/mouse) سالیین را به صورت تزریق درون CA1 دریافت کردند و گروه‌های دوم، سوم و چهارم هر یک ۱۵ دقیقه پیش از آموزش، ACPA را به ترتیب با دوزهای (۰/۰۵، ۰/۰۰۵، ۰/۰۰۵ μg/mouse) ۵ دقیقه پیش از آموزش، RS67333 را با دوز ۰/۰۰۵ به صورت تزریق درون CA1 دریافت کردند.

یافته‌های پژوهش

آزمایش اول: تجزیه و تحلیل آماری به روش One Way Anova و آزمون مکمل Tokey Post Hoc نشان داد که ACPA در بالاترین دوز (۰/۵ μl/mouse)



Freezing time = [  $F_{(3,36)} = 6/668, P < 0.001$  ]  
 3min  
 آزمایش سوم: تجزیه و تحلیل آماری به روش Two Way Anova و آزمون مکمل Tukey Post Hoc نشان داد که تزریق درون صفاقی ACPA (دوزهای مؤثر و بی اثر) به همراه تزریق درون مغزی RS67333 (دوز بی اثر) در هر ۲ فاز بدون صدا (۵ دقیقه) و صدا دار (۳ دقیقه)، در بالاترین دوز ACPA (۰/۵ mg/kg) باعث تشدید تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گردید. چرا که مدت زمان Freezing کاهش پیدا کرده و اختلاف معناداری ایجاد گردید. نتایج آنالیز آماری Two Way Anova و تعیین سطح معناداری نتایج فوق را در شکل های شماره ۶ و ۷ مشاهده می کنید.

Freezing time = [  $F_{(3,36)} = 5/122, P < 0.001$  ]  
 5min  
 Freezing time = [  $F_{(3,36)} = 4/107, P < 0.001$  ]  
 3min

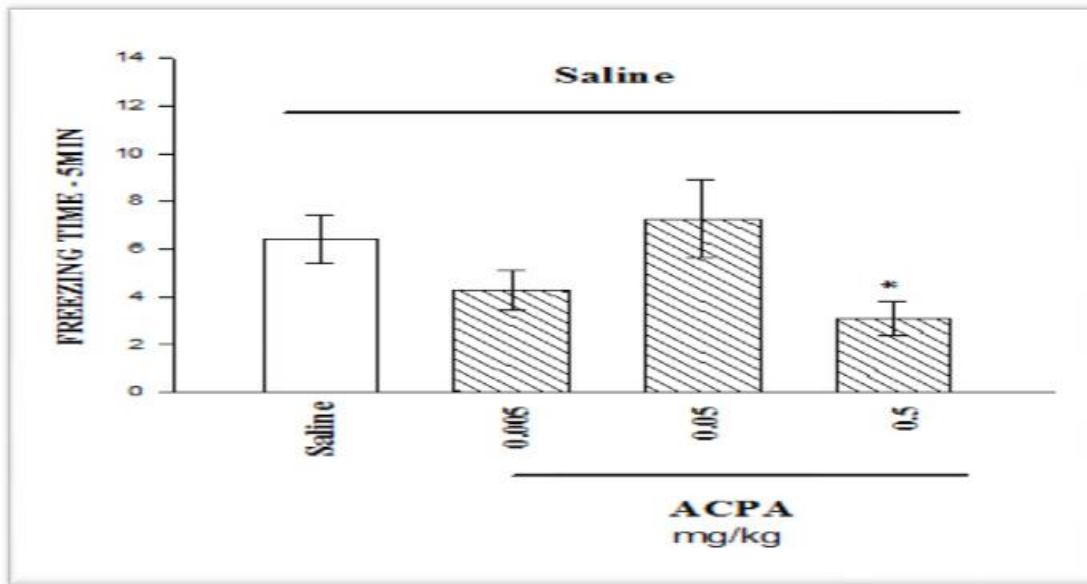
منجر به تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی می شود. زیرا مدت زمان Freezing در هر ۲ فاز صدا دار (۳ دقیقه) و بدون صدا (۵ دقیقه)، کاهش می یابد. نتایج آنالیز آماری One Way Anova و تعیین سطح معناداری نتایج فوق را در شکل های شماره ۲ و ۳ مشاهده می کنید.

Freezing time 5min = [  $F_{(3,36)} = 4/935, P < 0.001$  ]  
 Freezing time = [  $F_{(3,36)} = 4/278, P < 0.05$  ]  
 3min

آزمایش دوم: تجزیه و تحلیل آماری به روش One Way Anova و آزمون مکمل Tokey Post Hoc نشان داد که RS67333 در بالاترین دوز (۰/۵ μl/mouse) منجر به تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی می شود. زیرا مدت زمان Freezing در هر ۲ فاز صدا دار (۳ دقیقه) و بدون صدا (۵ دقیقه)، کاهش می یابد. نتایج آنالیز آماری One Way Anova و تعیین سطح معناداری نتایج فوق را در شکل های شماره ۴ و ۵ مشاهده می کنید.

Freezing time 5min = [  $F_{(3,36)} = 5/415, P < 0.001$  ]

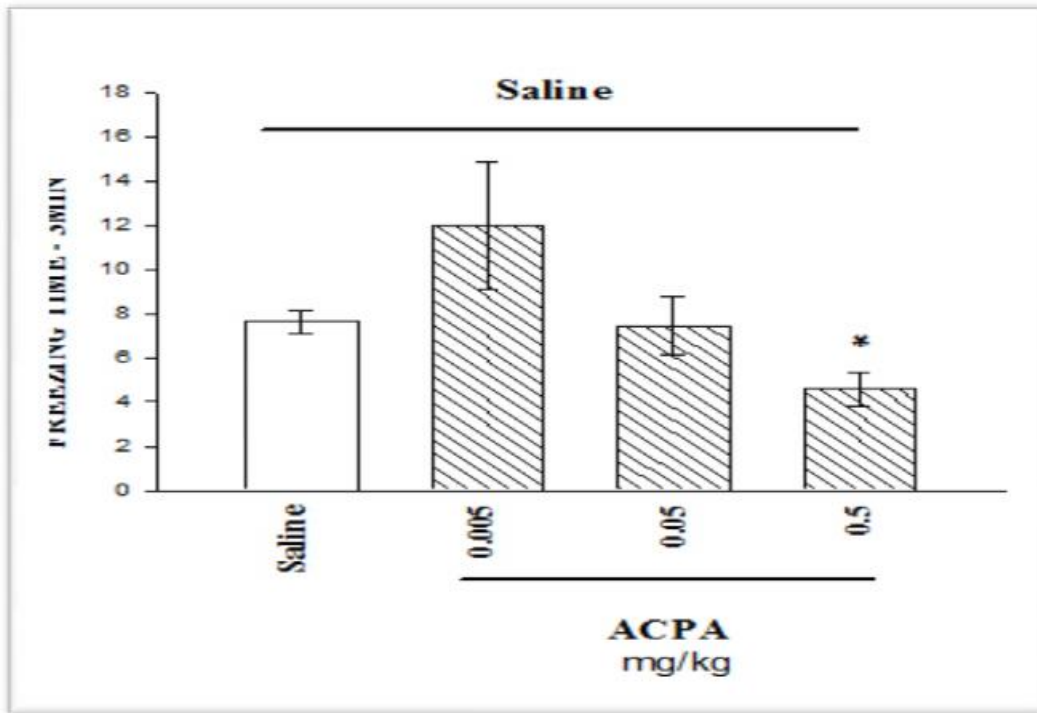
شکل شماره ۲. نتایج آنالیز آماری اثر ACPA بر حافظه ترس در فاز ۵ دقیقه ( $P \leq 0.05^*$ ) اختلاف از گروه کنترل را نشان می دهد.



تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گشته است.

همان طور که در نمودار مشخص است، ACPA در بالاترین دوز مورد استفاده سبب

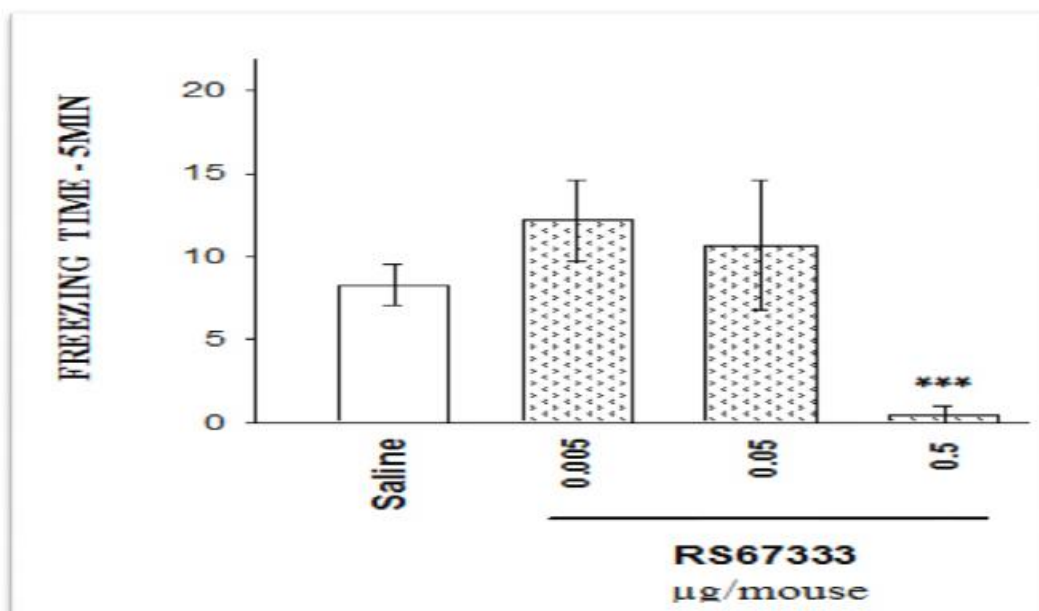
شکل شماره ۳. نتایج آنالیز آماری اثر ACPA بر حافظه ترس در فاز ۳ دقیقه ( $P \leq 0.05^*$ ) اختلاف از گروه کنترل را نشان می دهد.



سبب تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گشته است.

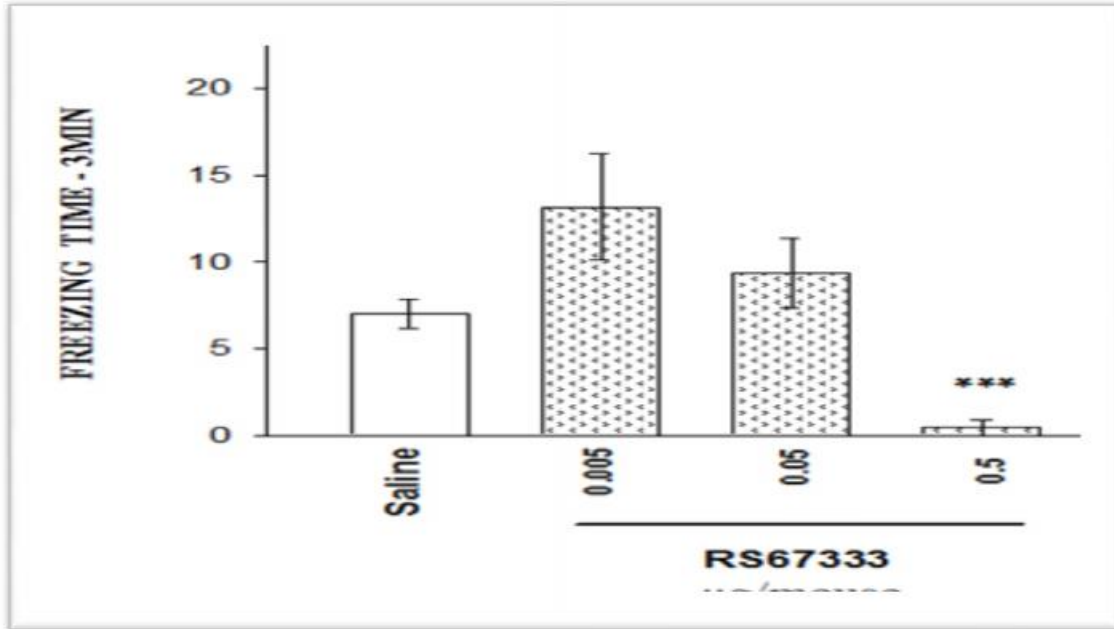
همان طور که در نمودار مشخص است، ACPA در بالاترین دوز مورد استفاده

شکل شماره ۴. نتایج آنالیز آماری اثر RS67333 بر حافظه ترس در فاز ۵ دقیقه ( $P \leq 0.001^{***}$ ) اختلاف از گروه کنترل را نشان می دهد.



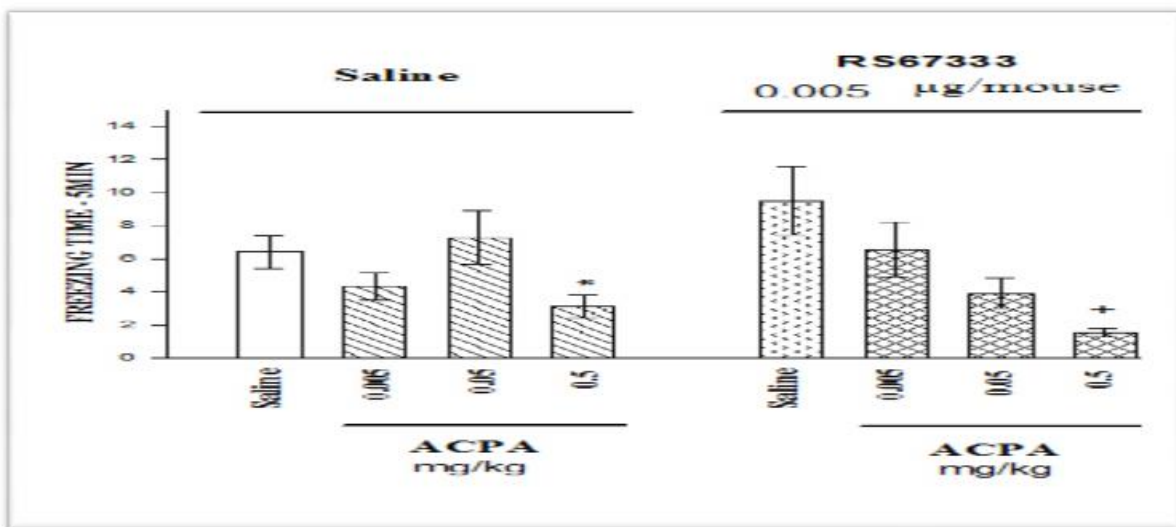
همان طور که در نمودار مشخص است، آگونیست 5HT4 در بالاترین دوز مورد استفاده سبب تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گشته است

شکل شماره ۵. نتایج آنالیز آماری اثر RS67333 بر حافظه ترس در فاز ۳ دقیقه ( $P \leq 0.001^{***}$ ) اختلاف از گروه کنترل را نشان می دهد



همان طور که در نمودار مشخص است، آگونیست 5HT4 در بالاترین دوز مورد استفاده سبب تخریب حافظه ترس و ایجاد فراموشی گشته است.

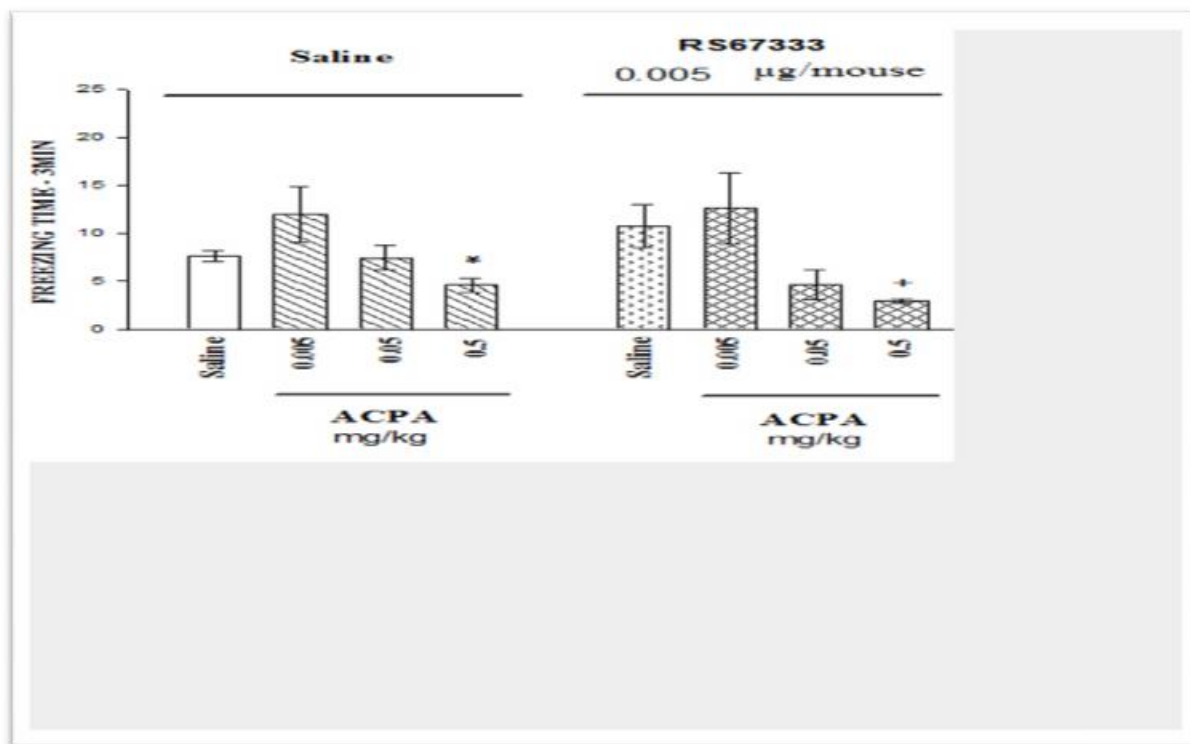
شکل شماره ۶. نتایج آنالیز آماری اثر RS67333 بر حافظه ترس القاء شده توسط ACPA در فاز ۵ دقیقه ( $P \leq 0.05 +$ ) اختلاف از گروه ACPA +/۵ mg/kg را نشان می دهد.



تشدید تخریب حافظه ترس در بالاترین دوز ACPA گشته است.

همان طور که در نمودار مشخص است، تداخل دوز بی اثر آگونیست 5HT4 با تمام دوزهای ACPA، سبب

شکل شماره ۷. نتایج آنالیز آماری اثر RS67333 بر حافظه ترس القاء شده توسط ACPA در فاز ۳ دقیقه (+P<0.05) اختلاف از گروه ACPA 0.5 mg/kg را نشان می دهد.



مطالعات رفتاری دیگری است که نشان داده اند که یکی از اثرات اصلی کانابینوئیدها روی انسان ها و حیوانات آزمایشگاهی فروپاشی یا تخریب حافظه کوتاه مدت است، (۱۸-۱۶). در سال ۲۰۰۰ هم، تجویز سیستمیک ۹- $\Delta$ THC قبل از تست ماز T شکل، حافظه کاری را از بین برده است، (۱۹). هم چنین لیچمن (۲۰۰۰) در مطالعاتی که به صورت *in vitro* صورت گرفت، نشان داد که فعال کردن گیرنده های CB1 با تزریق حاد ترکیبات کانابینوئیدی، LTP را در ناحیه CA1، از بین می برد، (۲۰). نتایج به دست آمده نشان داد که تزریق محیطی ACPA پیش از آموزش حافظه ترس را وقتی ۲۴ ساعت بعد از تزریق دارو در دستگاه fear condition تست شدند، تخریب نمود. بعید به نظر می رسد که اثر ACPA در روز تست اتفاق افتاده باشد. بنا بر این یک اثر خاص ACPA روی تعبیت اطلاعات حسی پیشنهاد می شود. این نتیجه در

همان طور که در نمودار مشخص است، تداخل دوز بی اثر آگونیست 5HT4 با تمام دوزهای ACPA، سبب تشدید تخریب حافظه ترس، در بالاترین دوز ACPA گشته است

#### بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش آثار تزریق دوطرفه آگونیست 5HT4 در هیپوکامپ پستی (CA1) بر روی حافظه ترس موش های کوچک آزمایشگاهی القاء شده با ACPA و با استفاده از الگوی دوطرفه بررسی شد. نتایج نشان داد که تزریق درون صفاقی ACPA و نیز تزریق درون مغزی RS67333، به صورت جداگانه، پیش از آموزش حافظه ترس در روز تست را تخریب می کند. علاوه بر این نتایج حاکی از آن بود که تزریق درون مغزی RS67333، پیش از آموزش تخریب حافظه ترس ناشی از تزریق درون صفاقی ACPA را تشدید بخشید. (در بالاترین دوز) این نتایج مطابق با



5HT7 حافظه را در مدل Radial maze بهبود می بخشد. این مطالعه پیشنهاد می کند که گیرنده مزبور در مراحل دریافت و بازیابی حافظه درگیر است، (۳۵). مطالعات اخیر نشان داده است که به جزء گیرنده 5-HT3 سایر ۶ گیرنده سروتونینی مزدوج به G پروتئین هستند. آن ها یک پایانه آمینی خارج سلولی دارند که هفت دمین عرض غشایی دارد و این هفت دمین با سه حلقه خارج سلولی و سه حلقه داخل سلولی به هم اتصال دارند و یک پایانه کربوکسیلی داخل سلولی نیز دارند. گیرنده های سروتونینی نوع ۴، اغلب مزدوج به GS هستند که آدنیلیل سیکلاز را فعال می کند و منجر به افزایش سنتز cAMP و در نتیجه افزایش فعالیت پروتئین کیناز وابسته به cAMP می شود. این کیناز آنزیم های میانجی را فسفریله می کند تا فعالیت کانال های یونی را تعدیل کند و در نهایت سبب دپلاریزاسیون گیرنده های سروتونینی می شود، (۳۶،۳۷). مطالعات رفتاری پیشنهاد می کند که ارتباط مستقیمی بین کانابینوئیدها و سیستم های مونوآمینرژیک مانند سیستم سروتونرژیک وجود دارد. با توجه به مطالعات صورت گرفته بر سروتونین و سیستم اندوکانابینوئیدی در آمیگدال و هیپوکامپ، مشخص شده است که گیرنده CB1 همراه با گیرنده 5-HT3A که از نوع کانال یونی دریچه دار وابسته به لیگاند است، بیان می شود. هر دو گیرنده کانابینوئیدی و سروتونینی در نورون های گابارژیک آمیگدال و تشکیلات هیپوکامپ حضور دارند و این نورون ها رونوشت mRNA گیرنده CB1 و زیر واحد 5-HT3A را با هم بیان می کنند. یک تعامل بین کانابینوئیدها و سیستم های سروتونرژیک در انتقالات عصبی وجود دارد، (۳۸). مطالعات الکتروفیزیولوژیک صورت گرفته توسط ناکازی در سال ۲۰۰۰ نشان می دهد که آگونیست رسپتور CB1 موجب کاهش آزادسازی سروتونین، آدرنالین و دوپامین می شود. همین مطالعات حاکی از آن است که این رسپتورها در پایانه های آکسونی سیستم های مونوآمینرژیک قرار گرفته اند، (۳۹). تعداد زیادی گیرنده CB1 کانابینوئیدی و گیرنده سروتونینی در نورون های گابارژیک آمیگدال و تشکیلات هیپوکامپی حضور دارند. علاوه بر این گیرنده های CB1 بر روی فیبرهای سروتونرژیک هسته رافه حضور دارند، (۴۰). و در نهایت با توجه به نتایج پژوهش خود و مطالعات مختلف پژوهشگران پیشین چنین می توان استنباط کرد که ACPA سبب تخریب حافظه ترس می شود. در این میان آگونیست 5-HT4 به صورت سینرژیک (تقویت کننده) عمل کرده و سبب تشدید تخریب حافظه می گردد

توافق با مطالعات دیگران است که نشان دادند تزریق آگونیست های گیرنده CB1 تشکیل حافظه فضایی و غیرفضایی را تخریب می کند، (۲۳-۲۱). هم چنین گزارشاتی از داسیلوا در سال ۲۰۰۲ وجود دارد که نشان می دهند آگونیست های گیرنده CB1 کانابینوئید ممکن است بر روی فرآیندهای اکتساب و یا تعمیم حافظه اثر داشته باشند، (۲۶-۲۴). سنجش محل دقیق دخالت کانابینوئیدها بر مراحل مختلف حافظه مشکل است. گزارشی از داولیوریا در سال ۲۰۰۸ نشان می دهد که تزریق پس از آموزش آنندامید، آگونیست گیرنده CB1، در دوزهای پایین در دستگاه step-down باعث یک اثر تسهیلی بر حافظه می شود، (۲۷). بحث و جدال در مورد پاسخ های متفاوت کانابینوئیدها بر حافظه ممکن است به علت تفاوت در نوع دارو، دوز دارو یا روش اندازه گیری حافظه باشد. برای مثال یک مطالعه نشان داد که کانابینوئیدها در دستگاه سنجش حافظه اجتنابی مهاری یک اثر فراموشی بر بیزاری دارد اما در دستگاه میدان باز این اثر را ندارد. شواهد زیادی نشان می دهد که گیرنده های کانابینوئیدی از طریق Gi/o proteins با آدنیلات سیکلاز جفت می شوند و منجر به کاهش تولید cAMP می گردند. نشان داده شده است که CB1 معمولاً از طریق این G-protein روی کانال های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع N پیش سیناپسی عمل می کند که نقش کانابینوئیدها در تنظیم انتقال عصبی CNS را پیشنهاد می کند، (۲۸). هم چنین گزارش شده است که اندوکانابینوئیدها از جایگاه های پس سیناپسی آزاد می شوند و قادرند آزاد سازی انتقال دهنده های دیگر از قبیل سروتونین، GABA، اوپیوئیدها و دوپامین را مهار کنند که ممکن است منجر به تغییرات اساسی و طولانی مدت در الگوهای رفتاری مختلف گردد، (۳۲-۲۹). تحقیقات نشان می دهد که آگونیست های کانابینوئیدی در تجمع و آسیب به مدل های حافظه در انسان و حیوانات آزمایشگاهی اشکالاتی ایجاد می کنند. سایر محققین نشان دادند که تزریق آگونیست سنتتیک کانابینوئید از طریق فعالیت گیرنده آن به حافظه در حال فعالیت در مدل radial arm maz و water maz آسیب می رساند. نتایج نشان می دهد که تشکیل حافظه بلندمدت به سنتز پروتئین در هیپوکامپ و mRNA جدید نیاز دارد و تخلیه سروتونین بر هیچ یک از حافظه های کوتاه مدت و بلند مدت اثری ندارد، (۳۳،۳۴). یافته هایی که توسط نیک در سال ۲۰۰۸ ارائه شد، نشان می دهد که تزریق آگونیست 5HT1 در مدل های حافظه فضایی، باعث آسیب به حافظه می شود و آنتاگونیست

## References

1. Fields RD. Making memories stick. *Sci Am* 2005; 292: 75-81.
2. Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 1993; 365: 61-5.
3. Chaperon F, Thiebot MH. Behavioral effects of cannabinoid agents in animals. *Critic Rev Neurobiol* 1999; 13:243-81.
4. Izquierdo I, Da Cunha C, Rosat R, Jerusalinsky D, Ferreira MB, Medina JH. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum, and hippocampus of the rat. *Behav Neur Biol* 1992; 58: 16-26.
5. Izquierdo I, Medina JH. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. *Neurobiol Learn Memory* 1995; 63:19-32.
6. Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Progr Neurobiol* 1999; 58:315-48.
7. Zarrindast MR. Involvement of dopamine D1 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Brain Res* 2003; 965: 212-21.
8. Rezayof A. Involvement of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. *J Psychopharmacol* 2003; 17(4): p. 415-23.
9. Haritou SJ. Seasonal changes in circadian peripheral plasma concentrations of melatonin, serotonin, dopamine and cortisol in aged horses with Cushing's disease under natural photoperiod. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 988-96.
10. Berumen LC. Serotonin receptors in hippocampus. *Sci World J* 2012; 82:349-3.
11. Rodriguez de Fonseca F, Cebeira M, Fernandez-Ruiz JJ, Navarro M, Ramos JA. Effects of pre and perinatal exposure to hashish extracts on the ontogeny of brain dopaminergic neurons. *Neuroscience* 1991; 43:713-23.
12. Molina-Holgado F, Amaro A, Gonzalez MI, Alvarez FJ, Leret ML. Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *Eur J Pharmacol* 1996; 316:39-42.
13. Vela G, Martin S, Garcia-Gil L, Crespo JA, Ruiz-Gayo M, Javier Fernandez-Ruiz J, et al. 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 Res* 1998; 807:101-9.
14. Liu J, et al. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure* 2000; 19: 165-72.
15. Nahas G, Latour C. The human toxicity of marijuana. *Med J Aust* 1992; 156:495-7.
16. Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids reveal the necessity of hippocampal neural encoding for short-term memory in rats. *J Neurosci* 2000; 20:8932-42.
17. Stiglick A, Kalant H. Learning impairment in the radial-arm maze following prolonged cannabis treatment in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1982; 77:117-23.
18. Nava F, Carta G, Battasi AM, Gessa GL. D(2) dopamine receptors enable delta(9)-tetrahydrocannabinol induced memory impairment and reduction of hippocampal extracellular acetylcholine concentration. *Br J Pharmacol* 2000; 130:1201-10.
19. Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR. Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1995; 119:282-90.
20. Nowicky AV, Teyler TJ, Vardaris RM. The modulation of long-term potentiation by delta-9-tetrahydrocannabinol in the rat hippocampus, in vitro. *Brain Res Bull* 1999; 19:663-72.
21. Egashira N, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M. Intracerebral microinjections of delta 9-tetrahydrocannabinol: search for the impairment of spatial memory in the eight-arm radial maze in rats. *Brain Res*

- 2002; 952:239-45.
22. Hernandez-Tristan R, Arevalo C, Canals S, Leret ML. The effects of acute treatment with delta9-THC on exploratory behaviour and memory in the rat. *J Physiol Biochem* 2000; 56:17-24.
23. Hampson RE, Deadwyler SA. Cannabinoids, hippocampal function and memory. *Life Sci* 1999; 65:715-23.
24. Da Silva G, Takahashi RN. SR 141716A prevents delta 9-tetrahydrocannabinol-induced spatial learning deficit in a Morris-type water maze in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26:321-5.
25. Kobilic T, Hazvi S, Dudai Y. Role of cortical cannabinoid CB1 receptor in conditioned taste aversion memory. *Eur J Neurosci* 2007; 25:3417-21.
26. Robinson L, Goonawardena AV, Pertwee RG, Hampson RE, Riedel G. The synthetic cannabinoid HU210 induces spatial memory deficits and suppresses hippocampal firing rate in rats. *Br J Pharmacol* 2007; 151:688-700.
27. 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 Memory* 2008; 90:1-9.
28. 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* 1995; 15:6552-61.
29. Garcia-Gil L, de Miguel R, Romero J, Perez A, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ. Perinatal delta9-tetrahydrocannabinol exposure augmented the magnitude of motor inhibition caused by GABA(B), but not GABA(A), receptor agonists in adult rats. *Neurotoxicol Teratol* 1999; 21:277-83.
30. Molina-Holgado F, Amaro A, Gonzalez MI, Alvarez FJ, Leret ML. Effect of maternal delta 9-tetrahydrocannabinol on developing serotonergic system. *Eur J Pharmacol* 1996; 316:39-42.
31. Vela G, Fuentes JA, Bonnin A, Fernandez-Ruiz J, Ruiz-Gayo M. Perinatal exposure to delta 9-tetrahydrocannabinol (delta 9-THC) leads to changes in opioid-related behavioral patterns in rats. *Brain Res* 1995; 680:142-7.
32. Schlicker E, Timm J, Gothert M. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 354:791-5.
33. Ghiasvand M, Rezayof A. Activation of cannabinoid CB1 receptors in the central amygdala impairs inhibitory avoidance memory consolidation via NMDA receptors. *Neurobiol Learn Mem* 2011; 96: 333-8.
34. Buzsaki G. Functions for interneuronal nets in the hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75:508-15.
35. Paulsen O, Moser EI. A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *Trends Neurosci* 1998; 21:273-8.
36. Lam DD. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol Biochem Behav* 2010; 97:84-91.
37. Ariel P, Ryan TA. New insights into molecular players involved in neurotransmitter Release. *Physiology* 2012; 27: 15-24.
38. Nic Dhonnchadha BA, Cunningham KA. Serotonergic mechanisms in addiction-related memories. *Behav Brain Res* 2008; 195: 39-53.
39. Nakazi M. Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 361: 19-24.
40. Albertazzi P. Noradrenergic and serotonergic modulation to treat vasomotor symptoms. *Menopause Int* 2006; 12: 7-11.



## Modulated Effect of 5-HT4 agonist upon Fear Memory in Dorsal Hippocampus (CA1) in Mice

Farahizadeh M<sup>1\*</sup>, Zarindast M<sup>2</sup>, Nasehi M<sup>3</sup>, Benanej M<sup>1</sup>

(Recived: 20 April, 2014

Accepted:31 May, 2014)

### Abstract

**Introduction:** RS67333 is the selective agonist of 5-HT4 and ACPA (Arachidonyl-cyclopropylamide) is the selective agonist of CB1. The aim of present study was investigate the bilateral injection effects of dorsal hippocampus (CA1) serotonergic system (Agonist of 5-HT4) on fear memory-formation process induced by ACPA in mature male mice.

**Materials & Methods:** 120 Male NMRI mice weighting 23-28 gr were put into control and experimental groups in our experiments. Fear conditioning task was used for conditioning of fear. 24 hours after training, we estimated the fear memory formation.

**Findings:** Intraperitoneal administration of

ACPA (0.005, 0.05 and 0.5 mg/kg) causes impairment of fear memory and amnesia. Moreover, intra-CA1 injection of 5-HT4 receptor agonist (RS67333) (0.005, 0.05 and 0.5  $\mu$ g/mice) in highest dose impaired fear memory and induced amnesia in saline-treated mice, and increased the impairment of fear memory in ACPA-treated mice ( $P < 0.05$ ).

**Discussion & Conclusion:** Serotonergic system (Agonist of 5-HT4) in the CA1 of hippocampus induced by ACPA interferes in the impairment of fear memory.

**Keywords:** Cannabinergic system, dorsal hippocampus, RS67333, serotonergic system, fear conditioning task

1 Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

2 Cognitive Sciences Research Center, Tehran, Iran

3 Dept of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Garmsar, Iran

\* Corresponding author