

## ПРОМЕНИ В ЕКСПЛОРАТОРНОТО ПОВЕДЕНИЕ НА ПЛЪХОВЕ С ОЛФАКТОРНА БУЛБЕКТОМИЯ СЛЕД ЕДНОКРАТНО ВЪВЕЖДАНЕ НА ЛИГАНДИ НА КАНАБИНОИДНИЯ CB1 РЕЦЕПТОР

Маринов М.<sup>1</sup>, М. Иванова<sup>2</sup>, С. Белчева<sup>3,4</sup>, И. Белчева<sup>3</sup>,  
Н. Негрев<sup>5</sup>, Р. Ташев<sup>6</sup>, Р. Радев<sup>1</sup>, И. Маринова<sup>7</sup>

**Key words:** *olfactory bulbectomy; CB1 receptor; exploratory behavior; rat.*

### Въведение

Ендоканабиноидната система има важна регулаторна роля в човешкия организъм, свързана с дейността на нервната, имунната, сърдечно-съдовата система и др. (14). Тя е съставена от ендоканабиноиди – липидни медиатори, производни на арахидоновата киселина и канабиноидни рецептори. Основните ендоканабиноиди са анандамид (N арахидоноилетаноламин) и 2-арахидоноилглицерол (2-AG). Канабиноидните рецептори са два основни типа (CB1 и CB2) и принадлежат към суперфамилията на G-протеин-куплираните мембранни рецептори (8).

CB1 рецепторите са широко разпространени в областите на мозъчната кора, отговорни за регулацията на двигателните функции, в лимбичната система, базалните ганглии, таламуса, nucleus subthalamicus, малкия мозък и соматосензорни, асоциативни и моторни ядра в мозъчния ствол

<sup>1</sup>Катедра по предклинични и клинични науки Медицински университет – Варна, <sup>2</sup>УНС по физиология, Медицински университет – Варна, <sup>3</sup>Институт по невробиология, Българска академия на науките, София, <sup>4</sup>Факултет по начална и предучилищна педагогика, СУ „Св. Кл. Охридски“, София, <sup>5</sup>Медицински колеж – Варна, <sup>6</sup>Катедра по патофизиология, Медицински университет – София, София, <sup>7</sup>Катедра по физиотерапия, рехабилитация, морелечение, професионални заболявания и бедствени ситуации, Медицински университет – Варна,

### Effects of acutely applied cannabinoid CB1 ligands on exploratory activity in bulbectomized rats

Marinov M., M. Ivanova, S. Belcheva, I. Belcheva, N. Negrev, R. Tashev, R. Radev, I. Marinova

*Endocannabinoid system plays an important neuromodulatory role in the central nervous system. Endocannabinoid-mediated synaptic plasticity influences motor control systems involved in planning and execution of movement. Olfactory bulbectomy (OBX) is an experimental model of depression with a number of behavioral, biochemical and neuroendocrinological features, many of which are comparable to those seen in patients with major depression. The effects of cannabinoid CB1 receptor agonist HU 210 and cannabinoid CB1 receptor antagonist SR 141716A injected i.c.v. on the exploratory behaviour of OBX rats were studied in an Opto varimex apparatus. HU 210 injected 5 min before the testing decreased the number of horizontal and vertical movements and showed a tendency to improve the habituation in OBX rats, while SR 141716A decreased the number of vertical movements only, as compared to the saline-treated OBX controls. The data showed that stimulation of CB1 receptors suppressed exploratory activity while the inhibition of CB1 receptors produced an weak modulatory effect.*

(7). В централната нервна система (ЦНС) CB<sub>1</sub> рецепторите са разположени предимно пресинаптично и модулират освобождаването на други невротрансмитери, като по този начин участват в кратко-

временната синаптична пластичност (9). Ендоканабиноид-медираната синаптична пластичност обхваща различни части от системата за регулация на движенията при гръбначните, включително мрежи от неврони в центровете, отговорни за планиране и изпълнение на движенията в мозъчната кора, базалните ганглии, малкият мозък и мозъчния ствол (4).

Експериментални данни показват, че ендоканабиноидната система, със своята модулаторна роля в ЦНС, повлиява настроението и тревожността и има важно значение в патогенезата на депресивните разстройства (16). За проучвания на депресията са разработени различни експериментални модели на депресия при животни. Двустранната олфакторна булбектомия (ОВХ) предизвиква при гризачи синдром с поведенчески, неврохимични и структурни аномалии, подобни на тези, наблюдавани при депресия у хора. При този модел се наблюдава промяна в експлораторното поведение и нарушаване на хабитуацията (угасване с течение на времето на изследователския рефлекс към повтарящи се индиферентни въздействия, в случая постепенно намаляване броя на хоризонталните и вертикалните движения) (13, 15).

### Цел

Да се проучи участието на мозъчните CB1 канбиноидни рецептори в изследователското поведение на плъхове при експериментален модел на депресия – ОВХ чрез еднократно интрацеребровентрикуларно (i.c.v.) въвеждане на CB1 рецепторния агонист HU 210 и CB1 рецепторния антагонист SR 141716A.

### Материали и методи

Експериментите бяха проведени върху 76 мъжки половозрели бели плъхове, порода Wistar, с тегло 200-220 g. Експериментите са провеждани съгласно изискванията и правилата на Етичния Комитет при Институт по Невробиология, БАН (регистрация FWA 00003059 от Службите за Човешко Здраве, САЩ).

*Експериментален модел на депресия – двустранна олфакторна булбектомия.* След анестезия, експерименталните животни се фиксират в стереотаксичен апарат (Narishige S.I.L.). Отпрепарират се меките тъкани на главата и периоста, правят се двустранно отвори с диаметър 2 mm според координатите на bulbus olfactorius в атласа на Pellegrino & Cushman (11). Bulbi olfactorii се аспирират чрез игла от неръждаема стомана, прикрепена към водна помпа.

*Стереотаксична имплантация на канюли и инжектиране на CB1 лиганди във ventriculus ventrolateralis dexter.* След анестезия плъховете бяха поставени в стереотаксичен апарат (Narishige S.I.L.) и бяха имплантирани водещи канюли във ventriculus ventrolateralis dexter според координатите от стереотаксичния атлас на Pellegrino и Cushman (11). CB1 лигандите HU 210 (Tocris) и SR 141716A (Sanofi) бяха разтворени ex tempore в 1:19 разтвор на диметилсулфоксид/0.9% физиологичен разтвор и 1 µl от разтвора (pH 7.4) се вливаше i.c.v. посредством инжекционна канюла 5 минути преди теста за поведение.

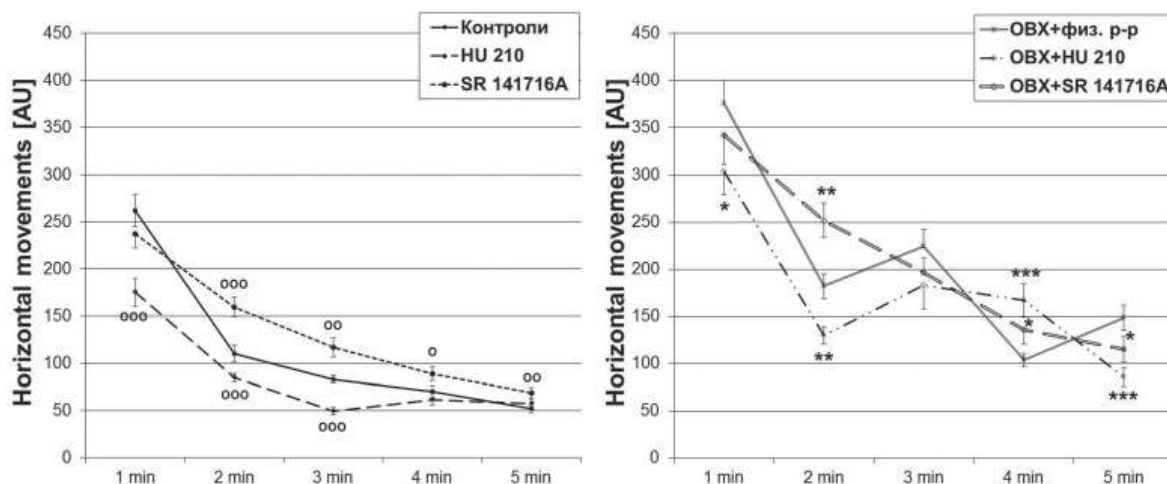
*Изследване на експлораторната активност.* Промените в изследователското поведение бяха проследени съгласно метода на Kohler и Lorens (5) чрез апарат Opto Varimex (Columbus Instruments, USA). Апаратът регистрира в условни единици броя на пресичанията на инфрачервени лъчи при движението на животното, което позволява избирателно отчитане на броя на хоризонталните и вертикалните движения за определен период от време. Получената информация се обработва от компютър. Движенията на животните бяха регистрирани на всяка минута за 5 минутен период.

*Статистическа обработка на резултатите.* Двухакторен ANOVA беше използван за обработка на данните, получени за поведението на животното. Получените от ANOVA резултати бяха допълнително анализирани чрез post hoc t-test.

## Резултати

Двуфакторният ANOVA показва достоверен ефект за фактора вещество ( $F_{2, 179} = 34.93$ ;  $P \leq 0.001$ ) и фактора време ( $F_{4, 179} = 156.23$ ;  $P \leq 0.001$ ) и достоверно взаимодействие между факторите вещество и време ( $F_{8, 179} = 5.35$ ;  $P \leq 0.001$ ). Post-hoc t-тестът показва, че HU 210 въведен при плъхове постепенно и достоверно понижава броя на хоризонталните движения на 1-ва ( $t = 3.77$ ;  $P \leq 0.001$ ), 2-ра ( $t = 2.58$ ;  $P \leq 0.01$ ) и 3-та минута ( $t = 5.99$ ;  $P \leq 0.001$ ), а на 4-та и 5-та техния брой се приближава до този на контролите, третирани с физиологичен разтвор. SR 141716A достоверно

верно взаимодействие между факторите вещество и време ( $F_{8, 179} = 4.11$ ;  $P \leq 0.001$ ). Post-hoc t-тестът показва, че HU 210 първоначално достоверно намалява броя на хоризонталните движения на 1-ва ( $t = 2.04$ ;  $P \leq 0.05$ ) и 2-ра мин. ( $t = 3.29$ ;  $P \leq 0.01$ ), а на 4-та ги повишава ( $t = 3.34$ ;  $P \leq 0.001$ ), след което отново ги намалява на 5-та мин. ( $t = 3.75$ ;  $P \leq 0.001$ ). SR 141716A повишава достоверно броя на хоризонталните движения на 2-ра ( $t = 3.11$ ;  $P \leq 0.01$ ) и 4-та мин. ( $t = 1.91$ ;  $P \leq 0.05$ ) и го намалява на 5-та мин. ( $t = 1.75$ ;  $P \leq 0.05$ ) в сравнение с ОБХ-контролите, третирани с физиологичен разтвор (фиг. 1).



**Фиг. 1.** Влияние на HU 210 (5  $\mu\text{g}$ ) и SR 141716A (3  $\mu\text{g}$ ), въведени *i.c.v.*, върху броя на хоризонталните движения на плъхове за всяка минута поотделно в продължение на 5-минутно наблюдение.  $^{\circ} P \leq 0.05$ ;  $^{\circ\circ} P \leq 0.01$ ;  $^{\circ\circ\circ} P \leq 0.001$  – достоверност на разликата спрямо контролите, третирани с физиологичен разтвор.  $* P \leq 0.05$ ;  $** P \leq 0.01$ ;  $*** P \leq 0.001$  – достоверност на разликата спрямо ОБХ плъховете, третирани с физиологичен разтвор.

повишава броя на хоризонталните движения на 2-ра ( $t = 3.74$ ;  $P \leq 0.001$ ), 3-та ( $t = 3.17$ ;  $P \leq 0.01$ ), 4-та ( $t = 1.92$ ;  $P \leq 0.05$ ) и 5-та мин. ( $t = 2.49$ ;  $P \leq 0.01$ ) в сравнение с контролите, третирани с физиологичен разтвор (фиг. 1).

ANOVA за броя на хоризонталните движения при ОБХ плъховете показва достоверен ефект за фактора вещество ( $F_{2, 179} = 5.56$ ;  $P \leq 0.01$ ) и фактора време ( $F_{4, 179} = 68.38$ ;  $P \leq 0.001$ ), както и досто-

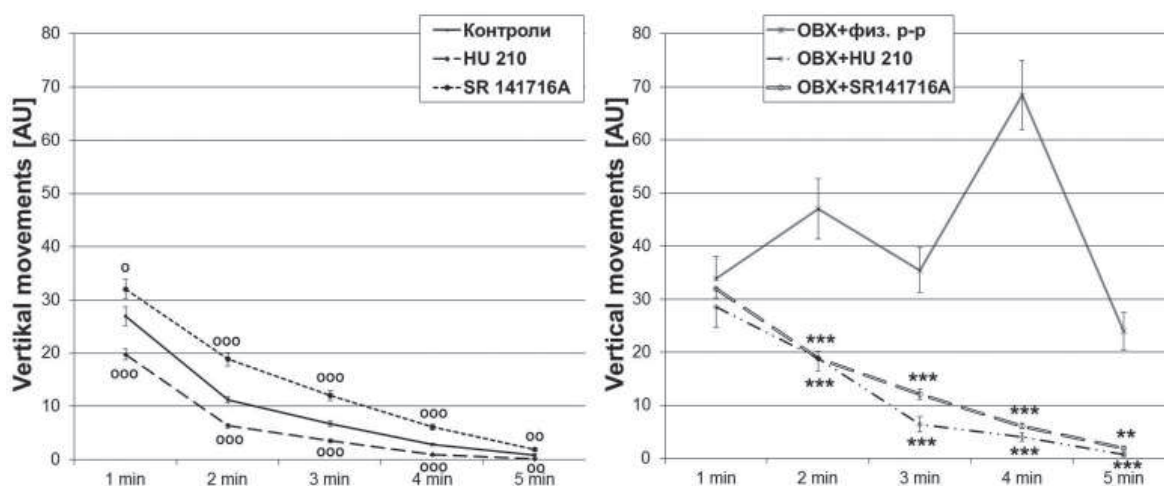
Инжектирането на HU 210 и SR 141716A предизвика промени и в броя на вертикалните движения. Двуфакторният ANOVA при интактни животни показва достоверен ефект за фактора вещество ( $F_{2, 179} = 106.81$ ;  $P \leq 0.001$ ) и фактора време ( $F_{4, 179} = 394.93$ ;  $P \leq 0.001$ ) и достоверно взаимодействие между двата фактора вещество  $\times$  време ( $F_{8, 179} = 7.42$ ;  $P \leq 0.001$ ). При сравняване броя на вертикалните движения на инжектираните с HU 210 или с

SR 141716A плъхове с тези на контролните животни, беше установено, че HU 210 достоверно намалява броя на вертикалните движения, на 1-ва ( $t = 3.48$ ;  $P \leq 0.001$ ), 2-ра ( $t = 6.80$ ;  $P \leq 0.001$ ), 3-та ( $t = 6.12$ ;  $P \leq 0.001$ ), 4-та ( $t = 6.77$ ;  $P \leq 0.001$ ) и 5-та мин. ( $t = 2.51$ ;  $P \leq 0.01$ ), а SR 141716A статистически достоверно ги повишава на 1-ва ( $t = 1.97$ ;  $P \leq 0.05$ ) 2-ра ( $t = 5.36$ ;  $P \leq 0.001$ ), 3-та ( $t = 5.09$ ;  $P \leq 0.001$ ), 4-та ( $t = 6.01$ ;  $P \leq 0.001$ ) и 5-та мин. ( $t = 3.26$ ;  $P \leq 0.01$ ) (фиг. 2).

Двуфакторният ANOVA при OBX плъховете показва достоверен ефект за фактора вещество ( $F_{2, 179} = 94.96$ ;  $P \leq 0.001$ ) и фактора време ( $F_{4, 179} = 20.53$ ;  $P \leq 0.001$ ). Съществува и достоверно взаимодействие между двата фактора вещество  $\times$  време ( $F_{8, 179} = 14.29$ ;  $P \leq 0.001$ ). HU 210 достоверно намалява броя на вертикалните движения, на 2-ра ( $t = 4.58$ ;  $P \leq 0.001$ ), 3-та ( $t = 6.54$ ;  $P \leq 0.001$ ), 4-та ( $t = 9.76$ ;  $P \leq 0.001$ ) и 5-та мин. ( $t = 6.47$ ;  $P \leq 0.001$ ); SR 141716A също значимо понижава броя на движенията на 2-ра ( $t = 5.36$ ;  $P \leq 0.001$ ), 3-та ( $t = 5.09$ ;  $P \leq 0.001$ ), 4-та ( $t = 6.01$ ;  $P \leq 0.001$ ) и 5-та мин. ( $t = 3.26$ ;  $P \leq 0.01$ ) в сравнение с OBX-контролите, третирани с физиологичен разтвор (фиг. 2).

## Дискусия

Прилагането на агонисти на CB1 рецепторите при гризачи предизвиква развитие на т.нар. канабиноидна тетрада, включваща понижена локомоторна активност, хипоалгезия, хипотермия и каталепсия, които изчезват при блокиране на CB1 рецепторите (2). Нашите данни също показват понижаване на локомоторната активност и потискане на експлораторното поведение под действие на агониста на CB1 рецепторите HU 210 и повишаване на експлораторната активност от антагониста SR 141716A, след прилагането им върху интактни животни. Ендоканабиноидната система има важна модулираща роля при освобождаване на невротрансмитери в двигателните зони на мозъчната кора и базалните ганглии, като е основен участник в осъществяването на синаптична пластичност чрез задръжниците и активизиращите интерневрони в тях (14). Polissidis и сътр. регистрират освобождаване на глутамат и допамин в префронталния кортекс и базалните ганглии, което зависи от дозата на CB1 рецепторния агонист WIN55,212-2 и мястото на въвеждане. Установяват и двуфазни промени в локомоторната активност – ниските



**Фиг. 2.** Влияние на HU 210 (5  $\mu\text{g}$ ) и SR 141716A (3  $\mu\text{g}$ ), въведени *i.c.v.*, върху броя на вертикалните движения на плъхове за всяка минута поотделно в продължение на 5-минутно наблюдение.  $^{\circ} P \leq 0.05$ ;  $^{\circ\circ} P \leq 0.01$ ;  $^{\circ\circ\circ} P \leq 0.001$  – достоверност на разликата спрямо контролите, третирани с физиологичен разтвор.  $^* P \leq 0.05$ ;  $^{**} P \leq 0.01$ ;  $^{***} P \leq 0.001$  – достоверност на разликата спрямо OBX плъховете, третирани с физиологичен разтвор.



дозии повишават я и могат да нарушат хабитуацията, а високите дози понижават двигателната активност и експлораторно поведение. Изследването не установява корелация между освобождаването на невротрансмитери и промените в двигателната активност. Прилагането на CB1 рецепторния антагонист SR 141716A, едновременно с WIN55,212-2 блокира описаните ефекти (12). Тези наблюдения подсказват важното значение на взаимодействието между различните корови и подкорови структури в регулацията на движенията.

Нашите резултати показваха, че и двата лиганда, в използваните дози, не нарушават хабитуацията на интактните животни, изразена чрез запазеното постепенно намаляване броя на движенията по време на експлораторния период, въпреки разнопосочното си действие. Това подсказва, че остро прилагане на лиганди на CB1 рецепторите при плъхове не нарушава значимо когнитивните възможности и приспособимостта им при попадане в непозната среда.

При OBX плъховете наблюдавахме характерните за този модел на депресия поведенчески промени, а именно повишена двигателна активност и нарушаване на хабитуацията. Eisenstein и сътр. свързват повишената локомоторна активност и нарушената хабитуация на OBX плъховете с понижените нива на анандамид и 2-AG във вентралния стриатум, при запазена гъстота на CB1 рецепторите. Според тях, ниските нива на ендоканабиноидите може да са последица от дисфункция на ендоканабиноидната система вследствие на булбектомията (3). Установените от нас намалена експлораторна двигателна активност (намаление на вертикалните и хоризонтални движения) и тенденция за нормализиране на хабитуацията при въвеждане на агониста на CB1 рецепторите HU 210 е в подкрепа на горепосоченото изследване.

Наблюдаваната от нас тенденция за понижаване на двигателната активност (брой вертикални движения) предизви-

кана от SR 141716A е възможно да се дължи на превалиране на процеса на "деполяризирано-зависимото потискане на задържането" от ендоканабиноидната система в GABA-интерневроните в мозъчната кора и стриатума, над този на "деполяризирано-зависимото потискане на стимулацията", характерен за глутаматергичните интерневрони. Друг възможен механизъм за намаляване на двигателната активност е анксиолитичното действие на SR 141716A, който се явява антагонист/обратен агонист на CB1 рецепторите (1, 6, 10).

### Заклучение

Лигандите на канабиноидните CB1 рецептори, микроинжектирани i.c.v. на интактни плъхове, проявяват разнопосочен ефект върху експлораторната активност на плъхове (потискане от HU 210 и стимулация от SR 141716A) и не нарушават хабитуацията им.

Прилагането на HU 210 на плъхове с OBX модел на депресия потиска експлораторната активност и показва тенденция към подобряване на нарушената хабитуация, докато SR 141716A намалява само броя на вертикалните движения. Резултатите посочват възможно участие на CB1 рецепторите в експлораторното поведение на плъхове с олфакторна булбектомия.

### Литература

1. Bluett RJ, JC. Gamble-George, DJ. Hermanson et al. Central anandamide deficiency predicts stress-induced anxiety: behavioral reversal through endocannabinoid augmentation. *Transl Psychiatry* 2014; 4: e408.
2. Bosier B, S. Sarre, I. Smolders et al. Revisiting the complex influences of cannabinoids on motor functions unravels pharmacodynamic differences between cannabinoid agonists. *Neuropharmacology* 2010; 59: 503-510.
3. Eisenstein SA, JR. Clapper, PV. Holmes et al. A role for 2-arachidonoylglycerol and endocannabinoid signaling in the

- locomotor response to novelty induced by olfactory bulbectomy. Pharmacol Res* 2010; 61: 419-429.
4. El Manira A, A. Kyriakatos. *The role of endocannabinoid signaling in motor control. Physiology (Bethesda)* 2010; 25: 230-238.
  5. Köhler C, SA. Lorens. *Open field activity and avoidance behavior following serotonin depletion: a comparison of the effects of parachlorophenylalanine and electrolytic midbrain raphe lesions. Pharmacol Biochem Behav* 1978; 8: 223-233.
  6. Lafenêtre P, F. Chaouloff, G. Marsicano. *Bidirectional regulation of novelty-induced behavioral inhibition by the endocannabinoid system. Neuropharmacology* 2009; 57: 715-721.
  7. Mackie K. *Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. In: R G Pertwee, ed. Cannabinoids. Handb Exp Pharmacol, Berlin: Springer-Verlag, 168, 2005: 299-327.*
  8. Mouslech Z, V. Valla. *Endocannabinoid system: An overview of its potential in current medical practice. Neuro Endocrinol Lett* 2009; 30: 153-179.
  9. Ohno-Shosaku T, M. Kano. *Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. Curr Opin Neurobiol* 2014; 29C: 1-8.
  10. Patel S, CJ. Hillard. *Pharmacological evaluation of cannabinoid receptor ligands in a mouse model of anxiety: further evidence for an anxiolytic role for endogenous cannabinoid signaling. J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 304-311.
  11. Pellegrino L, A. Cushman. *A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. Appleton-Century-Crofts, New York, USA, 1967.*
  12. Polissidis A, A. Galanopoulos, G. Naxakis et al. *The cannabinoid CB1 receptor biphasically modulates motor activity and regulates dopamine and glutamate release region dependently. Int J Neuropsychopharmacol* 2013; 16: 393-403.
  13. Pudell C, BA. Vicente, AM. Delattre et al. *Fish oil improves anxiety-like, depressive-like and cognitive behaviors in olfactory bulbectomised rats. Eur J Neurosci* 2014; 39: 266-274.
  14. Rodríguez de Fonseca F, I. Del Arco, FJ. Bermudez-Silva et al. *The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. Alcohol Alcohol* 2005; 40: 2-14.
  15. Tashev R, M. Ivanova, T. Toromanov et al. *Olfactory bulbectomy impairs active and passive avoidance learning in rats.- Compt. Rend. Acad. Bulg. Sci., 63, 2010, 617-620.*
  16. Vinod KY, BL. Hungund. *Role of the endocannabinoid system in depression and suicide. Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 539-545.

**Адрес за кореспонденция:**

Мирослав Димитров Маринов  
Гр. Варна 9002, Ул. "Марин Дринов" №  
55, Медицински университет – Варна,  
Катедра по предклинични  
и клинични науки,  
Тел: 052 677051  
E-mail: mdmarinov@gmail.com