ЕФЕКТИ НА RIMONABANT ВЪРХУ ОБУЧЕНИЕТО И ПАМЕТТА НА ПЛЪХОВЕ С ОЛФАКТОРНА БУЛБЕКТОМИЯ

Добринка Дончева¹, Маргарита Великова¹, Роман Ташев²

¹Катедра по физиология и патофизиология, Факултет по медицина, Медицински университет - Варна

²Катедра по патофизиология, Факултет по медицина, Медицински университет - София

EFFECTS OF RIMONABANT ON LEARNING AND MEMORY OF RATS WITH OLFACTORY BULBECTOMY

Dobrinka Doncheva¹, Margarita Velikova¹, Roman Tashev²

¹Department of Physiology and Pathophysiology, Faculty of Medicine, Medical University of Varna

²Department of Pathophysiology, Faculty of Medicine, Medical University - Sofia

Олфакторната булбектомия (OBX) е експериментален модел на депресия, който напоследък е използван и като модел на болестта на Алцхаймер, поради развитието на невродегенеративни промени в мозъка. OBX модела при гризачи се съпътства от биохимични, морфологични и структурни промени в мозъка и с нарушения в поведенческите реакции. Характерен за модела е паметовият дефицит, който съпътства както депресивните разстройства, така и невродегенеративните заболявания. Има данни, че увреждащото паметта действие на канabinоидите е свързано с активиране на канabinоидните CB1 рецептори в мозъка. Цел на проучването е изследване ефектите на CB1 антагониста Rimonabant (SR 141716A), въвеждан интрагастрално в продължение на 14 дни върху обучителните и паметовите процеси на OBX плъхове, тествани с метод на пасивно избягване. Въвеждането на Римонабант е осъществено в три експериментални постановки: преди OBX; непосредствено след OBX (1-14 ден); на фона на развито депресивно-подобно състояние (14-28 ден след OBX). Резултатите показват, че Rimonabant подобрява обучението и паметта на шам-оперирани контроли, докато при въвеждане преди OBX не води до съществени промени в поведенческите реакции при тест, проведен след OBX. Въвеждането на Rimonabant на фона на развито депресивно-подобно състояние намалява памето-

Olfactory bulbectomy (OBX) is an experimental model of depression, which has recently been used as a model of Alzheimer's disease due to the development of neurodegenerative changes in the brain. The OBX model in rodents is accompanied by biochemical, morphological and structural changes in the brain, as well as by many behavioral changes. A common finding in the OBX model are memory deficits, which are present in both depressive disorders and neurodegenerative diseases. There is evidence that the memory-impairing effect of cannabinoids is associated with activation of the cannabinoid CB1 receptors in the brain. The aim of the present study was to investigate the effects of the CB1 antagonist Rimonabant (SR 141716A) administered intragastrically daily for 14 days on the memory processes of OBX rats, tested in a passive avoidance (PA) paradigm. Rimonabant was administered to OBX rats, divided into three experimental groups: before OBX; immediately after OBX (1-14 days); with the presence of a depressive-like state (14-28 days after OBX). Rimonabant showed a tendency to improve the learning and memory of sham-operated controls, whereas no significant change in the behavioral responses was observed upon administration 14 days before OBX. However, Rimonabant, administered immediately after OBX completely prevented the development of memory deficit in a PA test, while its administration 14-28 days after OBX ameliorated the memory disturbances induced by bulbectomy.

вите нарушения, предизвикани от булбектомията, а при въвеждане непосредствено след отстраняване на *bulbi olfactorii* паметовият дефицит е напълно преодолян. Данните ни показват, че *Rimonabant*, въвеждан интрагастрално в продължение на 14 дни, има положителен ефект върху увредената памет вследствие на ОВХ, като ефектът е по-силно изразен при въвеждане непосредствено след булбектомията.

Ключови думи: олфакторна булбектомия, CB1 канабиноиден рецептор, памет, плъх

The results indicate that the CB1 antagonist Rimonabant may ameliorate the development of a memory deficit in OBX rats.

Keywords: Olfactory bulbectomy, CB1 cannabinoid receptor, memory, rat

Ендоканабиноидната система (ЕКС) участва в регулацията на множество физиологични процеси в организма, включително и в механизмите на обучението и паметта. ЕКС се състои от ендогенните канабиноиди (ендоканабиноиди), канабиноидните рецептори и ензимите, които синтезират/разграждат ендоканабиноидите. Ендоканабиноидите са липидни съединения, получени от разграждането на мембранни фосфолипиди. Те действат като невротрансмитери, тъй като са синтезирани и освободени от неврони и са способни да активират мембранни рецептори. Основна характеристика, която ги отличава от другите невротрансмитери е ретроградният механизъм на действие (1). Известни са 2 вида канабиноидни рецептори – CB1 и CB2, които принадлежат към семейството на G-протеин свързаните рецептори (2). В централната нервна система (ЦНС) основно се експресират CB1 рецепторите, като висока тяхна плътност е установена в базалните ганглии, хипокампа, церебелума, префронталната кора, амигдалата. В ЦНС CB1 рецепторите, експресирани в неврони и в глиални клетки, участват в регулацията на когнитивните процеси, хранителното поведение, емоциите, болковото възприятие, активността на системата на възнаграждане и др. (2,3). Експресията на CB1 рецепторите е главно върху пресинаптичната мембрана на аксонните окончания на интерневрони, където ендоканабиноидите модули-

рат освобождаването на медиатори (4). CB1 рецептори са намерени и в периферни тъкани (адипоцити, хепатоцити), което предполага и участие в контрола на енергийния баланс и липидния метаболизъм (5). CB2 рецепторите са локализирани в клетките на имунната система, те модулират клетъчната миграция и освобождаването на цитокини; в ЦНС CB2 рецептори се намират главно в микроглия (6).

Олфакторната булбектомия (ОВХ) е утвърден експериментален модел на депресия, който напоследък е използван и като модел на болестта на Алцхаймер поради развитието на невродегенеративни промени в мозъка. ОВХ моделът при гризачи се съпътства от множество биохимични, морфологични и структурни промени в мозъка, както и с нарушения в поведенческите реакции (7). Характерен е паметовият дефицит, който съпътства както депресивните разстройства, така и невродегенеративните заболявания. Има данни, че увреждащото паметта действие на канабиноидите е свързано с активиране на канабиноидните CB1 рецептори в мозъка.

ЦЕЛ

Цел на настоящото проучване беше изследване ефектите на канабиноидния CB1 рецепторен антагонист *Rimonabant* (SR 141716A), въвеждан интрагастрално в продължение на 14 дни, върху обучителните и паметовите процеси на ОВХ плъхове.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Rimonabant (RIM), SR141716A (Sanofi, France) беше въвеждан интрагастрално в продължение на 14 дни в доза 3mg/kg. Веществото беше разтворено „ex tempore“ във физиологичен разтвор и въвеждано посредством интрагастрална сонда в доза 1mL/100 g. Използваните експериментални животни (мъжки плъхове, порода Wistar), третирани с Rimonabant (RIM), бяха разделени в 4 групи: шам - RIM; RIM, въвеждан преди OBX (14d RIM,OBX) и тест, провеждан 14 дни след OBX; RIM, въвеждан непосредствено след OBX (OBX,1-14d RIM) и тест - 14 дни след OBX; RIM, въвеждан след развитие на депресивно-подобното състояние (OBX,14-28d RIM) и тест - 28 дни след OBX. Трите контролни групи животни, третирани 14 дни с физиологичен разтвор, включваха: шам-оперирани, булбектомирани (OBX₁₄), тествани 14 дни след OBX и OBX₂₈, тествани 28 дни след OBX.

Експериментален модел - двустранна олфакторна булбектомия у плъхове (OBX)

След анестезия животните се фиксират в стереотаксичен апарат, отпрепарират се меките тъкани на главата и периоста, черепните кости се пробиват с бормашина, при координати на *bulbi olfactorii*, определени според атласа на Pellegrino и Cushman (1967) за плъхове порода Wistar. Булбусите се аспирират чрез игла, прикрепена към водна помпа. Sham-оперирани плъхове бяха подложени на същите хирургични манипулации като булбектомираните, но без аспириране на булбусите.

Метод за обучение за пасивно избягване (*passive avoidance, PA*)

Обучението за пасивно избягване с отрицателно подкрепление се провеждаше чрез апарат step through. Ефектите на Rimonabant върху процесите на обучение и памет бяха проследени чрез метода за пасивно избягване с отрицателно подкрепление (step through) (8). Обучителната сесия беше провеждана 30 минути след последното въвеждане на веществото, а 3 часа и 24 часа по-късно се провеждаха тестове

те за ретенция (памет). Обучението се състои от еднократна тренировка. Животното се поставя на платформа в осветена камера, свързана посредством отворена врата със затъмнено помещение. След влизане на животното в затъмнената камера, вратата се затваря и по подовата решетка се подава електрически ток. Тестът за памет се провежда на 3-ия и 24-ия час след обучението, като животното отново се поставя в осветената камера и престоят там се отчита в секунди. За критерий на обученост се приема престой от минимум 180 секунди.

РЕЗУЛТАТИ

Двустранното премахване на *bulbi olfactorii* (OBX) предизвиква достоверно скъсяване на латентното време при тестовете за ретенция на 3-ти час ($P \leq 0.001$) и 24-и час ($P \leq 0.001$) и драстично намаляване (до 0 % на 3-ти и 24-и час) на процента на плъховете, които достигат критерия на обученост в сравнение с sham-оперирани плъхове (3 час - $\chi^2 = 9.643$; $P \leq 0.001$; 24 час - $\chi^2 = 9.643$; $P \leq 0.001$) (Табл. 1, Фиг. 1). Сравняването на показателите при булбектомираните животни, тествани 14 дни (OBX_{14d}) и 28 дни след OBX (OBX_{28d}) след булбектомията, не показва статистически значими различия при тестовете за ретенция на 3 и 24 час ($P = NS$).

Въвеждането на RIM статистически достоверно удължава латентното време при тестовете за ретенция на 3 час ($P \leq 0.05$) и 24 час ($P \leq 0.05$) и проявява тенденция към повишаване процента на плъховете, достигащи критерия за обученост на 3-ти час (75%) $\chi^2 = 1.657$; $P = NS$) и 24-и час (75%) $\chi^2 = 1.657$; $P = NS$), в сравнение с sham-контролите (60%), третирани с физ. разтвор. Въвеждането на RIM статистически достоверно удължава латентното време на 3-ти час ($\chi^2 = 4.000$; $P \leq 0.05$) и 24-и час ($\chi^2 = 4.000$; $P \leq 0.05$) и увеличава процента на плъховете, достигащи критерия за обученост при тестовете за ретенция на 3-ти час (14%; $\chi^2 = 2.800$, $P \leq 0.05$) и 24-и час (14%; $\chi^2 = 4.667$, $P \leq 0.02$) и в сравнение с OBX₁₄ контролите, третирани с физ. разтвор (Табл. 1, Фиг. 1).

RIM, въвеждан преди OBX (14d RIM,OBX), не предизвиква статистически значими промени в поведението на плъховете, тествани 14 дни след OBX, в сравнение с OBX_{14d} контролите (3-ти и 24-ти час P - NS), като показателите за обучение и памет са влошени: скъсено латентно време на 3-ти час ($P \leq 0.05$) и 24-и час ($P \leq 0.05$), намалява процент плъхове, достигащи критерия за обученост на 3-ти час ($\chi^2=7.200$; $P \leq 0.01$) и 24-и час ($\chi^2=4.866$; $P \leq 0.05$), в сравнение с шам-контролите (Табл. 1, Фиг. 1).

RIM, въвеждан 14 дни след OBX (OBX,1-14d RIM), статистически достоверно удължава латентното време на 3-ти час

($P \leq 0.001$) и 24-и час ($P \leq 0.001$) и увеличава процента на плъховете, достигащи критерия за обученост при тестовите за ретенция на 3-ти час (62.5%; $\chi^2=8.654$; $P \leq 0.01$) и 24-и час (75%; $\chi^2=11.250$; $P \leq 0.001$), в сравнение с OBX_{14d} контролите (0%), като показателите на третираните животни не се различават от тези на шам-оперирани животни на 3-ти час и 2-и час (P -NS) (Табл. 1, Фиг. 1).

RIM, въвеждан след развитие на депресивно-подобното състояние (OBX,14-28d RIM), също удължава латентното време на 3-ти час ($P \leq 0.01$) и 24-и час ($P \leq 0.05$) и увеличава процента на плъховете, достигащи критерия за обученост при тестовите

Табл. 1. Ефекти на Rimopabant върху върху паметта при метод *step through* след 14-дневно третиране на OBX плъхове * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ - спрямо съответната OBX контрола. ^o $P < 0.05$; ^{ooo} $P < 0.001$ спрямо съответната шам-контрола

Тест за ретенция				
Групи	3-ти час		24-и час	
	Латентно време $\bar{x} \pm S.E.M.$	% плъхове, критерий за обученост	Латентно време $\bar{x} \pm S.E.M.$	% плъхове, критерий за обученост
Sham saline	138.8 $\pm$ 11.20	60% (6/10)	150.9 $\pm$ 13.5	60% (6/10)
OBX _{14d} - saline	23.0 $\pm$ 7.11 ^{ooo}	0% (0/10)	26.9 $\pm$ 6.9 ^{ooo}	0% (0/10)
Sham-RIM 14d	160.8 $\pm$ 10.23 ^{***o}	75% (6/8)	176.7 $\pm$ 12.1 ^{***o}	75% (6/8)
14d RIM, OBX	47.88 $\pm$ 18.3 ^{ooo}	0% (0/8)	54.0 $\pm$ 28.72 ^{ooo}	12.5% (1/8)
OBX, 1-14d RIM	156.8 $\pm$ 17.59 ^{***}	62.5 (5/8)	172.4 $\pm$ 20.1 ^{***}	75% (6/8)
OBX _{28d} - saline	32.33 $\pm$ 8.3 ^{ooo}	0% (0/8)	46.54 $\pm$ 10.1 ^{ooo}	0% (0/8)
OBX, 14-28d RIM	99.1 $\pm$ 27.47 ^{**o}	37.5% (3/8)	84.5 $\pm$ 18.55 ^{*o}	37.5% (3/8)

Фиг. 1 (А и Б). Ефекти на Rimopabant върху върху паметта (*step through*) след 14 дневно третиране на OBX плъхове (А) - тест за памет на 3-ти час, (Б) - тест за памет на 24-и час; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ спрямо съответната OBX контрола. ^o $P < 0.05$; ^{ooo} $P < 0.001$ - спрямо съответната шам-контрола

на 3-ти час (37.5%; ($\chi^2 = 3.692$; $P \leq 0.05$) и 24-и час (37.5% ; $\chi^2 = 3.692$; $P \leq 0.05$), в сравнение с OVX_{28} контролите (0%) (Табл. 1 , Фиг. 1).

ДИСКУСИЯ

Налице са множество литературни данни относно паметови нарушения при хора, употребяващи на канабис. Влиянието на $CB1$ рецепторните лиганди върху процесите на обучение и памет се изследва с различни експериментални животински модели и клинични тестове, но резултатите са противоречиви – модулацията на канабиноидните рецептори води както до подобрение, така и до влошаване на паметта. Противоречията могат да бъдат свързани с използваните различни поведенчески модели и експериментални условия (доза, начин и време на прилагане на лиганда, област на приложение и др. (9).

Rimonabant (SR141716A) е селективен антагонист на $CB1$ рецепторите, който показва характеристики на обратен агонист във високи концентрации (10). Ефектите на SR141716A, прилаган при различни тестове за памет, са нееднозначни. Острото прилагане на Rimonabant преди обучителните сесии подобрява паметовите процеси при гризачи, изследвани с тест за пасивно избягване, тест с повдигнат Т-лабиринт, тест за памет при социално разпознаване, тест с радиален лабиринт, но нарушава запаметяването при тестове за пространствена памет (11,12,13). Налице са литературни данни, че острото приложение на агонисти на $CB1$ рецепторите нарушава запаметяването при различни животински модели (14), а претретирането с SR141716A предотвратява развитието на паметови нарушения (9). Настоящото проучване при 14-дневно интрагастрално прилагане на римонабант на шам-оперирани плъхове също установи тенденция за подобряване на обучението при теста с пасивно избягване (step through).

Олфакторната булбектомия при гризачи е широко използван модел на депресивно разстройство. Моделът напоследък добива популярност и при изследване на болестта на Алцхаймер поради развитието

на невродегенеративни промени в мозъка и предизвикваните тежки паметови нарушения (15). Айзенщайн и сътр. установяват нарушена функция на ЕКС при OVX плъхове, което се отразява на функционалната активност на други невротрансмитерни системи и вероятно допринася за паметовите нарушения (16).

При OVX плъхове, тествани 14 дни след булбектомията, се развива депресивно-подобно състояние с множество поведенчески нарушения, сред които и паметов дефицит (7). В нашето проучване установихме, че блокирането на $CB1$ рецепторите с римонабант, въвеждан в продължение на 14 дни след развитие на депресивно-подобното състояние (14-28-и ден след OVX) оказва положителен ефект върху увредената вследствие на OVX памет, но не е в състояние да я възстанови напълно. От особено значение са резултатите, разкриващи способността на $CB1$ антагониста да противодейства на механизмите, водещи до възникване на паметов дефицит при теста за пасивно избягване, като поведение на животните, третираните веднага след премахване на обонятелните луковици (1-14 ден след OVX), не се отличава от това на шам-оперирани контроли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите ни са в подкрепа на данните за участие на ендоканабиноидната система в развитие на паметовия дефицит при булбектомия. Получените данни насочват към извода, че ранното прилагане на $CB1$ антагонисти би могло да допринесе за преодоляване на паметовия дефицит, съпътстващ някои невродегенеративни заболявания.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wilson RI, Nicoll RA. Endocannabinoid signaling in the brain. Science 2002; 296: 678–682.
2. Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, DiMarzo V, Elphick MR et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid

- receptors and their ligands: beyond CB1 and CB2. *Pharmacol. Rev.* 2010; 62: 588–631.
3. Maccarrone M, Dainese E, Oddi S. Intracellular trafficking of anandamide: new concepts for signaling. *Trends Biochem. Sci.* 2010; 35: 601–608.
 4. Busquets-Garcia A, Bains J, Marsicano G. CB1 Receptor Signaling in the Brain: Extracting Specificity from Ubiquity. *Neuropsychopharmacology* 2018; 43: 4–20.
 5. Silvestri C, DiMarzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab.* 2013; 17: 475–490.
 6. Cabral GA, Griffin-Thomas L. Emerging role of the cannabinoid receptor CB2 in immune regulation: therapeutic prospects for neuroinflammation. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009; 11:e3.
 7. Song C, Leonard BE. The olfactory bulbectomized rat as a model of depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2005; 29: 627–647.
 8. Bures J, Buresova W. Cortical spreading depression as a memory-disturbing factor. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1963; 56: 268–272.
 9. Kruk-Slomka M, Dzik A, Budzynska B, Biala G. Endocannabinoid System: the Direct and Indirect Involvement in the Memory and Learning Processes—a Short Review. *Mol. Neurobiol.* 2017; 54: 8332–8347.
 10. Rinaldi-Carmona M, Barth F, Heaulme M, Alonso R, Shire D, Congy C, Soubrie P, Breliere JC et al. Biochemical and pharmacological characterization of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. *Life Sci* 1995; 56(23–24): 1941–1947.
 11. Terranova JP, Storme JJ, Lafon N, Péro A, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Soubrie P. Improvement of memory in rodents by the selective CB1 cannabinoid receptor antagonist, SR 141716. *Psychopharmacology* 1996; 126(2): 165–172.
 12. Takahashi RN, Pamplona FA, Fernandes MS. The cannabinoid antagonist SR141716A facilitates memory acquisition and consolidation in the mouse elevated T-maze. *Neurosci Lett* 2005; 380 (3): 270–275.
 13. Wolff MC, Leander JD. SR141716A, a cannabinoid CB1 receptor antagonist, improves memory in a delayed radial maze task. *Eur J Pharmacol* 2003; 477(3): 213–217.
 14. Abush H, Akirav I. Cannabinoids ameliorate impairments induced by chronic stress to synaptic plasticity and short-term memory. *Neuropsychopharmacology* 2013; 38(8):1521–1534
 15. Yehuda S, Rabinovitz S. (2014) Olfactory bulbectomy as a putative model for Alzheimer: The protective role of essential fatty acids. *PharmaNutrition* 2: 12–14.
 16. Eisenstein SA, Clapper JR, Holmes PV, Piomelli D, Hohmann AG. A role for 2-arachidonoylglycerol and endocannabinoid signaling in the locomotor response to novelty induced by olfactory bulbectomy. *Pharmacol Res.* 2010; 61(5): 419–429.
 17. Wise LE, Iredale PA, Stokes RJ, Lichtman AH. Combination of rimonabant and donepezil prolongs spatial memory duration. *Neuropsychopharmacology.* 2007; 32(8):1805–1812.

Адрес за кореспонденция:

доц. д-р Маргарита Великова, д.м.
 Катедра по физиология и патофизиология
 Медицински университет
 „Проф. д-р Параскев Стоянов“ - Варна
 ул. Марин Дринов 55, 9002 Варна
 e-mail: msvelikova@yahoo.com