

Research Paper

Dual Effects of Exposure Therapy and Cannabis Sativa Extract on Extinction of Conditioned Fear Memory in PTSD Male Rats

Forough Afshar¹, *Kataneh Abrari², Iran Goudarzi³

1. MSc., Department of General Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.

2. Assistant Professor, Department General Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.

3. Associate Professor, Department General Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.

Citation: Afshar F, Abrari K, Goudarzi I. [Dual Effects of Exposure Therapy and Cannabis Sativa Extract on Extinction of Conditioned Fear Memory in PTSD Male Rats (Persian)]. Journal of Sabzevar University of Medical Sciences. 2016; 23(4): 550-559.



Received: 22 Apr. 2016

Accepted: 14 Aug. 2016

ABSTRACT

Backgrounds Posttraumatic stress disorder is a severe anxiety disorder caused by exposure to traumatic events. Traumatic memory impairment is one of the clinical signs of this disorder. Cannabis sativa is full of cannabinoid compounds that are effective on memory extinction. We evaluated the combined effects of Cannabis leave extract and exposure therapy on memory extinction in this disease.

Methods & Materials Modified single prolonged stress model was used to induce PTSD. A week later, rats were placed in a shock chamber and received a shock. After 24 hours, for the first time exposure, rats were returned to the chamber for 9 minutes, without receiving any footstock. Two other exposures were performed with one day interval. Cannabis leave extract (at three different doses) was injected 30 minutes before exposures. 14 days later, for fear memory evaluation, again rats were placed in the chamber. In order to evaluate the participation of cannabinoid system in the effects of cannabis, second experiment was accomplished. Effective dose of cannabis extract and cannabinoid receptor antagonist (Rimonabant) were simultaneously injected, as in the first experiment.

Results Results of the first experiment showed that 25 mg/kg cannabis leave extract significantly decreased the percent of freezing as compared to control group. In the second experiment, percent of freezing in rats treated with extract and antagonist increased as compared to related control group.

Conclusion Simultaneous treatment with exposure therapy and cannabis leave extract, with 25 mg/kg dosage, intensely led to condition memory extinction. Maybe this kind of treatment enhanced and consolidated the memory extinction by affecting cannabinoid system through CB1 receptor.

Keywords:

Post-traumatic stress disorder, Cannabis sativa, Extinction, Implosive therapy

* Corresponding Author:

Kataneh Abrari, PhD

Address: Department Biology, School of Biology, Damghan University, Damghan, Iran.

Tel: +98 (912) 7909563

E-mail: abrari@du.ac.ir

اثر توأم مواجهه‌درمانی و عصاره آبی برگ گیاه شاهدانه (Cannabis Sativa) بر خاموشی ترس شرطی در موش صحرایی نر مبتلا به «اختلال استرس پس از سانحه»

فروغ افشار^۱، کتانه ابراری^۲، ایران گودرزی^۳

۱- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی عمومی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست‌شناسی عمومی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.

۳- دانشیار، گروه زیست‌شناسی عمومی، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه دامغان، دامغان، ایران.

چکیده

تاریخ دریافت: ۳ اردیبهشت ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: ۲۴ مرداد ۱۳۹۵

اهداف: اختلال استرس پس از سانحه از اختلالات شایع اضطرابی است که پس از یک حادثه آسیب‌زای شدید بروز می‌کند. یکی از علائم بالینی بیماری اختلال در خاموشی حافظه ترومایی است. برگ گیاه شاهدانه سرشار از ترکیبات کannabinoidی است که در خاموشی حافظه مؤثر هستند. هدف از این مطالعه بررسی اثر توأم تزریق درون‌صفافی عصاره برگ شاهدانه و اثر مواجهه‌درمانی بر خاموشی حافظه در این بیماری است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش القای اختلال استرس پس از سانحه با کمک مدل تقویت‌شده تک‌استرس طولانی مدت انجام شد. یک هفته بعد حیوانات در دستگاه ترس شرطی یک شوک الکتریکی دریافت کردند. یک روز بعد از دریافت شوک برای مواجهه اول، مجدداً به مدت ۹ دقیقه در دستگاه ترس شرطی بدون دریافت شوک قرار داده شدند. دو مواجهه دیگر با فاصله ۲۴ ساعت از هم انجام شد. تزریق عصاره برگ شاهدانه (سه دُز) ۳۰ دقیقه قبل از مواجهه‌ها صورت گرفت. ۱۴ روز بعد، حیوانات بدون دریافت دارو بار دیگر در دستگاه قرار گرفتند تا حافظه ترس در آن‌ها ارزیابی شود. به‌منظور بررسی نقش سیستم کannabinoidی در اثرات شاهدانه، آزمایش دوم با تزریق هم‌زمان دُز مؤثر عصاره شاهدانه و آنتاگونیست کannabinoidی مشابه آزمایش اول انجام شد.

یافته‌ها: ارزیابی میزان خاموشی حافظه در آزمایش اول نشان داد عصاره برگ شاهدانه با دُز ۲۵ mg/kg به‌طور معناداری درصد بی‌حرکتی را در مقایسه با گروه کنترل کاهش می‌دهد. در آزمایش دوم میزان بی‌حرکتی در گروه دریافت‌کننده عصاره و آنتاگونیست نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری داشت.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد کاربرد توأم مواجهه‌درمانی و عصاره برگ شاهدانه با دُز ۲۵ mg/kg منجر به خاموشی شدید حافظه ترس شرطی شده می‌شود. این تیمار احتمالاً از طریق سیستم کannabinoidی و با تأثیر بر گیرنده CB1، منجر به تقویت و تثبیت خاموشی حافظه می‌شود.

کلیدواژه‌ها:

اختلال استرس پس از سانحه، شاهدانه، خاموشی حافظه، مواجهه‌درمانی

پس از سانحه^۱ می‌کند [۱، ۲].

اختلالات حافظه از ویژگی‌های برجسته بیماری فشار روانی پس از سانحه و یکی از علائم تشخیصی آن است. مطالعات بالینی بیماران مبتلا به این اختلال نشان داد این بیماران دو اختلال مهم در رابطه با حافظه دارند؛ اول تجربه مجدد و مداوم وقایع ترومایی و دوم اجتناب از محرک‌هایی که موجب تروما شده‌اند، حتی در صورتی که بیماران به این تشخیص رسیده باشند که واقعه ترومایی تکرار نخواهد شد [۳].

بیماران خاطرات ناخونده حادثه ترومایی را دائماً یادآوری می‌کنند (عدم فراموشی یا تثبیت مجدد) و توانایی به‌خاطر آوردن

مقدمه

افراد همواره و به‌طور طبیعی در مواجهه با خطرات و حوادث هراسان هستند. این حوادث باعث استرس و نگرانی در فرد می‌شود. بسیاری از افراد مدت کوتاهی بعد از وقوع حادثه به حالت طبیعی خود برمی‌گردند، ولی اگر حس آشفتگی و اضطراب حداقل دو تا چهار هفته پایدار بماند این افراد به بیماری اضطرابی تحت عنوان «واکنش استرس حاد» مبتلا می‌شوند. به تناسب شدت عوامل آسیب‌رسان و استرس‌زا، شدت و دوام علائم بیشتر خواهد شد. پایداری علائم اضطرابی بیش از یک ماه افراد را درگیر دسته دیگری از بیماری‌های اضطرابی تحت عنوان «فشار روانی

1. Post-Traumatic Stress Disorder (PTSD)

* نویسنده مسئول:

دکتر کتانه ابراری

نشانی: دامغان، دانشگاه دامغان، دانشکده زیست‌شناسی، گروه زیست‌شناسی عمومی.

تلفن: ۰۹۵۶۳۰۹۸۶۳ (۹۱۲) ۹۸

پست الکترونیکی: abrari@du.ac.ir

قلبی عروقی، آرتريت، پوکی استخوان، سرطان، آزالایمر و پارکینسون شود. این یک درمان طبیعی است که کاهش سطح اندوکannabinoid با جایگزین کردن آن به وسیله منابع خارجی cannabinoid جبران شود [۸، ۹].

در سال‌های اخیر نقش سیستم cannabinoidی و اندوکannabinoid (cannabinoid درونی) در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مثل اختلالات ذهنی و ترس مورد توجه قرار گرفته است. برخی مطالعات نشان داده است بلوک کردن فارماکولوژیکی گیرنده‌های CB₁ cannabinoid، خاموشی ترس شرطی شده و حافظه فضایی را در جوندگان کاهش می‌دهد [۱۰، ۱۱].

حضور cannabinoidها و اندوکannabinoidها در قشر خاکستری و آمیگدال در شرایط استرس‌زا که طی خاموشی حافظه ترس آزاد می‌شوند، نقش این سیستم را در خاموشی حافظه ترس تأیید می‌کند [۱۰]. سیستم cannabinoid به عنوان تعدیل‌کننده نورونی می‌تواند برای درمان اختلالات مربوط به فشار روانی پس از سانحه یا بیماری‌های اضطرابی دیگر مفید باشد.

هدف از انجام این تحقیق بررسی اثر عصاره برگ گیاه شاهدانه^۳ بر فراموشی حافظه ترس شرطی شده ناشی از القای فشار روانی پس از سانحه در موش‌های نر است. در این پژوهش با استفاده از خاصیت تعدیل‌کننده نورونی سیستم cannabinoid و به کارگیری آن بلافاصله پس از سانحه، یکی از راه‌های درمان اختلال حافظه فشار روانی پس از سانحه در حیوان آزمایشگاهی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم استفاده شد. حیوانات در سیکل روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته و دمای ۲۲ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد و میزان آب و غذای کافی نگهداری شدند. اصول اخلاقی کار روی حیوانات بر اساس دستور کار کمیته اخلاقی دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان رعایت شد.

در این تحقیق از عصاره برگ گیاه شاهدانه و آنتاگونیست^۴ (SML۰۸۰۰ sigma) و سالیین و دی‌متیل‌سولفوکسید به ترتیب به عنوان حلال عصاره و آنتاگونیست استفاده شد. عصاره گیاه در آزمایشگاه عصاره‌گیری دانشگاه علوم پزشکی سبزوار، از گیاهان

جنبه‌های مهمی از خاطرات مربوط به تروما را ندارند [۴].

شاهدانه^۲ گیاهی یک‌ساله، دوپایه گل‌دار با برگ‌های قطره‌ای است. از بخش‌های مختلف این گیاه مشتقات فراوانی گرفته می‌شود. از جمله ماری‌جوانا و حشیش که به ترتیب از گل و صمغ گیاه شاهدانه به دست می‌آید. از این گیاه تاکنون بیش از ۴۸۳ ماده شیمیایی به دست آمده است. سه ماده اصلی که از آن تهیه می‌شوند عبارتند از: ماری‌جوانا (از جوانه و برگ) و حشیش (صمغ متراکم و خشک‌شده گل) و روغن حشیش (از گل).

گیاه شاهدانه ترکیبی منحصر به فرد از ترکیبات ترپنوفلی به نام cannabinoid تولید می‌کند که شامل حداقل ۸۵ نوع cannabinoid می‌شود. فراوان‌ترین آن‌ها دلتا ۹ تتراهیدروکannabinول و کانبیدیول است. تأثیر ترکیبات مختلف عصاره به شدت به مقدار و مدت مصرف بستگی دارد. اثر درمانی آن در درمان بیماری‌های آزالایمر، آب سیاه، صرع، افسردگی، بیماری‌های دوقطبی و نورولوژیک، التهاب، تنگی نفس و غیره گزارش شده است.

دو زیرگروه شناخته‌شده از گیرنده‌های cannabinoid به نام‌های CB₁ و CB₂ وجود دارد [۵، ۶]. CB₁ به طور عمده در سیستم عصبی (نخاع، ساقه مغز، مغز میانی، هیپوکمپ، آمیگدال، هیپوتالاموس، قشر مغز، مخچه و جسم مخطط)، بافت هم‌بند، غدد جنسی، غدد و اندام‌ها یافت می‌شود. CB₂ به طور عمده در بافت‌های محیطی مانند سیستم ایمنی بدن یافت می‌شود. البته این گیرنده‌ها در سلول‌های گلیال مانند آستروسیت‌ها و میکروگلیاها به مقدار ناچیز حضور دارند [۷].

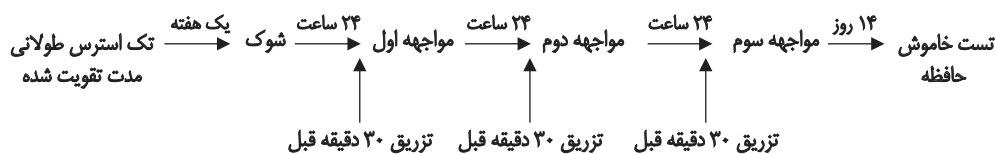
cannabinoidها در محل آسیب‌دیده بافت از آزادسازی مواد التهاب‌زای سلول‌های ایمنی جلوگیری می‌کند. همچنین سیستم ایمنی، سیستم عصبی مرکزی، سیستم قلبی‌عروقی، سیستم تولید مثل، دستگاه گوارش و ادراری حاوی گیرنده‌های cannabinoidی هستند و با cannabinoidها تنظیم می‌شوند. ساقه مغز که در فعالیت‌های حیاتی و تنفسی نقش تنظیمی دارد تحت تأثیر cannabinoidها قرار نمی‌گیرد، به همین علت برخلاف مواد مخدر دیگر حتی در دزهای بالا تنفس را سرکوب نمی‌کند [۸، ۹].

کاهش تولید اندوکannabinoid می‌تواند باعث توسعه بیماری‌های وابسته به سن و تحلیل‌رونده از قبیل آترواسکلروز و بیماری‌های

3. Cannabis Sativa

4. Rimonabant Hydrochloride

2. Cannabis



دانشگاه علوم پزشکی سبزوار

تصویر ۱. ارزیابی عملکرد آنتاگونیست cannabinoidی (Rimonabant) بر اثرات عصاره برگ شاهدانه بر خاموشی حافظه ترس شرطی شده.

به صورت درصد با استفاده از نسخه ۳ نرم‌افزار EthoVision که به دستگاه متصل شده بود، محاسبه شد.

مدل القای فشار روانی پس از سانحه به روش تک‌استرس طولانی‌مدت تقویت‌شده چهار مرحله دارد. در این مدل حیوانات دو ساعت در مقیدکننده بی‌حرکت شدند، بلافاصله بعد از خروج از مقیدکننده برای شنای اجباری به مدت ۲۰ دقیقه در ظرفی استوانه‌ای قرار گرفتند، ۱۵ دقیقه بعد از اتمام شنا با دی‌اتیل‌اتر بیهوش شدند و در آخرین مرحله ۱۵ دقیقه بعد از بیهوش آمدن، با سیستم ترس شرطی شوک الکتریکی دریافت کردند.

در این تحقیق به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از میانگین \pm خطای استاندارد استفاده شده است. تحلیل داده‌های آماری به کمک نسخه ۱۶ نرم‌افزار SPSS انجام شد. ارزیابی داده‌ها با توجه به توزیع پارامتریک داده‌ها با کمک آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام شد. آزمون تک‌میلی LSD برای بررسی وجود تفاوت معنادار بین گروه‌های آزمایشی انجام شد. ملاک معنادار بودن داده‌ها $P < 0/05$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج آزمایش اول

ارزیابی اثر دُزهای مختلف عصاره برگ گیاه شاهدانه بر اکتساب خاموشی حافظه ترس شرطی شده از نتایج مواجهه نخست بود. تحلیل واریانس یک‌طرفه نشان داد از نظر میزان بی‌حرکتی تفاوت معناداری میان گروه‌ها وجود دارد [$F(4, 43) = 2/335, P = 0/044$]. آزمون تک‌میلی LSD نشان داد عصاره با دُز ۲۵ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به‌طور معناداری میزان بی‌حرکتی را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داده است ($P < 0/01$). همچنین بین این دُز با دُزهای ۱۲/۵ و ۵۰ و ۱۰۰ نیز تفاوت معناداری وجود دارد ($P < 0/05$) (تصویر شماره ۲).

ارزیابی اثر دُزهای مختلف عصاره برگ گیاه شاهدانه بر به‌خاطر‌آوری و تثبیت خاموشی حافظه ترس شرطی شده از نتایج مواجهه‌های دوم و سوم بود. در مواجهه دوم گروه‌های مختلف با هم تفاوت معناداری داشتند [$F(4, 43) = 2/676, P = 0/04$]. میزان بی‌حرکتی در گروهی که دُز ۲۵ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را دریافت کردند، کاهش معناداری در مقایسه با گروه کنترل داشت ($P < 0/01$) (تصویر شماره ۲).

در مواجهه سوم تفاوت معناداری از نظر میزان بی‌حرکتی مشابه آزمایش دوم مشاهده شد [$F(4, 43) = 6/38, P = 0/000$]. در این آزمایش نیز در گروه تیمار شده با دُز ۲۵ کاهش به وجود آمد ($P < 0/05$) (تصویر شماره ۲).

نتایج آزمایش خاموشی حافظه ترس شرطی

از نظر مقدار بی‌حرکتی بین گروه‌ها تفاوت معناداری وجود داشت

کاشته‌شده در گلخانه همان دانشگاه تهیه شد. برگ گیاه کاملاً خرد و عصاره آبی آن به روش سوکسله تهیه شد. برای این کار ۵۰ گرم پودر خشک برگ گیاه در کاغذ مخصوص کارتوش ریخته و به‌همراه ۴۵۰ سی‌سی آب مقطر (به عنوان حلال) در دستگاه سوکسله قرار داده شد. در پایان عصاره‌گیری، حلال از عصاره حذف شد.

تزریق داروها و حلال آن‌ها به صورت درون‌صفاقی انجام شد. عصاره برگ با دُزهای ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ و آنتاگونیست مذکور با دُز ۰/۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن به حیوانات تزریق شد. دُزهای عصاره و آنتاگونیست بر اساس مطالعات دیگران که درباره اثری مشابه بر سیستم عصبی بود، انتخاب شد [۱۴-۱۲]. مراحل تزریق در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است.

گروه‌های مختلف در دو آزمایش به شرح زیر است:

آزمایش اول: ارزیابی اثر عصاره برگ گیاه شاهدانه بر خاموشی حافظه ترس شرطی شده ناشی از القای فشار روانی پس از سانحه. حیوانات یک هفته پس از تجربه مدل تک‌استرس طولانی‌مدت تقویت‌شده شوک الکتریکی دریافت و سپس سه مواجهه را تجربه کردند. به این ترتیب که به مدت ۹ دقیقه بدون دریافت شوک در دستگاه شرطی قرار گرفتند. دو هفته پس از آخرین مواجهه، درصد بی‌حرکتی آن‌ها در ۹ دقیقه آزمایش خاموشی ارزیابی شد. حیوانات به پنج گروه تقسیم شدند. نیم ساعت قبل از مواجهه به هر گروه دُزهای مختلف عصاره یا سالیین تزریق شد.

آزمایش دوم (تصویر شماره ۱): ارزیابی عملکرد آنتاگونیست کانابینوئیدی (Rimonabant) بر اثرات عصاره برگ شاهدانه بر خاموشی حافظه-ترس شرطی شده. مراحل آزمایش دقیقاً مطابق آزمایش اول بود، با این تفاوت که دو تزریق پیاپی انجام شد. ابتدا دُز مؤثر عصاره که از بررسی نتایج آزمایش اول به دست آمد، تزریق شد و پس از پنج دقیقه آنتاگونیست با دُز ۰/۲ تزریق شد. حیوانات از نظر نوع ماده تزریقی به چهار گروه تقسیم شدند که عبارتند از: گروه دریافت‌کننده حلال‌های عصاره و آنتاگونیست (Saline+DMSO)، گروه دریافت‌کننده عصاره و حلال آنتاگونیست (Extract+DMSO)، گروه دریافت‌کننده سالیین و آنتاگونیست (Saline+antagonist) و گروه دریافت‌کننده عصاره و آنتاگونیست (Extract+antagonist).

از دستگاه ترس شرطی به منظور اعمال شوک الکتریکی و ارزیابی میزان حافظه ترومایی استفاده شد. این دستگاه شامل محفظه‌ای به شکل مکعب مستطیل از جنس پلاستیک شفاف به ابعاد ۴۵×۴۵×۴۷ سانتی‌متر است. ثبت میزان بی‌حرکتی^۵ حیوان (حذف همه اعمال حرکتی به‌جز حرکات تنفسی) با کمک دوربین به‌کاررفته در سقف این دستگاه انجام گرفت. افزایش میزان بی‌حرکتی نشان‌دهنده تشکیل حافظه ترومایی است. مدت زمانی که حیوان بی‌حرکت است نسبت به کل زمان قرارگیری در دستگاه

5. Freezing

نتایج در گروه عصاره با دُز ۱۲/۵

در گروه عصاره با دُز ۱۲/۵ بین آزمایش‌های اول تا چهارم تفاوت معناداری وجود نداشت [F(۳، ۳۶)=۰/۶۵۲، P=۰/۶۱۸] (تصویر شماره ۴).

نتایج در گروه عصاره با دُز ۲۵

در گروه عصاره با دُز ۲۵ بین آزمایش‌های اول تا چهارم تفاوت معناداری وجود داشت [F(۳، ۳۶)=۴/۱۸۵، P=۰/۰۱] در این گروه میزان بی‌حرکتی از آزمایش اول به چهارم کاهش معناداری داشت (P<۰/۰۱) (تصویر شماره ۴).

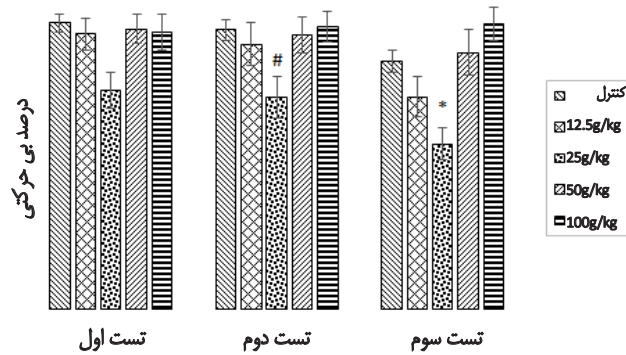
نتایج در گروه عصاره با دُز ۵۰

در گروه عصاره با دُز ۵۰ بین آزمایش‌های اول تا چهارم تفاوت

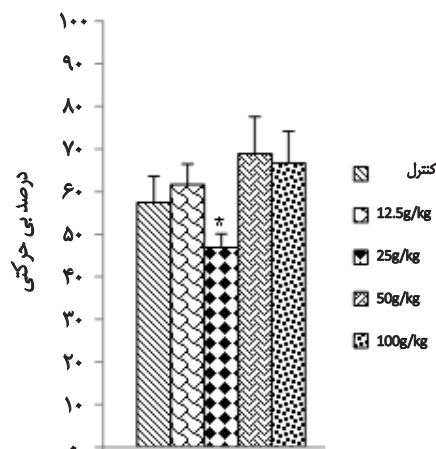
بین گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده دُز ۲۵ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن تفاوت معناداری وجود داشت، یعنی میزان بی‌حرکتی در گروهی که دُز ۲۵ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را دریافت کردند کاهش معناداری داشت (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۳). در آزمایش اول، آزمایش‌های اول تا چهارم هر گروه با خودش مقایسه شد. این مقایسه به منظور بررسی روند تغییر میزان بی‌حرکتی طی ۱۶ روز در هر گروه انجام شد.

نتایج در گروه کنترل

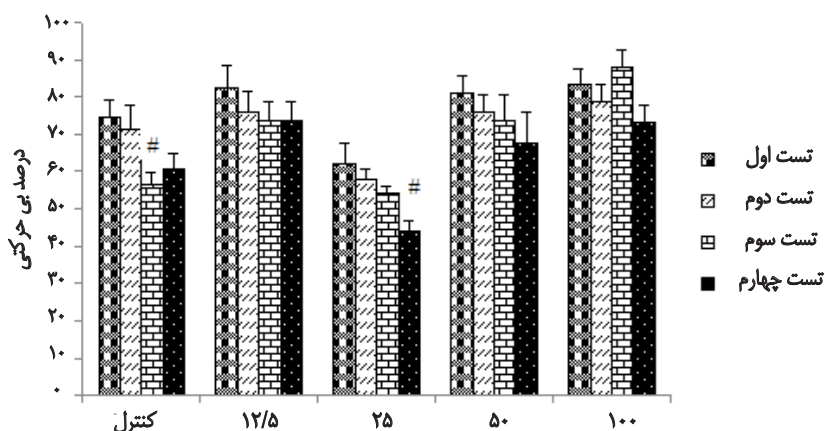
در گروه کنترل بین آزمایش‌های اول تا چهارم تفاوت معناداری وجود داشت [F(۳، ۳۶)=۲/۹۵۴، P=۰/۰۴۵] در گروه کنترل میزان بی‌حرکتی از آزمایش اول به سوم کاهش معناداری داشت (P<۰/۰۱). از آزمایش دوم به سوم نیز کاهش معنادار بود (P<۰/۰۵) (تصویر شماره ۴).



تصویر ۲. مقایسه میزان بی‌حرکتی گروه‌های مختلف آزمایشی در مواجهات اول تا سوم. نتایج به صورت Mean±SE ارائه شده است. #P<۰/۰۱ و *P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل.



تصویر ۳. نتایج آزمایش خاموشی حافظه ترس شرطی. نتایج به صورت Mean±SE ارائه شده است. *P<۰/۰۵ در مقایسه با گروه کنترل.



تصویر ۴. نتایج مقایسه درون گروهی در آزمایش اول. نتایج به صورت $Mean \pm SE$ ارائه شده است. $P < 0.05^*$ در مقایسه با آزمایش اول در گروه مربوطه.

مهر و آبان ۱۳۹۵، دوره ۲۳، شماره ۴

آنتاگونیست کانابینوئیدی^۶ بر اثر عصاره بر حافظه ترس است. مراحل انجام این آزمایش مشابه آزمایش اول بود، با این تفاوت که ۳۰ دقیقه قبل از انجام سه آزمایش اول، به یک گروه حلال‌های عصاره و آنتاگونیست (گروه حلال آنتاگونیست+حلال عصاره) و به سه گروه دیگر به ترتیب آنتاگونیست با دُز ۰/۲ و عصاره مؤثر (گروه آنتاگونیست+عصاره)، حلال آنتاگونیست و عصاره با دُز مؤثر (گروه حلال آنتاگونیست+عصاره)، حلال عصاره و آنتاگونیست (گروه آنتاگونیست+حلال عصاره) به صورت درون صفاقی تزریق شد. آزمایش آخر بدون تزریق حلال یا عصاره صورت گرفت.

معناداری وجود نداشت [$F(3, 36) = 0.74, P = 0.53$] (تصویر شماره ۴).

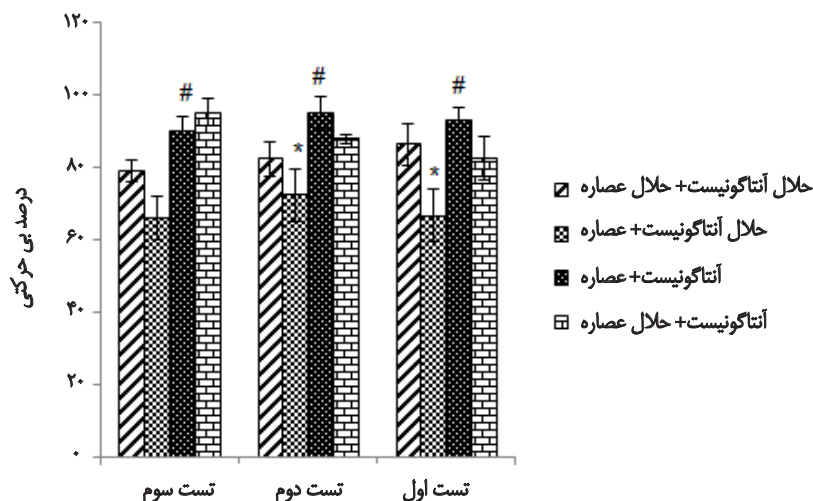
نتایج در گروه عصاره با دُز ۱۰۰

در گروه عصاره با دُز ۱۰۰ بین آزمایش‌های اول تا چهارم تفاوت معناداری وجود نداشت [$F(3, 36) = 0.847, P = 0.479$] (تصویر شماره ۴).

نتایج آزمایش دوم

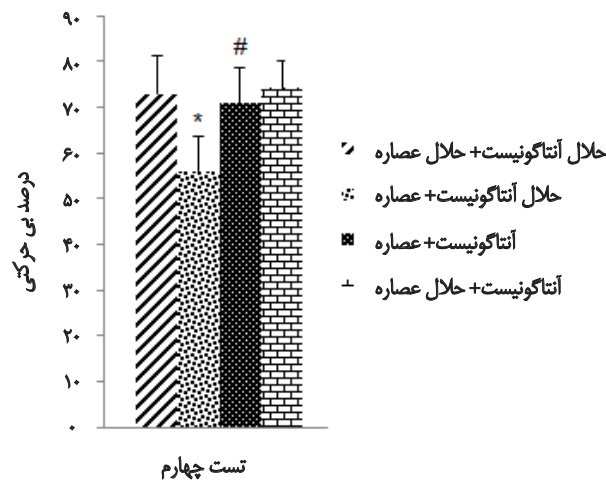
نتایج آزمایش اول نشان داد عصاره برگ شاهدانه با دُز ۲۵ به‌طور معناداری بر مراحل حافظه ترس القاشده توسط فشار روانی پس از سانحه مؤثر بوده است. هدف از این آزمایش تأثیر نقش

6. Rimonabant



مهر و آبان ۱۳۹۵، دوره ۲۳، شماره ۴

تصویر ۵. بررسی اثر آنتاگونیست کانابینوئیدی (Rimonabant) بر میزان بی حرکتی در گروه‌های آزمایشی در مواجهات اول تا سوم. نتایج به صورت $Mean \pm SE$ ارائه شده است. $P < 0.01^{\#}$ در مقایسه با گروه (حلال آنتاگونیست+عصاره) و $P < 0.05^*$ در مقایسه با گروه (حلال آنتاگونیست+حلال عصاره).



تصویر ۶

تصویر ۶. نتایج عملکرد آنتاگونیست Rimonabant بر اثرات عصاره برگ شاهدانه بر میزان بی حرکتی گروه‌های مختلف آزمایشی در آزمایش خاموشی حافظه. نتایج به صورت Mean±SE ارائه شده است.

* $P < 0.05$ در مقایسه با گروه حلال آنتاگونیست+حلال عصاره

$P < 0.05$ در مقایسه با گروه حلال آنتاگونیست+عصاره.

نتایج مواجهه اول

، $F(3, 33) = 21.066$. آزمون تکمیلی توکی نشان داد بین گروه حلال آنتاگونیست+عصاره و آنتاگونیست+عصاره تفاوت معناداری وجود دارد، یعنی میزان بی حرکتی در گروه آنتاگونیست+عصاره نسبت به گروه حلال آنتاگونیست+عصاره افزایش یافته است ($P = 0.05$). همچنین بین گروه حلال آنتاگونیست+عصاره و حلال آنتاگونیست+حلال عصاره تفاوت معناداری وجود دارد، یعنی میزان بی حرکتی در گروه حلال آنتاگونیست+عصاره نسبت به گروه حلال آنتاگونیست+حلال عصاره کاهش یافته است ($P = 0.05$). همچنین بین گروه حلال آنتاگونیست+حلال عصاره با گروه آنتاگونیست+حلال عصاره و بین گروه حلال آنتاگونیست+حلال عصاره و گروه آنتاگونیست+عصاره تفاوت معناداری وجود ندارد (تصویر شماره ۶).

بحث

ناتوانی در خاموشی حافظه ترس نقش مهمی در پاتولوژی اختلالات اضطرابی به‌ویژه فشار روانی پس از سانحه دارد [۱۵]. یکی از نقش‌های بسیار مهم سیستم اندوکannabinوئیدی تسهیل در خاموشی حافظه ترس است [۱۶]. مطالعات نشان داد تزریق آگونیست و آنتاگونیست گیرنده CB1 به بخش‌های اینفرالیمبیک و پارالیمبیک قشر پیش‌پیشانی به ترتیب منجر به تسهیل و اختلال در پدیده خاموشی حافظه ترس می‌شود [۱۷]. در راستای مطالعات مذکور، عصاره برگ شاهدانه که سرشار از ترکیبات کannabinوئیدی است توانست منجر به تسهیل خاموشی حافظه شود.

مقایسه داخل‌گروهی آزمایش‌ها نشان داد تنها در گروه‌های کنترل و گروهی که عصاره را با دوز ۲۵ دریافت کرده بود،

از نظر میزان بی حرکتی تفاوت معناداری بین گروه‌ها وجود داشت [$F(3, 33) = 7.345, P = 0.001$]. آزمون تکمیلی توکی نشان داد بین گروه‌های حلال آنتاگونیست+عصاره و آنتاگونیست+عصاره تفاوت معنادار وجود دارد، یعنی میزان بی حرکتی در گروه آنتاگونیست+عصاره نسبت به گروه حلال آنتاگونیست+عصاره افزایش یافته است ($P < 0.01$). میزان بی حرکتی بین دو گروه حلال آنتاگونیست+عصاره و حلال آنتاگونیست+حلال عصاره تفاوت معناداری وجود نداشت. همچنین بین گروه‌های حلال آنتاگونیست+حلال عصاره با گروه آنتاگونیست+حلال عصاره و بین گروه حلال آنتاگونیست+حلال عصاره و گروه آنتاگونیست+عصاره تفاوت معناداری وجود نداشت (تصویر شماره ۵).

نتایج مواجهه‌های دوم و سوم

تحلیل واریانس یک طرفه در مواجهه دوم و سوم نشان داد گروه‌های مختلف با یکدیگر تفاوت معناداری دارند [$P = 0.04$]. $F(3, 33) = 21.6871$ و [$F(3, 33) = 4.554, P = 0.009$]. آزمون تکمیلی توکی نیز نتایج مشابه مواجهه اول را نشان داد، با این تفاوت که میزان بی حرکتی در گروه حلال آنتاگونیست+عصاره نسبت به گروه حلال آنتاگونیست+حلال عصاره کاهش معناداری یافته است (تصویر شماره ۵).

نتایج آزمایش خاموشی حافظه

این آزمایش بدون هیچ تزریقی انجام شد. تحلیل واریانس یک طرفه تفاوت معنادار بین گروه‌ها را نشان داده است [$P = 0.024$].

یادگیری خاموشی حافظه شده است.

بین گروه‌های آنتاگونیست+عصاره و حلال آنتاگونیست+حلال عصاره در میزان خاموشی حافظه ترس شرطی طی سه مواجهه تفاوت معناداری وجود نداشت، به این معنی که آنتاگونیست با خنثی کردن اثر عصاره میزان بی‌حرکتی (خاموشی حافظه) را به اندازه گروه کنترل افزایش داد.

مقایسه میزان بی‌حرکتی در دو گروه حلال آنتاگونیست+حلال عصاره و آنتاگونیست+حلال عصاره و نبود تفاوت معنادار نشان‌دهنده بی‌تأثیربودن آنتاگونیست به‌تنهایی بر روند یادگیری خاموشی حافظه بوده است. گویا آنتاگونیست بر تأثیری که عصاره بر روند یادگیری گذاشته مداخله کرده است.

آزمایش آخر خاموشی حافظه بدون تزریق دارو، ۲ هفته بعد از آخرین تزریق در گروه‌های آزمایشی انجام شد. نتایج نشان داد روند تثبیت حافظه در گروه تیمار شده با عصاره تقویت شد که این اثر با آنتاگونیست معکوس شد. تأثیر تقویتی عصاره، به واسطه سیستم کانابینوئیدی تا دو هفته پس از آخرین تزریق باقی ماند.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق عبارتند از:

۱. عصاره برگ شاهدانه با دُز ۲۵ mg/kg بر اکتساب و یادگیری خاموشی حافظه ترس شرطی شده اثر تقویتی داشته است.

۲. عصاره از طریق تأثیر بر سیستم کانابینوئیدی و اثر احتمالی بر گیرنده CB₁، منجر به تقویت یادگیری و تثبیت خاموشی حافظه شده است.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه خانم فروغ افشار در مقطع کارشناسی ارشد رشته فیزیولوژی در دانشگاه دامغان است. بدین‌وسیله از دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه دامغان به خاطر پرداخت هزینه مواد و وسایل و در اختیار گذاشتن امکانات تشکر و قدردانی می‌شود.

آزمایش‌های مکرر منجر به کاهش معناداری میزان بی‌حرکتی شد. کاهش معناداری میزان بی‌حرکتی حیوان یا ترس شرطی شده در آزمایش چهارم نسبت به آزمایش اول نشان‌دهنده افزایش تدریجی خاموشی حافظه ترس است. در گروه‌های دیگر حافظه شرطی طی آزمایش‌های مکرر خاموش نشد. روند اثر عصاره شاهدانه بر خاموشی حافظه ترس نه‌تنها طی مواجهه‌های مکرر پایدار ماند، بلکه به‌تدریج تقویت نیز شد.

در این تحقیق ترکیبات عصاره برگ به تفکیک بررسی نشده‌اند، اما با توجه به اینکه بخش عمده‌ای از کانابینوئید گیاه شاهدانه در برگ آن تجمع دارد [۱۸]، احتمالاً اثر برگ به‌طور عمده به ترکیب کانابینوئید آن مرتبط است. سازوکار مداخله عصاره بر پاسخ‌های رفتاری ناشی از القای فشار روانی پس از سانحه مشخص نیست، اما گمان می‌رود کانابینوئید عصاره این عمل را از طریق تأثیر بر برخی از سیستم‌های نور ترانس‌میتتری انجام می‌دهد [۱۶].

گیرنده‌های CB₁ در پایانه اکسونی نورون‌های پیش‌سیناپسی قرار گرفته‌اند و فعال شدن این گیرنده‌ها رهایش میانجی‌های عصبی را کاهش می‌دهد [۲۰، ۱۹]. کانابینوئیدها و اندوکانابینوئیدها با اثر بر گیرنده‌های پیش‌سیناپسی CB₁ می‌توانند رهایش گابا، گلوتامات، دوپامین، نوراپینفرین و استیل‌کولین را در نواحی مربوط به خاموشی حافظه نظیر هیپوکامپ کاهش دهند [۲۱]. با توجه به اهمیت میانجی‌های عصبی در یادگیری و حافظه [۲۲] می‌توان گفت احتمالاً عصاره به‌واسطه کاهش رهایش میانجی‌های عصبی سبب خاموشی حافظه ترس شرطی شده ناشی از القای فشار روانی پس از سانحه در مدارهای نورونی مرتبط با فشار روانی پس از سانحه شده است.

یکی از اساسی‌ترین مشکلات بیماران فشار روانی پس از سانحه، اختلال در خاموشی حافظه ترومایی است [۲۳، ۲۴]. به‌کاربردن عصاره شاهدانه به صورت وابسته به دُز می‌تواند در بهبود حافظه این بیماران مؤثر و مفید واقع شود. به‌منظور بررسی عملکرد آنتاگونیست کانابینوئیدی با دُز ۰/۲ بر اثرهای عصاره برگ شاهدانه بر خاموشی حافظه، آنتاگونیست به موش‌هایی که دُز مؤثر عصاره را دریافت کردند، تزریق شد.

مقایسه تأثیر عصاره با تأثیر توأم عصاره و آنتاگونیست در سه مواجهه نشان داد کاهش میزان بی‌حرکتی القاشده توسط عصاره و تیمار با آنتاگونیست جبران شد. مواجهه مکرر با شرایط القای ترس شرطی منجر به اکتساب و یادگیری خاموشی حافظه ترس شرطی می‌شود. می‌توان نتیجه گرفت که عصاره و مواجهه‌درمانی با همکاری هم منجر به القای خاموشی حافظه ترومایی یا فراموشی ترس شرطی شده‌اند و این اثر از طریق سیستم کانابینوئیدی اعمال شده است. به‌عبارت دیگر عصاره روند اکتساب حافظه خاموشی را تقویت و آنتاگونیست این اثر را خنثی کرده است. احتمالاً عصاره از طریق تأثیر بر گیرنده CB₁ سیستم کانابینوئیدی منجر به تقویت

References

- [1] Zwissler B, Hauswald A, Koessler S, Ertl V, Pfeiffer A, Wohrmann C, et al. Memory control in post-traumatic stress disorder: evidence from item method directed forgetting in civil war victims in Northern Uganda. *Psychological Medicine*. 2012; 42(6):1283-291. doi: 10.1017/s0033291711002273
- [2] Siegmund A, Wotjak CT. A mouse model of posttraumatic stress disorder that distinguishes between conditioned and sensitised fear. *Journal of Psychiatric Research*. 2007; 41(10):848-60. doi: 10.1016/j.jpsychires.2006.07.017
- [3] Wessa M, Flor H. Failure of extinction of fear responses in post-traumatic stress disorder: evidence from second-order conditioning. *American Journal of Psychiatry*. 2007; 164(11):1684-692. doi: appi.ajp.2007.07030525.
- [4] Howlett AC, Breivogel CS, Childers SR, Deadwyler SA, Hampson RE, Porrino LJ. Cannabinoid physiology and pharmacology: 30 years of progress. *Neuropharmacology*. 2004; 47(1):345-58. doi: 10.1016/j.neuropharm.2004.07.030
- [5] Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: Focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*. 2002; 68(4):247-86. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00080-1
- [6] Norrholm SD, Jovanovic T, Olin IW, Sands LA, Bradley B, Ressler KJ. Fear extinction in traumatized civilians with posttraumatic stress disorder: relation to symptom severity. *Biological Psychiatry*. 2011; 69(6):556-63. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.09.013
- [7] Komorowski J, Stepien H. The role of the endocannabinoid system in the regulation of endocrine function and in the control of energy balance in humans. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*. 2007; 61:99-105.
- [8] Di Marzo V, Bifulco M, De Petrocellis L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2004; 3(9):771-84. doi: 10.1038/nrd1495
- [9] Lutz B. The endocannabinoid system and extinction learning. *Molecular Neurobiology*. 2007; 36(1):92-101. doi: 10.1007/s12035-007-8004-x
- [10] Harloe JP, Thorpe AJ, Lichtman AH. Differential endocannabinoid regulation of extinction in appetitive and aversive Barnes maze tasks. *Learning & Memory*. 2008; 15(11):806-09. doi: 10.1101/lm.1113008
- [11] Tambaro S, Bortolato M. Cannabinoid-related agents in the treatment of anxiety disorders: current knowledge and future perspectives. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*. 2012; 7(1):25-40. doi: 10.2174/157488912798842269
- [12] Alikhanzade M, Tehranipour M, Khayatizade J. The neuroprotective effect of alcoholic and aqueous extracts of *Achillea biebersteinii* leaves on spinal motoneurons denervation after sciatic nerve compression in rats. *Advanced Herbal Medicine*. 2015; 1(1):8-16.
- [13] Tehranipour M, Kehtarpour M, Javadmoosavi B, Mahdavi-Shahri N. [Evaluation of Cannabis sativa leaves aquatic extract effect on triple regions of hippocampus neuronal density in male rats (Persian)]. *Journal of Shahrekord University of Medical Sciences*. 2012; 14(1):20-27.
- [14] Bitencourt RM, Pamplona FA, Takahashi RN. Facilitation of contextual fear memory extinction and anti-anxiogenic effects of AM404 and cannabidiol in conditioned rats. *European Neuropsychopharmacology*. 2008; 18(12):849-59. doi: 10.1016/j.euroneuro.2008.07.001
- [15] Wessa M, Flor H. Failure of extinction of fear responses in post-traumatic stress disorder: evidence from second-order conditioning. *American Journal of Psychiatry*. 2007; 164(1):1684-692. doi: 10.1176/appi.ajp.2007.07030525
- [16] Lafenêtre P, Chauloff F, Marsicano G. The endocannabinoid system in the processing of anxiety and fear and how CB1 receptors may modulate fear extinction. *Pharmacological Research*. 2007; 56(5):367-81. doi: 10.1016/j.phrs.2007.09.006
- [17] Lin HC, Mao SC, Su CL, Gean PW. The role of prefrontal cortex CB1 receptors in the modulation of fear memory. *Cerebral Cortex*. 2009; 19(1):165-75. doi: 10.1093/cercor/bhn075
- [18] Ameri A. The effects of cannabinoids on the brain. *Progress in Neurobiology*. 1999; 58(4):315-48. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00087-2
- [19] Alger BE. Retrograde signaling in the regulation of synaptic transmission: Focus on endocannabinoids. *Progress in Neurobiology*. 2002; 68(4):247-86. doi: 10.1016/s0301-0082(02)00080-1
- [20] Varvel S, Anum E, Lichtman A. Disruption of CB1 receptor signaling impairs extinction of spatial memory in mice. *Psychopharmacology*. 2004; 179(4):863-72. doi: 10.1007/s00213-004-2121-2
- [21] Marsicano G, Wotjak CT, Azad SC, Bisogno T, Rammes G, Cascio MG, et al. The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories. *Nature*. 2002; 418(6897): 530-34. doi:
- [22] Marsicano G, Lafenêtre P. Roles of the endocannabinoid system in learning and memory. *Behavioral Neurobiology of the Endocannabinoid System*. 2009; 1:201-230. doi: 10.1007/978-3-540-88955-7_8
- [23] Morey RA, Gold AL, LaBar KS, Beall SK, Brown VM, Haswell CC, et al. Amygdala volume changes in posttraumatic stress disorder in a large case-controlled veterans group. *Archives of General Psychiatry*. 2012; 69(11):1169-178. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2012.50
- [24] Courtin J, Bienvenu T, Einarsson E, Herry C. Medial prefrontal cortex neuronal circuits in fear behavior. *Neuroscience*. 2013; 240:219-42. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.001

