

تأثیر اویپوئیدها بر پاسخ عوامل کانابینوئیدی آمیگدال مرکزی بر اضطراب در آزمایش elevated plus-maze

دکترشادی سرهرودی^{۱*} دکتراردشیر ارضی^{۲*} دکترمحمد رضا زرین دست^{***} دکترمحمد جواد خدایار^{****}

* دستیار فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

** استاد فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

*** استاد فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

**** استادیار فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز

چکیده

زمینه و هدف

کانابینوئیدها که اجزای فعال ماری جوانا می باشند و اثراتی شبیه به اویپوئیدها دارند. به علاوه میان این دو سیستم تداخلات عملکردی نیز وجود دارد. هدف این مطالعه بررسی اثر سیستم کانابینوئیدی بر اضطراب در آمیگدال مرکزی، و تداخل آن با سیستم اویپوئیدی است.

روش بررسی

در مطالعه حاضر، اثر تزریق داخل صفاقی داروهای اویپوئیدی بر پاسخ حاصل از تزریق داخل آمیگدال عوامل کانابینوئیدی در موش های صحرایی، با استفاده از Elevated Plus-Maze مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها

تزریق داخل صفاقی مورفین (۳، ۶، ۹ میلی گرم) موجب افزایش OAT و OAE شد ولی فعالیت حرکتی تغییر قابل ملاحظه ای نداشت، و بدین ترتیب اثر ضد اضطراب نشان داد. البته برخی از دوزهای نالوکسان، آنتاگونیست اویپوئیدی، OAT و فعالیت حرکتی را کاهش داد. تجویز داخل آمیگدال ACPA (آگونیست گیرنده CB1 کانابینوئیدی) در دوزهای ۵، ۱۰، ۲۵ ng/rat موجب افزایش OAT و OAE شد ولی فعالیت حرکتی را تغییری نداد که نشان دهنده یک پاسخ ضد اضطراب آن می باشد. این پاسخ با مورفین ۶ میلی گرم در کیلوگرم داخل صفاقی [ip] افزایش و با نالوکسان کاهش یافت. تجویز داخل آمیگدال AM251 (آنتاگونیست گیرنده CB1 کانابینوئیدی) در دوزهای ۱۰۰، ۲۵، ۵۰ ng/rat تغییر قابل ملاحظه ای در OAT و OAE ایجاد نکرد ولی دوزهای بالاتر آن (۱۰۰، ۲۵۰ ng/rat) فعالیت حرکتی را کاهش داد. تجویز این دارو نیز به همراه مورفین داخل صفاقی موجب افزایش پاسخ مورفین و یا نالوکسان نیز موجب ایجاد پاسخ ضد اضطرابی در آن گردید.

نتیجه گیری

نتایج بیان گر آن است که گیرنده های CB1 اثر ضد اضطرابی ایجاد می کنند. همچنین این نتایج نشان می دهند که سیستم اویپوئیدی با گیرنده های کانابینوئیدی در آمیگدال مرکزی تداخل دارد.

کلید واژه ها: کانابینوئیدها، مورفین، نالوکسان، اضطراب، موش صحرایی

نویسنده مسئول: دستیار فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اهواز

آدرس: اهواز- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی تلفن: ۰۹۱۲۳۰۹۵۲۲۸

تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۲/۱۳

Email: sarahroodi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۱۸

مقدمه

کانابینوئیدها که ماده مؤثره حشیش (ماری‌جوانا) می‌باشند اثرات بیولوژیک خود را با فعال کردن گیرنده‌های کانابینوئیدی خاصی ایجاد می‌کنند. تاکنون دو دسته گیرنده کانابینوئیدی CB1 و CB2 شناسایی و کلون شده‌اند گیرنده‌های کانابینوئیدی CB1 به‌طور وسیعی در سیستم اعصاب مرکزی و برخی از بافت‌های محیطی توزیع شده و گیرنده‌های CB2 نیز در سیستم ایمنی وجود دارد (۱). گیرنده‌های CB1 به‌طور وسیعی در کورتکس، بازال گانگلیا، هیپوکمپ و آمیگدال توزیع شده و اعمال فیزیولوژیک و رفتاری کانابینوئیدها را وساطت می‌کنند (۲) و خانواده گیرنده‌های جفت‌شده با G-پروتئین می‌باشند (۳،۴).

کانابینوئیدها در حیوانات آزمایشگاهی هر دو اثر اضطراب‌زا و ضد اضطراب را اعمال می‌کنند. در مقابل آنتاگونیست‌های گیرنده کانابینوئیدی اثر اضطراب را اعمال می‌کنند (۳). از سوی دیگر، موش‌های فاقد گیرنده CB1 نیز علائم اضطراب را نشان داده‌اند (۵،۶). پاره‌ای از مطالعات نیز پاسخ اضطرابی را در ادامه تجویز لیگاند‌های کانابینوئیدی گزارش نموده‌اند (۹-۷). دوزهای پایین کانابینوئیدها معمولاً اثر ضد اضطرابی داشته در حالی‌که دوزهای بالاتر اثر عکس ایجاد می‌کنند (۱۰). چنین اثرات بحث‌انگیزی در مورد SR141716A که یک آنتاگونیست اختصاصی گیرنده CB1 می‌باشد گزارش شده است. از تجویز سیستمیک SR141716A در مدل اضطرابی Elevated Plus-Maze هم اثر اضطراب را (۱۰،۱۱) و هم اثر ضد اضطراب گزارش شده است (۶،۱۲). سیستم آندوژن اوپیوئیدی می‌تواند در هر دو عملکرد اضطراب‌زایی و ضد اضطرابی کانابینوئیدها عمل کند. این واقعیت ممکن است به دلیل چگالی بالای گیرنده‌های CB1 و اوپیوئیدی باشد که در مناطق سیستم لیمبیک یافت شده‌اند (۱۳). رفتارهای هیجانی نیز به سیستم لیمبیک مربوط هستند. ویژگی‌های فارماکولوژیک کانابینوئیدها و مورفین به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. که کانابینوئیدها دارای پاره‌ای عوارض

مشابه اوپیوئیدها هستند (۱۴،۱۵) و برخی تداخلات در عملکرد بین این دو سیستم گیرنده‌ای وجود دارد (۱۴). مطالعات Self administration نشان‌دهنده وجود تداخلات قوی بین دو سیستم اوپیوئیدی و کانابینوئیدی است (۱۶،۱۷). از طرف دیگر آنتاگونیست‌های گیرنده کانابینوئیدی CB1 نیز می‌توانند موجب سندرم ترک اوپیوئیدی شوند (۱۸). اخیراً اثرات تداخلات عملکردی این دو سیستم را بر لرزش (۱۹،۲۰)، اضطراب (۲۱) و تنظیم ایمنی (۲۲) نیز نشان داده‌اند. ترکیبات اوپیوئیدی اثرات فارماکولوژیک خود را از طریق فعال نمودن گیرنده‌های اوپیوئیدی μ و δ و اعمال می‌کنند (۱۳،۲۳). و در چندین اثر از جمله هیپوترمی، آرام‌بخشی، کاهش فشارخون، مهار حرکات روده، سرکوب حرکتی و ضد دردی با کانابینوئیدها اشتراک عمل دارند (۲۴،۲۵) علاوه بر این شواهدی در اختیار هستند که بیانگر آن می‌باشند که، ممکن است اوپیوئیدها فرآیندهای نرونی را وساطت کنند که در رفتارهای وابسته به اضطراب لازمند (۲۶). گزارشات دیگری نیز حکایت از این امر دارند که مورفین اثر ضد اضطراب خود را پس از تجویز محیطی (۲۷) و هم‌چنین مرکزی (۲۶) اعمال می‌کند. از طرف دیگر تجویز نالوکسان، که یک آنتاگونیست اوپیوئیدی است، موجب افزایش رفتار اضطرابی در موش‌های صحرایی می‌گردد (۲۸) تداخل میان این دو سیستم در ویژگی‌های ضد دردی و ایجاد وابستگی مهم‌ترین موضوع مورد بحث آن‌هاست (۱۴،۱۵،۲۹،۳۰). گیرنده‌های هر دو دسته دارویی مکانیسم انتقال پیام داخل سلولی مشابهی دارند، که از طریق فعال‌سازی پروتئین‌های Gi موجب کاهش cAMP می‌شوند (۳۱،۳۲). علاوه بر این، بخشی از تداخلات میان گیرنده‌های کانابینوئیدی و μ و κ اوپیوئیدی در اثر ضد دردی (۲۹) و ضد اضطرابی (۱۹) در گیرنده. به نظر می‌رسد که بخش‌های مختلفی از مغز در تنظیم انواع متفاوت اضطراب دخیل باشند. آمیگدال یکی از مهم‌ترین مناطق در تنظیم اضطراب است (۳۳). شواهد آزمایشگاهی بیانگر این امر هستند که آمیگدال نقش کلیدی در هماهنگی و ظهور ترس و اضطراب در انسان و چندین گونه از حیوانات، از جمله موش صحرایی دارد. اثر سیستم کانابینوئیدی بر اضطراب در آمیگدال مرکزی، و

تداخل آن با سیستم اویپوئیدی (تجویز داخل صفاقی) تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است. بر پایه یافته‌های مذکور، هدف این مطالعه بررسی اثر سیستم کانابینوئیدی بر اضطراب در آمیگدال مرکزی، و تداخل آن با سیستم اویپوئیدی بر اضطراب است.

روش بررسی

حیوانات: در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار (انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران) استفاده گردید که در شروع آزمایشات حدود ۲۷۵-۲۲۵ گرم وزن داشتند. حیوانات در اتاق مخصوص حیوانات (با دمای 22 ± 3 سانتیگراد) نگهداری شدند. در هر قفس چهار حیوان نگهداری شد که چرخه نور ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی (۷:۰۰ تا ۱۹:۰۰) به همراه آب و غذای کافی برای آن‌ها رعایت شد. این حیوانات برای مدت حداقل ۱ هفته پیش از آغاز آزمایشات در اتاق مخصوص نگهداری شدند و آزمایشات در طی فاز روشنایی انجام گرفت. هر حیوان تنها یک بار در آزمایش مورد استفاده قرار گرفت و پروتکل آزمایشات توسط کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز مورد تصویب قرار گرفت.

داروها: داروهای مورد استفاده در این آزمایش عبارتند از مورفین سولفات، آگونیست گیرنده‌های اویپوئیدی (تماد، تهران، ایران) نالوکسان هیدروکلراید، آنتاگونیست گیرنده‌های اویپوئیدی (تولید دارو، تهران، ایران)، ACPA [N-(2-cyclopropyl)-5Z, 8Z, 11Z, 14Z-CB1 eicosatetraenamide] آگونیست گیرنده‌های کانابینوئیدی و AM251 [N-(piperidin-1-yl)-5-(4-iodophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide] آنتاگونیست گیرنده‌های CB1 کانابینوئیدی (Tocris, UK).

ACPA در اتانول خالص، امولفور و سالین ۰/۹ درصد به نسبت ۱:۱:۱۸ و AM251 در DMSO و آب مقطر به نسبت ۱:۹ به علاوه یک قطره توئین ۸۰ حل شد. داروهای ذکر شده در آمیگدال مرکزی تزریق شدند. مورفین و نالوکسان نیز در سالین ۰/۹ درصد تهیه شد و به وزن صورت داخل صفاقی تجویز شدند.

جراحی: حیوانات توسط کتامین هیدروکلراید (۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و زایلوزین (۴ میلی‌گرم در کیلوگرم) بیهوش شده و در دستگاه اسریوتاکس (Stoelting Co., Illinois, USA)، قرار داده شدند. یک کانول راهنمای استیل (۲۱ گیج، سوپا، ایران) طبق مختصات آمیگدال مرکزی در اطلس پاکسینوس، در دو آمیگدال مرکزی چپ و راست کاشته شدند (۳۴). مختصات آمیگدال مرکزی در اطلس پاکسینوس بدین شرح است: ۱/۷-۱/۹ میلی‌متر به سمت جلوی برگما، $3/7-3/2 \pm$ میلی‌متر در دو سمت خط میانی و ۶/۴ تا ۵/۴ میلی‌متر در عمق از استخوان جمجمه. سپس این کانول‌ها توسط سیمان دندانپزشکی در استخوان جمجمه ثابت شدند و پس از ۵ روز بهبودی از جراحی، آزمایشات انجام گرفت. تزریق داخل آمیگدال توسط یک کانول تزریق که از سرنگ مخصوص دندانپزشکی (gauge, Supa, Iran-۲۷) تهیه شده صورت گرفت. بدین صورت که ۱ میلی‌متر از کانال راهنما بلندتر در نظر گرفته شد و لذا در ۱ میلی‌متر پایین‌تر از آن تزریق صورت گرفت. این سرنگ توسط یک لوله پلی‌اتیلنی به یک سرنگ همیلتون ۱ میکرولیتر متصل شد و مقدار ۰/۵ میکرولیتر از مایع در هریک از دو طرف (آمیگدال راست و چپ) تزریق گردید (مجموعاً ۱ میکرولیتر). هر یک از این دو تزریق ۶۰ ثانیه طول کشید. این سرنگ‌ها کمی بیش از ۶۰ ثانیه در آمیگدال مرکزی نگه داشته شدند تا دارو به خوبی وارد شود و از خارج شدن دارو پیشگیری شود (۳۵). آزمایش نیز ۵ دقیقه پس از تزریق داخل آمیگدال صورت گرفت. در پایان مطالعه، $1 \mu\text{l}/\text{rat}$ محلول متیلن بلو داخل آمیگدال تزریق گردید و با برش مغزی صحت تزریق در آمیگدال مرکزی تأیید شد.

آزمایش رفتاری (Elevated Plus-Maze):

Elevated Plus-Maze یک مازچوبی به شکل به علاوه است که بر چهار پایه استوار است. دو تا از بازوها فاقد دیواره جانبی و انتهایی هستند (بازوهای باز: 10×50 سانتی‌متر). دو بازوی دیگر دارای دو دیواره جانبی و یک دیواره انتهایی هستند ولی سقف آن باز است (بازوهای بسته $40 \times 10 \times 50$). در محل برخورد این چهار بازو یک صفحه مربع شکل به ابعاد 10×10 قرار دارد. ارتفاع ماز از

زمین ۵۰ سانتی متر است (۳۶)، پیش از ورود به داخل ماز، حیوان به مدت ۵ دقیقه در یک جعبه چوبی به ابعاد ۵۰×۵۰×۳۵ قرار داده می شود. هر حیوان به تنهایی در مرکز Elevated Plus-Maze به صورتی گذاشته می شود که صورت حیوان به سمت بازوی باز باشد و ۵ دقیقه در ماز به صورت آزاد حرکت کند. در این مدت ۵ دقیقه تمام تحرکات حیوان در Elevated Plus-Maze فیلم برداری شده و تعداد دفعات داخل شدن حیوان به بازوهای باز، بازوهای بسته و مجموع زمان صرف شده در بازوهای باز و همچنین مجموع زمان های صرف شده در بازوی بسته محاسبه می شود. عبور چهار دست و پای حیوان از خط ورودی بازوها ورود محسوب می گردد. درصد دفعات ورود به بازوی باز (%OAE) و درصد زمان حضور در بازوهای باز (%OAT) که ملاک اضطراب است به این صورت محاسبه می گردد: (الف) $100 \times$ نسبت ورود به بازوی باز به مجموع ورود به بازوهای باز و بسته = (%OAE)؛ (ب) $100 \times$ نسبت زمان صرف شده در بازوهای باز به مجموع زمان صرف شده در بازوهای باز و بسته = (%OAT). مجموع ورود به بازوهای باز و بسته نیز Locomotor Activity (LA) نامیده می شود.

آزمایشات

آزمایش اول: در این آزمایش، اثر مورفین یا نالوکسان به تنهایی بر اضطراب مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور هشت گروه حیوان برای هر یک از داروها به کار گرفته شد. چهار گروه از حیوانات نرمال سالین داخل صفاقی (۱ میلی گرم بر کیلوگرم) یا سه دوز متفاوت مورفین (۳،۶،۹ میلی گرم بر کیلوگرم) داخل صفاقی، ۲۵ دقیقه قبل از تزریق داخل آمیگدال سالین (1μl/rat) دریافت کردند. چهار گروه دیگر نیز نرمال سالین داخل صفاقی (۱ میلی گرم بر کیلوگرم) یا سه دوز متفاوت نالوکسان (۰/۱، ۰/۱۰، ۰/۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم) ۱۰ دقیقه قبل از تزریق داخل آمیگدال سالین (1μl/rat) دریافت کردند و آزمایش ۵ دقیقه پس از تزریق داخل آمیگدال صورت گرفت.

آزمایش دوم: در این آزمایش، اثر ACPA به تنهایی و همراه با مورفین یا همراه با نالوکسان مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۱۲ گروه حیوان به کار گرفته

شدند. چهار گروه از حیوانات نرمال سالین (1μl/rat) یا ACPA (۵، ۱/۲۵، ۰/۱۲۵ ng/rat) داخل آمیگدال دریافت کردند و آزمایش ۵ دقیقه پس از تزریق داخل آمیگدال صورت گرفت. چهار گروه دیگر مورفین (داخل صفاقی) (۶ میلی گرم بر کیلوگرم) ۲۵ دقیقه قبل از تزریق داخل آمیگدالی نرمال سالین یا ACPA (۵ ng/rat، ۰/۱۲۵، ۱/۲۵) دریافت کردند و آزمایشها ۵ دقیقه پس از تزریق داخل آمیگدال صورت گرفت. چهار گروه دیگر نیز نالوکسان (داخل صفاقی) (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم)، ۱۰ دقیقه قبل از تزریق داخل آمیگدال نرمال سالین یا ACPA (۵ ng/rat، ۱/۲۵، ۰/۱۲۵) دریافت کردند و آزمایشها ۵ دقیقه پس از تزریق داخل آمیگدال صورت گرفت.

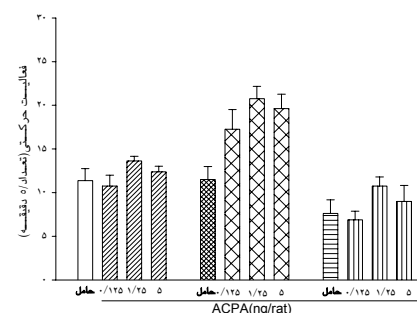
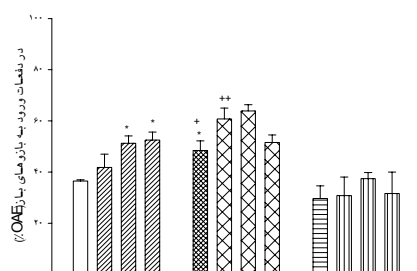
آزمایش سوم: در این آزمایش، اثر AM251 به تنهایی و همراه با مورفین یا نالوکسان مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ۱۲ گروه حیوان به کار گرفته شد. چهار گروه از حیوانات DMSO یا AM251 (۱۰۰، ۲۵، ۲/۵ ng/rat) داخل آمیگدال دریافت کردند و آزمایش، ۵ دقیقه پس از تزریق داخل آمیگدال صورت گرفت. چهار گروه دیگر مورفین (داخل صفاقی) (۶ میلی گرم بر کیلوگرم) ۲۵ دقیقه قبل از تزریق داخل آمیگدال DMSO یا AM251 (۱۰۰ ng/rat، ۲۵، ۲/۵) دریافت کردند و آزمایشها ۵ دقیقه پس از تزریق داخل آمیگدال صورت گرفت. چهار گروه دیگر نیز نالوکسان (داخل صفاقی) (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم)، ۱۰ دقیقه قبل از تزریق داخل آمیگدال DMSO یا AM251 (۱۰۰ ng/rat، ۲۵، ۲/۵) دریافت کردند و آزمایشها ۵ دقیقه پس از تزریق داخل آمیگدال صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده ها: افزایش زمان حضور در بازوهای باز و تعداد ورود به بازوهای باز معیار کاهش اضطراب در نظر گرفته شد. محاسبات از طریق انجام روش آنالیز واریانس یک طرفه برای مقایسه گروهها با گروه کنترل آنها و واریانس دوطرفه برای مقایسه گروهها قبل و بعد از تزریق داروی دوم با یکدیگر جهت ارزیابی تداخل آنها با هم به کمک نرم افزار SPSS۱۴ صورت گرفت. بعد از یک F معنی دار، آنالیز به کمک آزمایش تکمیلی LSD ادامه یافت. از لحاظ آماری P کمتر از ۰/۰۵ معنی دار فرض شد.

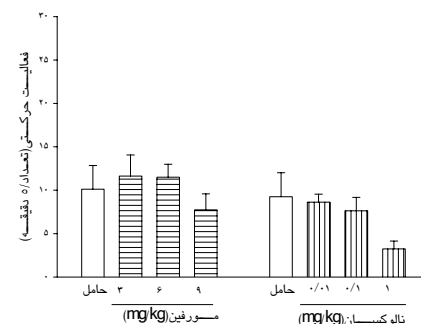
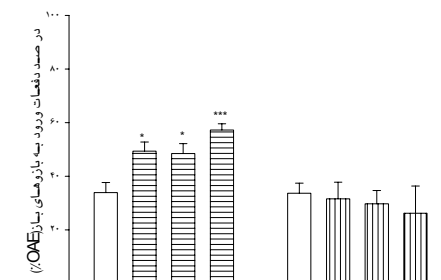
بافتها

Figure 1 consists of two bar charts. The left chart shows the percentage of OAT-positive cells in the hippocampus for four groups: Control (white bar, ~18%), MPTP (black bar, ~45%), MPTP + M (diagonal lines, ~65%), and MPTP + M + N (cross-hatch, ~60%). The right chart shows the percentage of OAT-positive cells in the hippocampus for four groups: Control (white bar, ~18%), MPTP (black bar, ~45%), MPTP + M (diagonal lines, ~65%), and MPTP + M + N (cross-hatch, ~60%). Statistical significance is indicated by asterisks: * (p < 0.05), ** (p < 0.01), *** (p < 0.001).

Group	Percentage of OAT-positive cells (%)	Significance
Control	~18	
MPTP	~45	***
MPTP + M	~65	***
MPTP + M + N	~60	***



Group	Percentage of time in open arms (%)	Significance
CONT	~25	
MPTP	~35	**
MPTP + 100mg/kg	~45	**
MPTP + 200mg/kg	~40	***



شکل ۱: اثر تزریق مورفین و نالوکسان داخل صفاقی بر اضطراب در موش صحرایی. سالیان (۱ میلی گرم بر کیلوگرم) یا مورفین (۳، ۶، ۹ میلی گرم بر کیلوگرم) ۳۰ دقیقه قبل از شروع آزمایش تزریق شدند. نتایج بر اساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد و با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه تعیین شده. $N=8$.

*** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ در مقایسه با گروه دریافت کننده سالیان (حامل).

نتایج بر اساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد و با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه تعیین شده. $N=8$.

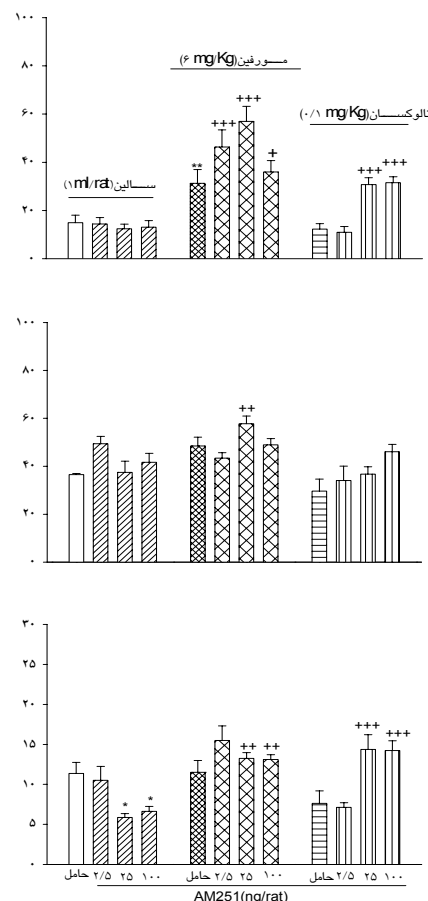
$P<0.001$ ***, $P<0.01$ **, $P<0.05$ * در مقایسه با سالین.

$P<0.001$ ***, $P<0.01$ **, $P<0.05$ + در مقایسه با مورفین (۶ میلی گرم بر کیلوگرم) یا با نالوکسان (۰/۱ میلی گرم بر کیلوگرم).

شکل ۳ نشان‌دهنده اثرات AM251 داخل آمیگدال به‌تنهایی و یا در حضور مورفین یا نالوکسان داخل صفاقی بر پارامترهای اضطرابی در روش Elevated Plus-Maze می‌باشد. ANOVA یک‌طرفه نشان داد که تزریق داخل آمیگدال AM251 به‌تنهایی در هیچ‌یک از دوزها تغییر معنی‌داری در OAT٪ [F(۲۸,۳)=۰/۲, P>۰/۰۵] و OAE٪ [F(۲۸,۳)=۳/۰۸, P>۰/۰۵] ایجاد نکرد که نشان‌دهنده عدم تأثیر آن بر اضطراب در گروه‌های مورد مطالعه است. ولی تجویز داخل آمیگدال دوزهای مورد استفاده AM251 موجب کاهش معنی‌داری در فعالیت حرکتی حیوانات شد [ANOVA F(۲۸,۳)=۵/۴۴, P<۰/۰۵] دوطرفه نیز نشان داد که تجویز مورفین (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌همراه AM251 (۲۵، ۱۰۰ ng/rat) موجب تداخل معنی‌داری در OAT٪ [F(۵۶,۳)=۵/۹۷۱, P<۰/۰۱] و OAE٪ [F(۵۶,۳)=۳/۴۸, P<۰/۰۵] و همین‌طور فعالیت حرکتی [F(۵۶,۳)=۳/۵۲, P<۰/۰۵] می‌گردد.

همچنین ANOVA دوطرفه نشان داد که تجویز نالوکسان (۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌همراه AM251 (۲۵، ۱۰۰ ng/rat) موجب تداخل در OAT٪ [F(۵۶,۳)=۳/۴۸, P<۰/۰۵] و OAE٪ [F(۵۶,۳)=۵/۹۷, P<۰/۰۵] و همچنین فعالیت حرکتی [F(۵۶,۳)=۳/۵, P<۰/۰۵] شد. این نتایج نیز این امر را که CB1 در آمیگدال مرکزی می‌تواند در اثر ضد اضطرابی اُپیوئیدها دخیل باشد نشان می‌دهد.

ANOVA دوطرفه نیز نشان داد که تجویز مورفین (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌همراه ACPA (۵، ۱/۲۵، ۰/۱۲۵ ng/rat) تغییر معنی‌داری در OAT٪ [F(۵۶,۳)=۲/۱۷, P>۰/۰۵] ایجاد نکرده اما موجب افزایش معنی‌دار OAE٪ [F(۵۶,۳)=۳/۰۱, P<۰/۰۵] و همین‌طور فعالیت حرکتی [F(۵۶,۳)=۲/۹, P<۰/۰۵] گردید. همچنین ANOVA دوطرفه نشان داد که تجویز نالوکسان (۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) به‌همراه ACPA (۵، ۱/۲۵، ۰/۱۲۵ ng/rat) موجب تداخل در OAT٪ [F(۵۶,۳)=۷/۲۶, P<۰/۰۰۱] شده ولی بر OAE٪ [F(۵۶,۳)=۰/۷۱, P>۰/۰۵] و فعالیت حرکتی [F(۵۶,۳)=۰/۶۷, P>۰/۰۵] تأثیر معنی‌داری نداشت. تداخل اثر مورفین و نالوکسان هر دو نشان‌دهنده این امر هستند که CB1 در آمیگدال مرکزی می‌تواند در اثر ضد اضطرابی اُپیوئیدها، دخیل باشد.



شکل ۳. اثر AM251 داخل آمیگدال با یا بدون مورفین و نالوکسان صفاقی بر اضطراب در موش صحرایی.

AM251 (۵، ۲۵، ۵۰ ng/rat)، ۵ دقیقه قبل از آزمایش و مورفین (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ۲۵ دقیقه قبل از AM251 و نالوکسان (۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) ۱۰ دقیقه قبل از AM251 تزریق شد. نتایج بر اساس میانگین $\pm$ خطای استاندارد و با استفاده از آنالیز واریانس دوطرفه تعیین شده N=۸. *P<۰/۰۵ در مقایسه با سالین. ++P<۰/۰۱، +++P<۰/۰۰۱ در مقایسه با مورفین (۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم) یا نالوکسان (۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

بمط

Elevated Plus-Maze یک مدل انتخابی برای تعیین اثرات اضطراب‌زا و ضد اضطراب در جوندگان است (۳۶). گزارش شده که کانابینوئیدها در آزمایش‌های مختلف پاسخ رفتاری حیوان را تغییر می‌دهند (۹).

هسته مرکزی آمیگدال، که منطقه مهمی در ایجاد و تعدیل اضطراب به‌شمار می‌رود، پیام‌هایی را از آمیگدال بازولترال دریافت می‌کند و خود نیز این پیام‌ها را به مناطق هدف پایین‌تر که واسطه بسیاری از رفتارهای اتونومیک و الکتروفیزیولوژیک حاصل از ترس و اضطراب هستند می‌رساند (۳۳). برخی از مطالعات درگیری سیستم اویپوئیدی در تنظیم رفتار ترس یا اضطراب را نشان می‌دهند. مثلاً شوک (استرس) حاد و غیرقابل کنترل موجب افزایش ترشح پپتیدهای اویپوئیدی در موش‌های صحرایی می‌شود (۳۷). ضمناً گزارش شده که در مطالعات بالینی، برخی از بیماران طی دریافت مورفین علایم ازدیاد تحریک و هیجان را اعلام کرده‌اند (۳۸). نتایج حاصل از مطالعه ما نشان‌دهنده آن است که مورفین در مدل اضطرابی EPM اثر ضد اضطراب نشان می‌دهد و نالوکسان نیز در همین مدل در مطالعه ما اضطراب ایجاد کرد. مطالعات قبلی نیز یافته ما را تأیید می‌کند. بدین‌صورت که گزارش شده تزریق داخل صفاقی (۳۹، ۲۷) و داخل آمیگدال (۲۶) مورفین در موش صحرایی و سوری اثر ضد اضطراب ایجاد می‌کند.

اطلاعات به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که تزریق داخل آمیگدال ACPA که آگونیست انتخابی گیرنده CB1 است، بدون هیچ‌گونه اثری بر فعالیت حرکتی، اثر ضد اضطراب ایجاد نموده است. اثر ضد اضطراب ACPA به کمک افزایش معنی‌دار درصد زمان حضور در بازوهای باز و همچنین درصد دفعات ورود به بازوهای باز، مشخص شد. البته به‌نظر می‌رسد که درصد زمان ورود در بازوهای باز از حساسیت بیشتری نسبت به درصد تعداد دفعات ورود به بازوهای باز، برای تعیین اثرات اضطرابی دارو برخوردار است (۳۵). چندین مطالعه نیز نتایج ما را تأیید می‌کنند و نشان‌دهنده اثرات

ضد اضطراب آگونیست‌های گیرنده کانابینوئیدی می‌باشند. مثلاً دوزهای پایین نابیلون و CP55940 [40] و $\Delta 9$ -THC [21] که هر سه آگونیست‌های گیرنده CB1 کانابینوئیدی می‌باشند در مدل‌های اضطرابی مختلف اثر ضد اضطراب نشان داده‌اند و برخی مطالعات نیز بر خلاف نتایج ما را نشان می‌دهند، مثلاً گزارشی در دست است که نشان می‌دهد $\Delta 9$ - تتراهیدروکانابینول ($\Delta 9$ -THC) که یک آگونیست غیرانتخابی کانابینوئیدی است (۴۱) و آناندامید که یک لیگاند اندوژن کانابینوئیدی است (۴۲)، موجب افزایش حضور موش صحرایی و سوری در بازوهای بسته می‌شود که نشان‌دهنده اثر اضطراب‌زای آن می‌باشد. همچنین تجویز داخل صفاقی CP55940 که یک آگونیست گیرنده کانابینوئیدی است، اثر اضطراب‌زا ایجاد می‌کند (۴۳). علاوه بر این در مطالعات انسانی نیز اضطراب از اثرات ناخواسته مصرف کانابینوئیدها گزارش شده که یکی از علل قطع مصرف آن‌ها به‌شمار می‌رود (۴۴).

تفاوت گونه‌ها نیز در نوع اثر کانابینوئیدها بر رفتار حیوان اهمیت دارند. مثلاً در موش‌های صحرایی نژاد Lewis، $\Delta 9$ -THC اثر پاداشی دارد درحالی‌که در بقیه گونه‌ای موش‌های صحرایی، از قبیل ویستار اثر اضطراب‌زا دارد (۴۵). همچنین گزارش شده که توزیع گیرنده‌های کانابینوئیدی در مغز موش‌های صحرایی نژاد ویستار و لوویس متفاوت می‌باشد (۴۶). با توجه به این گزارشات به‌نظر می‌رسد که دوز آگونیست کانابینوئیدی و گونه حیوان آزمایشگاهی نقش مهمی در تغییر وضعیت اضطرابی توسط کانابینوئیدها دارد. نتایج حاصل از مطالعه ما نشان داد که تجویز داخل آمیگدال AM251 که یک آنتاگونیست انتخابی گیرنده CB1 کانابینوئیدی است تأثیر معنی‌داری بر فاکتورهای اضطرابی مهم یعنی، زمان حضور در بازوهای باز و همچنین تعداد ورود به این بازوها نداشت و فقط در برخی دوزها موجب کاهش فعالیت حرکتی حیوان شد. به‌نظر می‌رسد که این امر نشانگر این است که گیرنده‌های کانابینوئیدی، گیرنده غالب در آمیگدال مرکزی نیستند و به‌همین علت است که آنتاگونیست با وجود اثر بر فعالیت حرکتی اثری بر زمان حضور و تعداد ورود به بازوهای باز ندارد. البته گزارشات ضد و نقیضی در

باز و همچنین تعداد ورود به بازوی باز و فعالیت حرکتی شد. که این امر نیز نشان‌دهنده تداخل مورفین و سیستم کانابینوئیدی است. مطالعات دیگری نیز شباهت‌های دو سیستم اوپیوئیدی و کانابینوئیدی را نشان داده‌اند (۱۴، ۱۵). و همین‌طور برخی پژوهش‌ها تداخل این دو سیستم را به اثبات رسانیده‌اند که تأییدکننده ادعای ما در این پژوهش است (۱۴). تداخل میان این دو سیستم در اثر ضد درد و لרزش (۱۹) نیز به اثبات رسیده است. در مطالعه حاضر تجویز ACPA به همراه مورفین موجب افزایش %OAE و فعالیت حرکتی شد و از طرف دیگر پاسخ ACPA با تجویز همراه با نالوکسان کاهش یافت. بنابراین، این نتایج نشان می‌دهند که گیرنده‌های اوپیوئیدی در آمیگدال مرکزی احتمالاً با تداخل در گیرنده CB1 کانابینوئیدی اثر ضد اضطراب ایجاد می‌کند.

نتیجه گیری

نتایج بیان‌گر آن است که گیرنده‌های CB1 اثر ضد اضطرابی ایجاد می‌کنند. همچنین این نتایج نشان می‌دهند که سیستم اوپیوئیدی با گیرنده‌های کانابینوئیدی در آمیگدال مرکزی تداخل دارد.

این مورد در دست است. مثلاً تزریق داخل هیپوکمپ AM251 [47] و SR141716A [2] موجب کاهش اضطراب می‌شود. البته در اغلب گزارشات کانابینوئیدها اضطراب‌زا گزارش شده‌اند (۲). در بخش دیگری از این پژوهش تداخل احتمالی مورفین و همچنین نالوکسان با اثر ضد اضطراب ACPA مورد بررسی قرار گرفت. تجویز مورفین صفاقی همراه با ACPA داخل آمیگدال موجب تغییر معنی‌داری در زمان حضور در بازوهای باز نشد ولی به صورت معنی‌داری تعداد دفعات ورود به بازوهای باز و فعالیت حرکتی را افزایش داد. البته چون فعالیت حرکتی نیز افزایش یافته است لذا این احتمال وجود دارد که افزایش تعداد دفعات ورود به بازوهای باز به علت افزایش فعالیت حرکتی باشد. ولی به طور کلی افزایش تعداد ورود به بازوهای باز نشان‌دهنده وجود تداخل بین این دو سیستم یعنی اوپیوئیدی و کانابینوئیدی است. تجویز نالوکسان صفاقی همراه با ACPA داخل آمیگدال نیز موجب تغییر معنی‌داری در %OAT شد ولی تغییر معنی‌دار در %OAE و فعالیت حرکتی ایجاد نکرد، لذا تغییر معنی‌دار در %OAT به عنوان تداخل بین دو سیستم اوپیوئیدی و کانابینوئیدی تفسیر می‌گردد. تجویز مورفین صفاقی همراه با AM251 داخل آمیگدال نیز به صورت معنی‌داری موجب کاهش زمان حضور در بازوی

References:

1. Howlett AC, Barth F, Bonner TI, Cabral G, Casellas PD, WA, Felder CC, Onaivi ES, Green MR, Martin BR. Pharmacological Characterization of Cannabinoids in the Elevated Plus-Maze. *J Pharmacol Exp. Ther* 1998;285:813-19.
2. Rodgers RJ, Haller J, Halasz J, Mikics E. One-Trial Sensitization to the Anxiolytic-Like Effects of Cannabinoid Receptor Antagonist SR141716A in the Mouse Elevated Plus-Maze. *Eur J Neurosci* 2005;17:1279-86.
3. Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. Distribution of Neuronal Cannabinoid Receptor in the Adult Rat Brain: a Comparative Receptor Binding Radioautography and in Situ Hybridization Histochemistry. *Neuroscience* 1992;48:655-668.
4. Herkenham M, Mackie K, Martin BR, Mechoulam R, Pertwee RG, XXVII. International Union of Pharmacology. Classification of Cannabinoid Receptors. *Pharmacol. Rev* 2002;54:161-202.
5. Martin M, Ledent C, Parmentier M, Maldonado R, Valverde O. Involvement of CB1 Cannabinoid Receptors in Emotional Behavior. *Psychopharmacology* 2002;159:379-387.
6. Haller J, Bakos N, Szimay M, Ledent C, Freund TF. The Effects of Genetic and Pharmacological Blockade of the CBI Cannabinoid Receptor on Anxiety. *Eur J Neurosci* 2002;16:1395-8.
7. Valjent E, Mitchell JM, Besson MJ, Caboche J, Maldonado R. Behavioural and Biochemical Evidence for Interaction between A^v-Tetrahydrocannabinol and Nicotine. *Br J Pharmacol* 2002;135:564-78.
8. Rodriguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF, Weiss F. Activation of Corticotropin-Releasing Factor in the Limbic System During Cannabinoid Withdrawal. *Science* 1997;276:2050-4.
9. Arevalo C, De Miguel R, Hernandez-Tristan R. Cannabinoid Effects on Anxiety-Related Behaviors and Hypothalamic Neurotransmitters. *Pharmacol Biochem Behav* 2001;70:123-31.
10. Navarro M, Hernandez E, Munoz RM, et al. Acute Administration of CB1 Cannabinoid Receptor Antagonist SR 141716A Induces Anxiety-Like Responses in the Rat. *Neuroreport* 1997;8:491-6.
11. McGregor IS, Dastur FN, McLellan RA, Brown RE. Cannabinoid Modulation of Rat Pup Ultrasonic Vocalizations. *Eur Pharmacol* 1996;13:43-9.
12. Akinshola BE, Chakrabarti A, Onaivi ES. In Vitro and In vivo Action of Cannabinoids. *eurochem Res* 1999;24:1233-40.
13. Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, atson SJ. Immunohistochemical Localization of the Cloned Mu Opioid Receptor in the Rat CNS. *J Chem Neuroanat* 1995;8:283-305.
14. Manzanares J, Corchero J, Romero J, ernandez Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA. Pharmacological and Biochemical Interaction Between Opioids and Cannabinoids. *TIPS* 1999;20:287-294.
15. Parolaro D, Massi R, Rubino T, Monti E. Endocannabinoids in the Immune System and Cancer. *Prostaglandins, Leukot Essent. Fat Acids* 2002;66:319-332.
16. Navarro M, Carrera MR, Fratta W, Valverde O, Cossu G, Fattore L, Chowen JA, Gomez R, Villanua MA, Maldonado R, Koob GF, Rodriguez DF. Functional Intraction Between Opioid and Cannabinoid Receptors in Drug Self Administration. *J Neurosci* 2001;5344-5350.
17. Fattore L, Spano MS, Cossu G, Deiana S, Fratta W. Cannabinoid Mechanism in Reinstatement of Heroin-Seeking after a Long Period of Abstinence in Rats. *Eur J Neurosci* 2003;17:1723-1726.
18. Rubino T, Tizzoni L, Vigano D, Massi P, Parolaio D. Modulation of Rat Brain Cannabinoid Receptors after Chronic Morphine Treatment. *Neuroreport* 1997;8:3219-3223.
19. Ghozland S, Matthes HW, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL, Maldonado R. Motivational Effects of Cannabinoids are Mediated by Mu-Opioid and Kappa-Opioid Receptors. *J Neurosci* 2002;22:1146-1154.
20. Braidia D, Pozzi M, Parolaro D, Sala M, Intracerebral Self-Administration of the Cannabinoid Receptor Agonist CP 55, 940 in the Rat: Interaction with the Opioid System. *Eur J Pharmacol* 2001;413:227-234.
21. Berrendero F, Maldonado R. Involvement of the Opioid System in the Anxiolytic-Like Effects Induced by A^v-Tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology* 2002;163:111-17.
22. Massi P, Vaccani A, Romorini S, Parolaro D. Comparative Characterization in the Rat of the Interaction between Cannabinoids and Opiates for their Immunosuppressive and Analgesic Effects. *J Neuroimmunol* 2001;117:116-124.
23. Thompson RC, Mansour A, AMI H, Watson SJ. Cloning and Pharmacological Characterization of a Rat Mu Opioid Receptor. *Neuron* 1993;11:903-913.
24. Bloom AS, Dewey WL. A Comparison of Some Pharmacological Actions of Morphine and Delta9-Tetrahydrocannabinol in the Mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 1978;57:243-248.
25. Dewey WL. Cannabinoid Pharmacology. *Pharmacol Rev* 1986;38:151-178.
26. Good AJ, Westbrook RF. Effects of a Microinjection of MorPhine into the Amygdala on the Acquisition and Expression of Conditioned

- Fear and Hypoalgesia in Rats. *Behav Neurosci* 1995;109:631-641.
27. Shin IC, Kirn HC, Swanson J, Hong JT, Oh KW. Anxiolytic Effects of Acute Morphine Can be Modulated by Nitric Oxide Systems. *Pharmacology* 2003;68:183-189.
28. Zhang HT, Xu ZM, Luo ZP, Qin BY. Anxiogenic Effect of Naltrexone in Social Interaction Test in Rats. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 1996;17:314-317.
29. Pugh G, Smith RB, Dombrowsky DS, Welch SP. The Role of Endogenous Opioids in Enhancing the Antinociception Produced by the Combination of A Tetrahydrocannabinol and Morphine in the Spinal Cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279:608-616.
30. Pugh G Jr, Mason DJ Jr, Combs V, Welch SP. Involvement of Dynorphin B in the Antinociceptive Effects of the Cannabinoid CP 55, 940 in the Spinal Cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1997;281:730-737.
31. Bidaut-Russell M, Hewlett AC. Cannabinoid Receptor-Regulated Cyclic AMP Accumulation in the Rat. Striatum. *J Neurochem* 1991;57:1769-1773.
32. Childers SR, Fleming L, Konkoy C, Marckel D, Pacheco M, Sexton T, Ward S. Opioid and Cannabinoid Receptor Inhibition of Adenylyl Cyclase in Brain. *Ann N Y Acad Sci* 1992;654:33-51.
33. Walker DL, Toufexis DJ, Davis M. Role of the Bed Nucleus of the Stria Terminalis Versus the Amygdala in Fear, Stress and Anxiety. *Eur J Pharmacol* 2003;463:199-216.
34. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press; 1998.
35. Ahn DK, Kirn KH, Ju JS, Kwon S, Park JS. Microinjection of Arginine Vasopressin into the Central Nucleus of Amygdala Suppressed Nociceptive jaw Opening Reflex in Freely Moving Rats. *Brain Res Bull* 2001;55:117-121.
36. Pellow S, File SE. Anxiolytic and Anxiogenic Drug Effects on Exploratory Activity in an Elevated Plus-Maze: a Novel Test of Anxiety in the Rat. *Pharmacol. Biochem Behav* 1986;24:525-529.
37. Madden J, Akil H, Patrick RI. Stress Induced Parallel Changes in Central Opioid Levels and Pain Responsiveness in the Rat. *Nature* 1977;265:358-360.
38. Bremner JD, Southwick SM, Darnell A. Chronic PTSD in Vietnam Combat Veterans: Course of Illness and Substance Abuse. *Amer J Psychiatry* 1996;153:369-375.
39. Zarrindast MR, Rostami P, Zarei M, Roohbakhsh A. Intracerebroventricular Effects of Histaminergic Agents on Morphine-Induced Anxiolysis in the Elevated Plus-Maze in Rats. *Basic and Clinical Pharmacol & Toxicol* 2005;97:276-28.
40. Genn RF, Tucci S, Marco E, Viveros MP, File SE. Anxiolytic and Anxiogenic Effects of the Cannabinoid Agonist CP55, 940 in Animal Tests of Anxiety. *Psychopharmacology* 2003;17:A27.
41. Chaperon F, Thiebot MH. Behavioral Effects of Cannabinoid Agents in Animals. *Crit. Rev Neurobiol* 1999;13:243-81.
42. Ciiakrabarti A, Ekuta JE, Onaivi ES. Neurobehavioral Effects of Anandamide and Cannabinoid Receptor Gene Expression in mice. *Brain Res. Bull* 1998;45:67-74.
43. Genn RF, Tucci S, Marco EM, Viveros MP, File SE. Unconditioned and Conditioned Anxiogenic Effects of the Cannabinoid Receptor Agonist CP55,940 in the Social Interaction Test. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;77:567-73.
44. Hall W, Solowij N. Adverse Effects of Cannabis. *Lancet* 1998;352:1611-16.
45. McGregor IS, Issakidis CN, Prior G. Aversive Effects of the Synthetic Cannabinoid CP55, 940 in Rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;53:657-64.
46. Arnold JC, Topple AN, Mailer PE, Hunt GE, McGregor IS. The Distribution of Cannabinoid-induced Fos Expression in Rat Brain: Differences Between the Lewis and Wistar Strain. *Brain Res* 2001;921:240-55.

*Mechanism of the Interaction of Cannabinoid System in Central Amygdale with Opioid System*S. Sarahroodi¹Pharm.D* A. Arzi PhD** M.R. Zarrindast PhD*** M.J Khodayar PhD****

* Resident of pharmacology, Faculty of Medical, Ahwaz Jondishapour University of Medical Sciences

** Professor of pharmacology, Faculty of Pharmacy, Ahwaz Jondishapour University of Medical Sciences

*** Professor of pharmacology, Faculty of Medical, Tehran University of Medical Sciences

**** Assistant Professor of pharmacology, Faculty of Pharmacy, Ahwaz Jondishapour University of Medical Sciences

Background and objective

Cannabinoids which are active compounds of marijuana show some pharmacological effects similar to the opioids. There are also functional interactions between both cannabinoid and opioid systems. In this study we investigated the role of cannabinoid receptors in central amygdala and its interaction with opioid system.

Methods

In the present study, we investigated the effects of intraperitoneal injection of opioid drugs on response-induced by intra-amygdala (intra-Amyg) microinjection of cannabinoid agents in rats, using elevated plus-maze test of anxiety.

Results

Intraperitoneal injection of morphine (3, 6 and 9 mg/kg) increased %OAT and %OAE, but not locomotor activity, showing an anxiolytic response. However, some doses of the opioid receptor antagonist, naloxone reduced %OAT and locomotor activity as well. Intra-Amyg administration of CB1 cannabinoid receptor agonist, ACPA (at the dose of 1.25 and 5 ng/rat) increased %OAT and %OAE but not locomotor activity, thus showing an anxiolytic response, which was increased by morphine (6 mg/kg, i.p.) without any interaction. Naloxone also reduced ACPA effects.

Intra-Amyg administration of CB1 cannabinoid receptor antagonist, AM251 (2.5, 25 and 100 ng/rat) did not alter %OAT and %OAE but higher doses of drug (25 and 100 ng/rat) reduced locomotor activity. However, the drug in combination of morphine anxiolytic response and with naloxone decreased anxiety.

Conclusion

The results may indicate an anxiolytic for CB1 cannabinoid. Our results also showed that opioid system may have interaction with cannabinoid receptor in the amygdale.

Keywords: Cannabinoids, Morphine; Naloxone, Anxiety, Elevated Plus-Maze

Corresponding Author: Resident of pharmacology, Faculty of Medical, Ahwaz Jondishapour University of Medical Sciences

Email:sarahroodi@yahoo.com

¹. Qom University of Medical Sciences