مقایسه تحریک و مهار گیرنده $GABA_B$ ناحیه قاعده‌ای- جانبی آمیگدال بر حافظه

میترا خاکپور[۱،۲]، محمدرضا زرین‌دست[۳*]، اکبر وحدتی[۲]، محمد ناصحی[۳]، سید ابراهیم حسینی[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد علوم و تحقیقات فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، فارس، ایران
۲- گروه زیست شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۳- مرکز علوم و اعصاب شناخت، واحد تهران پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
*مسئول مکاتبات: Zarinmr@ams.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۹ تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۶

چکیده

مطالعات نشان داده که نوروترنسمیتر گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) می‌تواند بر فرایند یادگیری و حافظه در ناحیه قاعده‌ای- جانبی آمیگدال (BLA) تأثیر بگذارد. هدف از این تحقیق بررسی اثرآگونیست و آنتاگونیست رسپتور $GABA_B$ ناحیه BLA بر حافظه در موش‌های نر نژاد ویستار با کمک دستگاه Step-through (مدل حافظه اجتنابی مهاری) می‌باشد. در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر با محدوده وزنی ۲۷۰-۲۲۰ گرم استفاده شد. بعد از قراردادن کانول راهنما به طور دو طرفه در ناحیه BLA، حیوانات در دستگاه Step-through آموزش دیدند و سپس ۲٤ ساعت بعد از آموزش، میزان بازیابی حافظه و فعالیت حرکتی آنها مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. تزریق پس از آموزش باکلوفن، آگونیست رسپتور $GABA_B$ (۰/۰۱ میکروگرم بر موش) یا فاکلوفن، آنتاگونیست رسپتور $GABA_B$، (۰/۰۱ میکروگرم بر موش) تثبیت حافظه را کاهش می‌دهد، اماتأثیری بر فعالیت حرکتی ندارد. در نتیجه باکلوفن و فاکلوفن تثبیت حافظه را در BLA کاهش می‌دهند و رسپتور $GABA_B$ در کاهش تثبیت حافظه نقش دارد.

کلمات کلیدی: باکلوفن، فاکلوفن، GABA، BLA، دستگاه حافظه اجتنازی.

مقدمه

ساختارهایی از مغز شامل آمیگدال، هیپوکامپ و سپتوم در فرایند تثبیت حافظه دخیل هستند [۱۲، ۱۳]. فعالیت ورودی‌های BLA ایجاد LTP (تقویت طولانی‌مدت) می‌کند که منجر به آزادسازی گلوتامات می‌شود [۲۷]. BLA از هسته‌های ورودی با اهمیت در آمیگدال است و شامل دو نوع مهم از نورون‌هاست [۳٤]. نورون‌های گلوتاماترژیک (۸۰ درصد) با شاخه‌های دندریتی متعدد که با آکسون‌هایی پوشیده می‌شود که با سلول‌های مجاور BLA مثل هسته‌های آمیگدال یا سایر نواحی مغز مدارهایی را فراهم می‌کنند و اینترنورون‌های گاباارژیک (۲۰ درصد) با خارهای دندریتی نازک و آکسون‌های کوتاه [۲۰] هنگامی که گابا از انتهای نورون مهاری آزاد می‌شود به گیرنده‌های خود متصل شده و باعث ایجاد هیپرپلاریزاسیون می‌شود و در نتیجه امکان رسیدن نورون پس‌سیناپسی را به نقطه آتش کاهش می‌دهد. تاکنون سه نوع گیرنده برای گابا شناسایی شده است که به نام $GABA_A$، $GABA_B$ و $GABA_C$ معروف هستند.

زیرگروه‌های این گیرنده‌ها با یکدیگر در خواص فارماکولوژیک و رفتارهای فیزیولوژیک متفاوت می‌باشند [۳]. دو گروه اصلی گیرنده‌های نوروترانسمیتر گابا را می‌توان به دو گروه عمده یونوتروپیک (گیرنده‌های $GABA_A$/GABAc) و متابوتروپیک (گیرنده $GABA_B$) طبقه بندی نمود. اتصال لیگاند به گیرنده‌های یونوتروپیک یا کانال‌های یونی وابسته به لیگاند، باعث تغییر در ساختمان فضایی گیرنده و باز شدن کانال می‌شود. در نتیجه یون‌های خاصی امکان جابجایی از خلال غشاء را پیدا می‌کنند. بنابراین این گیرنده‌ها به صورت مستقیم بر کانال‌های یونی تاثیر می‌گذارند. اصولاً کانال‌های یونی

Archive of SID
www.SID.ir

وابسته به لیگاند ایجاد یک جواب سریع در نورون پس-سیناپسی می‌کنند که چندین هزارم ثانیه طول می‌کشد. گیرنده‌های $GABA_A$، گلیسین، سروتونین، نیکوتینی و استیل کولین از این دسته می‌باشند [۵].

پس از دپلاریزه شدن غشای سلول پیش سیناپسی، رهایی گابا بداخل شکاف سیناپسی صورت می‌گیرد. در آنجا گابا روی گیرنده‌های خود در نورون پس‌سیناپسی عمل کرده و موجب باز شدن کانال‌های آنیونی می‌شود و آنها را فعال می‌کند [۱۸].

گیرنده‌های $GABA_B$ می‌توانند به دو صورت پیش-سیناپسی و پس‌سیناپسی متمرکز شوند [٤، ٢٤]. فعال شدن گیرنده‌های پیش سیناپسی $GABA_B$ که در پایانه‌های عصبی حاوی GABA (اتورسپتورها) و یا در پایانه‌های مختلف نورون‌های دیگر (هترورسپتور) مستقر می‌باشند از آزادسازی نوروترانسمیتر جلوگیری می‌کند در حالیکه تحریک گیرنده‌های پس‌سیناپسی باعث طولانی‌تر شدن هیپرپولاریزاسیون عصبی می‌گردد. [۲۱]. مکانیسم اول به صورت واسطه‌ای, توسط مهار کنداکتانس کلسیم درونی ظاهر می‌گردد, در حالی که مکانیسم دوم توسط یک افزایش در کنداکتانس پتاسیم ایجاد می‌شود [۲۱]. در هر دو مورد گیرنده‌های $GABA_B$ از طریق G پروتئین‌ها به مکانیسم کنداکتانس جفت می‌شود [۳۰].

هدف از این مطالعه، بررسی داروهای آگونیست و آنتاگونیست گابا در ناحیه BLA بر روی حافظه غیرفعال مهاری با استفاده از دستگاه حافظه احترازی (step-through) می‌باشد.

مواد و روش کار

در این پژوهش از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۷۰– ۲۲۰ گرم استفاده شد. کلیه حیوانات از پژوهشکده علوم شناختی تهیه شده، در حیوانخانه‌ای با دمای ۲ ± ۲۲ درجه سانتی‌گراد، دوره‌ی روشنایی– تاریکی ۱۲ ساعته (شروع روشنایی از ساعت ۷ صبح)، بدون هرگونه آلودگی صوتی و در قفس‌های مخصوص به صورت گروه‌های چهارتایی نگهداری می‌شدند. حیوانات به‌طور آزادانه بجز هنگام آزمایش‌های رفتاری– به آب و غذا دسترسی داشتند. رطوبت تابع شرایط رطوبتی هوای آزاد بود و شرایط بهداشتی در حد مطلوب بود. به منظور کم کردن استرس حیوانات در حین آزمایش‌ها، Handling (دست ورزی) آنها به مدت یک هفته هر روز پنج دقیقه انجام می‌شد. هر حیوان یک بار مورد استفاده قرار می-گرفت و هر گروه شامل هشت حیوان بود. تمامی آزمایش‌ها در طی مرحله نوری دوره‌ی روشنایی– تاریکی، بین ساعت۱۲–۸ صبح انجام می‌گرفت. همچنین همه آزمایشات طبق اصول اخلاقی در جهت حفاظت از حیوانات صورت گرفت.

داروها: داروهای مورد استفاده در این تحقیق عبارت بودند از باکلوفن آگونیست گیرنده GABAB (ساخت شرکت Tocris) و فاکلوفن آنتاگونیست گیرنده GABAB (ساخت شرکت Tocris). کلیه داروها در محلول سرم فیزیولوژیک ۰/۹٪ استریل بلافاصله قبل از آزمایش حل می‌شدند و بعد از حل شدن دور از نور و در شیشه‌های مخصوص نگهداری می‌شدند. برای حل شدن بیکوکولین یک قطره اسیداستیک به عنوان حامل به محلول اضافه می‌شد. گروه‌های کنترل سرم فیزیولوژیک ۰/۹٪ استریل یا به اصطلاح سالین۱۰ دریافت می‌کردند.

روش جراحی و کانول‌گذاری ناحیه BLA : در این روش با استفاده از دستگاه استریوتاکسی و به کمک اطلس پاکسینوس [۲۵] در هسته BLA کانول‌گذاری انجام می-شد. هر حیوان در مرحله اول با محلول کتامین و زایلزین به صورت داخل صفاقی بیهوش می‌شد. پس از بیهوشی کامل حیوان، ابتدا موهای ناحیه فوقانی سر که جراحی در آن ناحیه صورت می‌گرفت با قیچی برداشته می‌شد. سپس حیوان در دستگاه استریوتاکسی قرار داده می‌شد. مختصات اطلس ناحیه BLA برابر (خلفی (AP): ۲/۲– میلی متر از برگما، جانبی (ML): ۵/۱± میلی‌متر از خط وسط، عمق (DV): ۸/٤– میلی‌متر از سطح جمجمه). پس از مشخص کردن نقاط مربوط به هسته مورد نظر در

www.SID.ir

Archive of SID

سمت راست و چپ و علامت گذاری آنها، در نقاط مربوطه با استفاده از مته دندانپزشکی سوراخی به قطر۱ میلی‌متر ایجاد می‌شد. قبل از جراحی با استفاده از سر-سوزن شماره ۲۲، کانول‌های راهنما برای هسته BLA به طول mm ۱۳ تهیه می‌شد. از سرسوزن دندانپزشکی شماره ۲۷ شاخک‌هایی با طولی برابر با طول کانول راهنما به-اضافه ناحیه‌ای که بخش شاخک را تشکیل می‌داد تهیه می‌شد. بر اساس مختصات به‌دست آمده نسبت به سطح جمجمه، مختصات نقاط عمقی به دست می‌آمد و با استفاده از خط‌کش عمودی کانول تا نقطه مورد نظر در سوراخ جمجمه قرار داده می‌شد. با استفاده از سیمان دندانپزشکی کانول‌های گذاشته شده، محکم می‌شد. در پایان، بخش باز شده‌ی سطح جمجمه با استفاده از سیمان دندانپزشکی پوشانده می‌شد. پس از طی این مراحل، حیوان از دستگاه استریوتاکسی خارج می‌شد و به مدت یک هفته دوره بهبودی را سپری می‌کرد.

روش تزریق داخل مغزی: برای تزریق دارو به داخل نواحی مورد نظر، از یک کانول تزریق به طول mm ۱۵ استفاده می‌شد. تزریق داروها به‌وسیله سرنگ هامیلتون یک میکرولیتری متصل به لوله پلی‌اتیلنی به طول ۱۰ سانتی‌متر (PE-10) انجام می‌شد. هنگام تزریق، ابتدا شاخک مسدود کننده داخل کانول راهنما بیرون آورده شده و کانول تزریق به آرامی درون کانول راهنما قرار می-گرفت؛ سپس ۰/۳ میکرولیتر دارو یا سالین از طریق هر یک از کانول‌ها به مدت یک دقیقه تزریق می‌شد. در طی مدت تزریق سعی می‌شد هیچ گونه استرسی به حیوان وارد نشود. برای اطمینان از جذب کامل دارو از طریق کانول تزریق به داخل ناحیه مغزی مورد نظر، کانول تزریق با تاخیر ٦۰ ثانیه‌ای پس از تزریق خارج می‌شد.

دستگاه بررسی حافظه: یادگیری اجتنابی غیرفعال/مهاری یکی از رایج‌ترین الگوهای رفتاری جهت مطالعه حافظه طولانی‌مدت در جوندگان است [١٤، ١٦، ٢٦]. دستگاه یادگیری اجتنابی مهاری (غیر فعال)، مدل Step-through، از جعبه‌ای تشکیل شده که به‌وسیله یک دیواره به دو محفظه با اندازه یکسان cm ۳۰×۲۰×۲۰ تقسیم می‌شود. در وسط دیواره بین دو محفظه یک درب گیوتینی با ابعاد cm ۷×۹ وجود دارد که می‌تواند در مواقع لزوم برداشته شود. یکی از محفظه‌ها سفید می‌باشد و از کف و دیواره-هایی از جنس پلکسی‌گلاس سفید ساخته شده است. محفظه دیگر دستگاه تاریک است و دیواره‌های آن از جنس پلکسی‌گلاس سیاه می‌باشد، در کف این محفظه میله‌های فولادی با فاصله cm ۱ از هم قرار دارند. این میله‌ها به‌وسیله سیم رابط به یک دستگاه استیمولاتور متصل می‌باشند و اعمال شوک به حیوانات مورد آزمایش را ممکن می‌سازند. شوکی به میزان (50 Hz, 3 s, 1 mA) به کف پای حیوان وارد می شود. در طی آزمایشات، اتاق آزمایش باید نسبتاً تاریک و بدون سر و صدا باشد. از آنجایی که موش‌های صحرایی به‌طور ذاتی تاریکی را می-پسندند محفظه تاریک را ترجیح می‌دهند.

روش انجام آزمایش حافظه: روش اجتنابی مهاری برای بررسی حافظه موش‌های صحرایی در دو روز پشت سر هم انجام می‌شود. روز اول یا روز آموزش شامل آموزش دادن حیوانات در دستگاه می‌باشد و روز دوم یا آزمون شامل بررسی میزان حافظه حیوانات آموزش‌دیده است.

در مرحله آموزش در روش اجتنابی مهاری مدل Step-through، هر حیوان به آرامی در محفظه روشن دستگاه قرار می‌گیرد و به مدت ۵ ثانیه به آن اجازه داده می‌شود که در این محفظه بماند تا با آن آشنا شود. پس از گذشت ۵ ثانیه، درب گیوتینی باز شده و به حیوان اجازه داده می-شود تا از محفظه روشن به محفظه تاریک وارد شود؛ سپس درب گیوتینی پشت سر حیوان بسته شده و حیوان به آرامی به قفس خود برگردانده می‌شود. با توجه به تمایل ذاتی موش‌ها برای ورود به محفظه تاریک، بعد از مدت زمان اندکی موش از بخش روشن وارد بخش تاریک دستگاه می‌شود. موش‌هایی که بیشتر از ۱۰۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک تاخیر داشته باشند از ادامه آزمایش حذف می‌شوند. پس از گذشت ۲۵ دقیقه این حیوان به محفظه سفید دستگاه منتقل می‌شود. بعد از ۵

Archive of SID

www.SID.ir

ثانیه درب گیوتینی باز می‌شود تا حیوان وارد محفظه تاریک شود. با ورود حیوان به محفظه تاریک، درب گیوتینی پشت سرش بسته شده و حیوان یک تحریک الکتریکی با شدت یک میلی‌آمپر و به مدت ۳ ثانیه که توسط استیمولاتور به میله‌های فولادی کف محفظه تاریک اعمال می‌شود ، دریافت می‌کند. با توجه به بسته بودن سقف این محفظه، موش نمی‌تواند از شوک الکتریکی اجتناب کند (شوک اجتناب ناپذیر). ۲۰ ثانیه پس از پایان تحریک، موش از دستگاه خارج شده و به قفس خود بازگردانده می‌شود. پس از گذشت ۲ دقیقه، مرحله آزمایش دوباره بر روی موشی که شوک گرفته بود انجام می‌شود (Retest). در این مرحله موش مانند دفعات قبل به محفظه سفید دستگاه منتقل شده و درب گیوتینی باز می‌شود و میزان تاخیر موش در ورود به محفظه تاریک ثبت می‌شود. چنانچه موش به میزان ۱۲۰ ثانیه در ورود به بخش تاریک تاخیر داشته باشد اصطلاحاً یادگیری موفقبرایش ثبت می‌شود و از دستگاه خارج شده و به قفس خود منتقل می‌شود و بلافاصله تزریق بعد از آموزش را دریافت می‌کند. اما اگر موش در ورود به محفظه تاریک کمتر از ۱۲۰ ثانیه تاخیر داشته باشد، پس از ورود به بخش تاریک درب گیوتینی پشت سرش بسته شده و شوک را برای بار دوم دریافت می‌کند. پس از خارج کردن حیوان از دستگاه و گذشت دو دقیقه دوباره Retest انجام می‌شود و در صورت کسب یادگیری موفق، از دستگاه خارج شده و به قفس خود برگردانده می‌شود و تزریق بعد از آموزش را بلافاصله دریافت می‌کند.

مرحله آزمون یا بررسی حافظه، ۲٤ ساعت بعد از مرحله آموزش انجام می‌شود. در جلسه آزمون، از ابتدا درب گیوتینی بین دو محفظه باز است و دیگر تحریک الکتریکی استفاده نمی‌شود. برای بررسی حافظه، هر موش مانند روز اول در محفظه روشن دستگاه قرار داده می‌شد و زمان تاخیر ورود حیوان به محفظه تاریک دستگاه ثبت شده و به عنوان معیاری برای بررسی میزان حافظه در نظر گرفته می‌شد. بیشترین مقدار تاخیر ورود به محفظه تاریک ۳۰۰ ثانیه در نظر گرفته می‌شد. اگر موش به خاطر می-آورد که در محفظه تاریک دستگاه شوک گرفته، تمایلش را جهت ورود به محفظه تاریک مهار می‌کرد، از ورود به آن محفظه اجتناب می‌کرد (روش اجتنابی مهاری)، تاخیر حیوان در ورود به محفظه تاریک نسبت به روز آموزش به طور قابل توجهی افزایش می یافت و اصطلاحاً حافظه بهتری نسبت به روز قبل داشت.

دستگاه اندازه‌گیری فعالیت حرکتی: دستگاه اندازه‌گیری فعالیت حرکتی از جعبه‌ای با دیواره‌های شیشه‌ای و کف سیاه رنگ به ابعاد cm ٤٠×۳۰×۳۰ تشکیل شده است. این دستگاه از قطعات پلکسی‌گلاس خاکستری رنگ cm ۲/۲×۳۰×۳۰ همراه با ۱٦ فتوسل که دستگاه را به ۱٦ قسمت مساوی تقسیم می‌کند، تشکیل شده است. تعداد حرکت از یک قسمت به قسمت دیگر در مدت ۵ دقیقه به عنوان فعالیت حرکتی یادداشت می‌شود.

روش اندازه‌گیری فعالیت حرکتی: مرحله اندازه‌گیری فعالیت حرکتی نیز همانند آزمون حافظه، ۲٤ ساعت بعد از مرحله آموزش انجام می‌شد. در جلسه آزمون بعد از بررسی حافظه، هر موش به دستگاه اندازه‌گیری فعالیت حرکتی منتقل شده و تعداد حرکت حیوان در مدت ۳۰۰ ثانیه یادداشت می‌شد. به هنگام اندازه‌گیری فعالیت حرکتی موش‌هایی که آزادانه در دستگاه حرکت می‌کردند، دارای فعالیت حرکتی طبیعی بودند؛ ولی موش‌هایی که ثابت بوده و حرکتی نداشتند، دارای اختلال حرکتی (فعالیت حرکتی غیر طبیعی) بودند. اگر موش فعالیت حرکتی طبیعی داشته باشد، بیانگر آن است که حافظه ثبت شده حیوان ناشی از تغییر فعالیت حرکتی در دستگاه Step-through نمی‌باشد. موش‌هایی که کاهش و/یا افزایش غیرطبیعی فعالیت حرکتی نشان می‌دادند در آنالیز آماری استفاده نمی‌شدند.

بافت‌شناسی: پس از پایان آزمایش‌ها، هر حیوان توسط دوز بالایی از کلروفرم قربانی می‌شد و محلول متیلن بلو ٤٪ به داخل نواحی مغزی جراحی شده تزریق می‌شد. مغز

www.SID.ir

Archive of SID

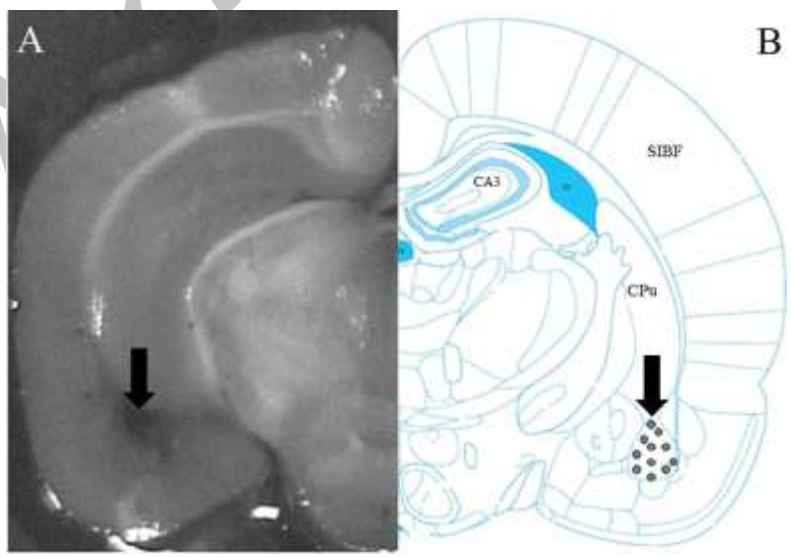
حیوانات خارج گردیده و در محلول فرمالین ۱۰٪ به مدت سه روز قرار داده می‌شد؛ سپس جهت بررسی صحت محل کانول‌ها، ناحیه قرارگیری کانول‌ها برش‌گیری می‌شد و با اطلس پاکسینوس تطبیق داده می‌شد. داده‌های مربوط به حیواناتی که محل قرارگیری کانول صحیح نبود در آنالیزهای آماری استفاده نمی‌شدند.

تیمارهای دارویی و آزمایش‌های انجام شده: اثرات تزریق پس از آموزش باکلوفن و فاکلوفن در هسته BLA بر روی حافظه اجتنابی مهاری و فعالیت حرکتی بررسی شد. در این مطالعه، سه گروه ۸ تایی از حیوانات به کار برده شد. حیوانات سالین (به عنوان گروه کنترل) یا دوز ۰/۰۱ µg/rat باکلوفن (آگونیست گیرنده GABAB)، یا دوز (۰/۰۱ µg/rat) فاکلوفن(آنتاگونیست گیرنده GABAB) را پس از آموزش در هسته BLA دریافت می‌کردند. فعالیت حرکتی حیوانات ۵ دقیقه بعد از آزمون حافظه ثبت می‌شد. در این آزمایش آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام شد.

آنالیز آماری: آنالیز داده‌ها با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام شد. به‌دنبال معنی‌دار بودن P-value، آنالیز مکمل با استفاده از آزمون توکی، برای بررسی مقایسه معنی‌دار بودن تک‌تک گروه‌ها با گروه کنترل انجام می‌شد. سطح معنی‌داری آماری ۰/۰۵ >p در نظر گرفته شد. محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 15 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Sigma plot 10.0 انجام شد.

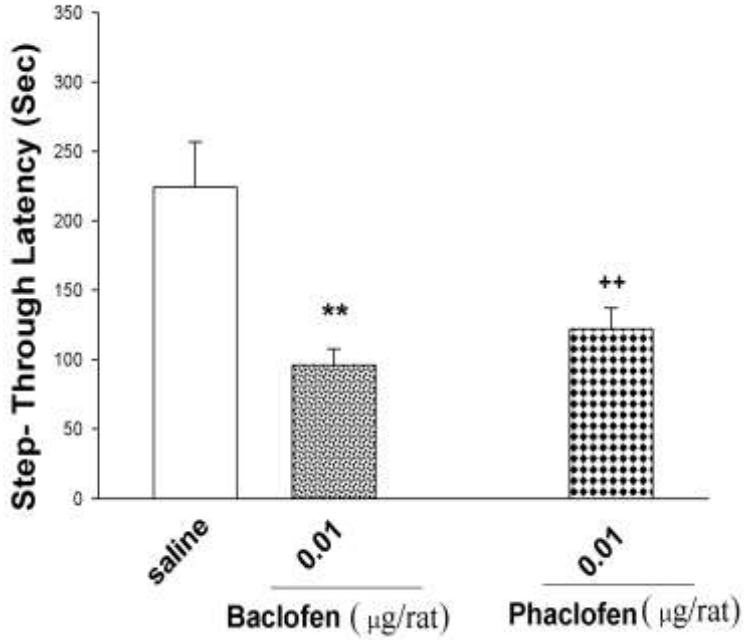
نتایج

نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق پس از آموزش باکلوفن [$F(1,14) = 49.743, P < 0.001$] و فکلوفن [$F(1, 14) = 27.918, P < 0.001$] به هسته BLA حافظه اجتنابی مهاری را تغییر می‌دهد. نتایج post hoc نشان داد که دوز ۰/۰۱ µg/rat باکلوفن و دوز ۰/۰۱ µg/rat فکلوفن تثبیت حافظه را در دستگاه Step -through کاهش می‌دهند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که تزریق پس از آموزش باکلوفن و فکلوفن در هسته BLA تثبیت حافظه را کاهش می‌دهد. همچنین آنالیز واریانس یک‌طرفه نشان داد که تزریق پس ازآموزش باکلوفن [$F(1,14) = 3.773, P > 0.05$] و فکلوفن [$F(1 , 14) = 0.649, P > 0.05$] به هسته BLA تاثیری بر فعالیت حرکتی ندارد (نمودارهای ۱ و ۲).



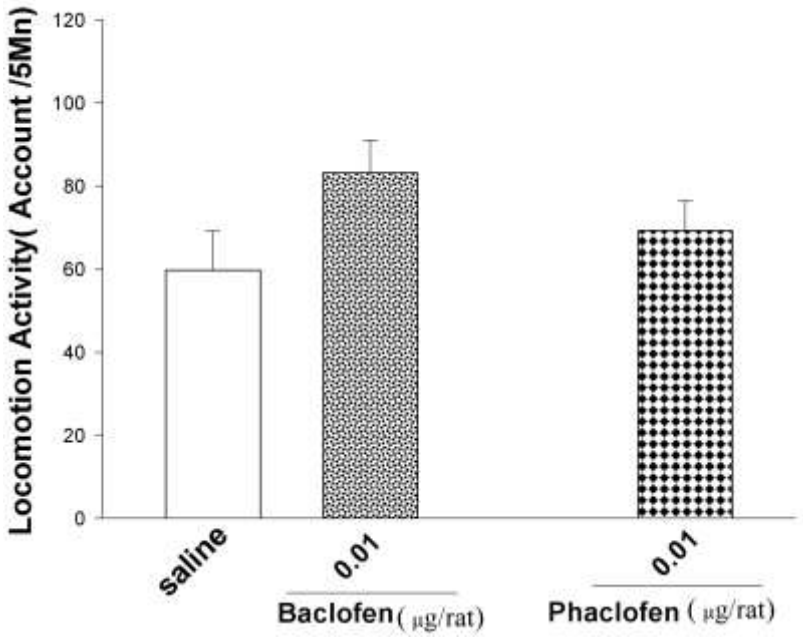
شکل ۱- موقعیت BLA در برش بافتی حاصل از دستگاه Vibro Slice و تهیه عکس از مناطق مغزی کانول گذاری شده. A: موقعیت رأس کانول تزریق در BLA برای همه رت‌های مورد آزمایش که آنالیز آماری شدند. B: برش تأیید شده با اطلس پاکسینوس و واتسون [۲۵].

www.SID.ir



نمودار ۱- اثر تزریق پس از آموزش باکلوفن و فکلوفن به داخل هسته **BLA** بر روی حافظه اجتنابی مهاری.

حیوانات پس از آموزش در ناحیه BLA سالین (۰/٦ µl/rat)، باکلوفن [(۰/۰۱ µg/rat)، فکلوفن (۰/۰۱µg/rat) را در BLA دریافت می‌کردند. حافظه و فعالیت حرکتی ۲٤ ساعت بعد از تزریق داروها بررسی می‌شد. تعداد حیوانات آزمایشگاهی در هر گروه هشت سر بود و داده‌ها به صورت Mean ± S.E.M نشان داده شده‌اند.* $p<0.05$، ** $p<0.01$،*** $p<0.001$، $p < 0.05$ +، ++ $p <0.01$، +++ $p<0.001$، اختلاف معنی‌دار را با گروه کنترل سالین/ سالین نشان می‌دهند.



نمودار ۲- اثر تزریق پس از آموزش باکلوفن و فکلوفن به داخل هسته **BLA** بر روی فعالیت حرکتی.

www.SID.ir

بحث

در یادگیری و حافظه، BLA یک نقش اساسی دارد [۲۲، ۹]. BLA می‌تواند بر شکل پذیری سیناپسی موثر باشد که فرایند تثبیت حافظه را تسهیل می‌کند [۱۷]. وقتی رت در معرض یک محرک تنش‌زای حاد از قبیل شوک کف پا قرار می‌گیرد، BLA فعالیت نشان می‌دهد. به طوریکه یک شوک که به کف پای رت بیهوش داده می‌شود، باعث یک فعالیت قدرتمند ورودی‌های تحریکی به BLA می‌شود [۲۸]. BLA نقش کلیدی در تشکیل حافظه اجتناب مهاری دارد [۱۳، ۱۲]. مزیت استفاده از مهارت اجتنابی غیرفعال آن است که این مهارت بر اساس تمایل ذاتی جوندگان برای دوری جستن از روشنایی و ورود به تاریکی می‌باشد. [۱۵]. نتایج حاصل از این مطالعه مطابق با سایر گزارشات نشان داد که تزریق باکلوفن به داخل BLA، تثبیت حافظه را کاهش می‌دهد [۱، ۱۵]. دوز (µg/rat ۰/۰۱) باکلوفن تاخیر زمان به یادآوری را کاهش داد اما بر فعالیت حرکتی تاثیری نداشت.

مشخص شده که در تعدادی از پستان داران شامل موش سوری، رت و میمون گیرنده $GABA_B$ باعث تغییر در الگوهای رفتاری می‌شود [۷، ۲۳]. آگونیست‌های رسپور $GABA_B$ در مطالعه روی حیوانات آزمایشگاهی باعث اختلال حافظه می‌شود [۳۲].

Castellano و همکاران نشان دادند که تزریق باکلوفن به داخل آمیگدال موش‌های صحرایی در روش اجتنابی غیرفعال، حافظه را مختل می‌کند [۱، ۸]

Stackman و همکاران در سال ۱۹۹٤ اثرات تزریق درون سپتومی باکلوفن را بر روی یادگیری فضایی موش‌های صحرایی در ماز شعاعی بررسی کردند. در این آزمایش باکلوفن با ۳ دوز nmol ۳، ۱/۵ و ۰/۷۵ به درون سپتوم تزریق شد. نتایج آزمایش نشان داد که تزریق بعد از آموزش باکلوفن با دوز nmol ۳ تعداد انتخاب‌های صحیح را در ماز کاهش داده و تعداد اشتباهات انجام شده در طی تست را بدون اثر بر تاخیر در انتخاب بازو یا توانایی حرکتی موش‌ها افزایش می‌دهد. حال آنکه دوزهای nmol ۱/۵ و ۰/۷۵ هیچ اثری بر انجام عمل موش‌ها ندارد [۳۳]. تزریق داروهای گاباارژیک ممکن است از طریق تاثیر بر سیستم گاباارژیک آمیگدال فرایند تثبیت حافظه را تحت تاثیر قرار دهند [٦]. آسیب مشاهده شده به وسیله تزریق باکلوفن با نتایجی که از تزریق این دارو به صورت محیطی و مرکزی صورت گرفته است، مطابقت دارد [۸]. برای مثال در مهارت شرطی شدن اجتنابی تزریق سیستمیک باکلوفن بعد از آموزش هم تسهیل [۲۹] و هم تخریب [۱۸] کسب پاسخ شرطی شده را در بردارد. شواهدی نیز موجود است که نشان می‌دهند آگونیست‌های گیرنده گابا باعث افزایش و تقویت حافظه می‌شوند [۳۱]. تحریک فارماکولوژیکی رسپتور $GABA_B$ برروی نورون‌های هرمی اثر بازدارندگی در انتقال گلوتاماترژیک نشان خواهد داد. بیشترین میزان هترورسپتورهای $GABA_B$ پیش‌سیناپسی در پایانه‌های نورون‌های گلوتاماترژیک شناخته شده است. فعالیت این رسپتورها، رهاسازی آمینواسید تحریکی را مهار خواهد کرد [١٦].

مطالعات دیگر گویای آن است که اتورسپتورهای $GABA_B$ القای تقویت طولانی مدت (LTP) را تنظیم می‌کنند و نقش گیرنده‌های $GABA_B$ را در شکل‌پذیری سیناپسی مطرح می‌کنند [۱۰]. بر اساس تحقیقات الکتروفیزیولوژیکی روشن شده است که تمامی نورون‌های سیستم اعصاب مرکزی و سلول‌های گلیا به گابا حساسند، حتی آنهایی که ورودی گاباارژیک دریافت نکرده‌اند [۱۱]. نتایج حاصل از فعالیت گیرنده‌های پیش‌سیناپسی $GABA_B$ حاکی از آن است که این گیرنده‌ها کاهش رهایی GABA را در سیناپس‌های مهاری و آزادسازی گلوتامات در سیناپس‌های تحریکی ایجاد می‌کنند [٢٤].

همچنین مشخص شده که باکلوفن آزادسازی گلوتامات را در برش‌های قشری خوکچه هندی، از طریق تاثیر بر روی گیرنده‌های پیش سیناپسی $GABA_B$ کاهش می‌دهد. بنابراین با توجه به نقش گلوتامات در القاء پدیده LTP، می‌توان یکی از علل کاهش حافظه القاء شده توسط

www.SID.ir

باکلوفن را بوسیله کاهش آزادسازی گلوتامات از پایانه نورون‌های پیش سیناپسی توجیه کرد.

برخلاف مطالعات گذشته [۲۳]، این مطالعه نشان داد که تزریق فکلوفن به داخل BLA، تثبیت حافظه را کاهش می‌دهد. دوز (۰/۰۱ µg/rat) فکلوفن تاخیر زمان به یادآوری را کاهش داد. اما بر فعالیت حرکتی تاثیری نداشت.

موندادوری و همکارانش نشان دادند که آنتاگونیست‌های گیرنده $GABA_B$ مانند ۲–هیدروکسی ساکلوفن، فاکلوفن، CG۳۵۳٤۸ و CGP٥٦۷٤۲ نارسایی یادگیری و حافظه را در میمون‌ها بهبود می‌بخشد [۲۳]. مشاهداتی مبنی بر آزادسازی GABA توسط اتورسپتورهای $GABA_B$ نیز در دست می‌باشد [۲]. از این جهت فکلوفن می‌تواند با رهاسازی GABA و نشستن بر روی گیرنده‌های GABAA باعث مهار حافظه گردد. این اثرات متفاوت فکلوفن ممکن است به علت تفاوت در شدت شوک یا تفاوت در دوزهای مورد استفاده باشد.

نتیجه‌گیری

در نتیجه مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که باکلوفن و فاکلوفن تثبیت حافظه را در BLA کاهش می‌دهند اما بر فعالیت حرکتی تأثیری ندارند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات پرسنل محترم پژوهشکده علوم شناختی تهران که ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

1. Ammassari-Teule M., Pavone F. Castellano C., McGaugh J.L. (1991), *Amygdala* and dorsal *hippocampus* lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. *Brain Research*, 551(1-2): 104-109.

2. Bonanno G., Raiteri M., Marchi M., Maura G. (1984), Is there a functional linkage between neurotransmitter uptake mechanisms and presynaptic receptors? *J Pharmacol Exp Ther*, 231(3): 671-677.

3. Bormann J. (2000) The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 21(1): 16-19.

4. Bowery N.G., Bettler B., Froestl W., Gallagher J.P., Marshall F., Raiteri M., Bonner T.I., Enna S.J. (2002), International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev*, 54(2): 247-264.

5. Bowman W.C., Rand M.J. (1980), Textbook of pharmacology. second edition. Blackwell Scientific Publication.

6. Brioni J.D., Castellano, C. Nagahara, A. H. McGaugh, J. L. (1989) Post-training systemic and intra-*amygdala* administration of the GABA-B agonist baclofen impairs retention. *Behav Neural Biol*, 52(2): 170-179.

7. Carletti F., Nami R. Martinelli M. Buracchi P., Lucani B., Panza F., Pavese G., Saia F., Gennari C. (1993), [Role of aldosterone in essential arterial hypertension complicated by chronic renal insufficiency]. *Minerva Urol Nefrol*, 45(2): 37-45.

8. Castellano C., Cestari V., Cabib S., Puglisi-Allegra S. (1991), Post-training dopamine receptor agonists and antagonists affect memory storage in mice irrespective of their selectivity for D1 or D2 receptors. *Behav Neural Biol*, 56(3): 283-291.

9. Chegini H.R., Nasehi M., Zarrindast M.R. (2014) Differential role of the *basolateral amygdala* 5-HT3 and 5-HT4 serotonin receptors upon ACPA-induced anxiolytic-like behaviors and emotional memory deficit in mice. *Behav Brain Res*, 261: 114-126.

10. Davies W.E. (1981), The effect of lesions of the dorsal acoustic stria on the levels of glutamic acid decarboxylase and GABA transaminase in the inferior colliculus and cochlear nucleus of the guinea-pig. *Neurochem Int*, 3(5): 343-347.

11. Enns C.A., Sussman H.H. (1981), Similarities between the transferrin receptor proteins on human reticulocytes and human placentae. *J Biol Chem*, 256(24):12620-12623.

Archive of SID

www.SID.ir

mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*, 46(4): 423-462.

22. Mohammadi M., Nasehi M., Zarrindast M.R. (2015), Modulation of the effects of the cannabinoid agonist, ACPA, on spatial and non-spatial novelty detection in mice by dopamine D1 receptor drugs infused into the *basolateral amygdala*. *Behav Brain Res*, 280: 36-44.

23. Mondadori C., Weiskrantz L. (1993), NMDA receptor blockers facilitate and impair learning via different mechanisms. *Behav Neural Biol*, 60(3): 205-210.

24. Mott D.D., Lewis D.V. (1994), The pharmacology and function of central GABAB receptors. *Int Rev Neurobiol*, 36: 197-223.

25. Paxinos G., Watson C.R., Emson P.C. (1980), AChE-stained horizontal sections of the rat brain in stereotaxic coordinates. *J Neurosci Methods*, 3(2): 129-149.

26. Riedel G., Platt B., Micheau J. (2003), Glutamate receptor function in learning and memory. *Behav Brain Res*, 140(1-2): 1-47.

27. Rodrigues S.M., Schafe G.E., LeDoux J.E. (2001), Intra-*amygdala* blockade of the NR2B subunit of the NMDA receptor disrupts the acquisition but not the expression of fear conditioning. *J Neurosci*, 21(17): 6889-6896.

28. Rosenkranz J.A., Grace A.A. (2002), Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *J Neurosci*, 22(1): 324-337.

29. Saha N., Chugh Y., Sankaranaryanan A., Sharma P. L. (1993), Effects of post-training administration of (-)-*baclofen* and chlordiazepoxide on memory retention in ICRC Swiss mice: interactions with GABAA and GABAB receptor antagonists. *Pharmacol Toxicol*, 72(3): 159-162.

30. Semyanov A. (2002), GABA-ergic inhibition in the CNS: Type of GABA receptors and mechanisms of tonic GABA-mediated inhibitory action. *Neurophysiology* 34: 82-92.

12. Gruart A., Munoz M.D., Delgado-Garcia J.M. (2006), Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci*, 26(4): 1077-1087.

13. Izquierdo I., Bevilaqua L.R., Rossato J.I., Bonini J.S., Medina J.H., Cammarota M. (2006), Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation. *Trends Neurosci*, 29(9): 496-505.

14. Jafari M.R., Zarrindast M.R., Djahanguiri B. (2006), Influence of cholinergic system modulators on morphine state-dependent memory of passive avoidance in mice. *Physiol Behav*, 88(1-2): 146-51.

15. Jagdev N., Barar F.S. (1982), Effect of physostigmine and atropine on the single-trial passive avoidance response in rats. *Indian J Physiol Pharmacol*, 26(3): 201-6.

16. Joanna W., Helena D., Shigeyuki C., Andrzej P. (2011), Anxiolytic-like activity of MGS0039, a selective group II mGlu receptor antagonist, is serotonin- and GABA-dependent. Pharmacol Rep, 63(4): 880-887.

17. Johnson P.I., Parente M.A., Stellar J.R. (1996), NMDA-induced lesions of the nucleus accumbens or the ventral pallidum increase the rewarding efficacy of food to deprived rats. *Brain Res*, 722(1-2): p. 109-17.

18. Luddens H., Korpi E.R., Gordon C.C. (1989), Biological function of GABAA/benzodiazepine receptor heterogeneity. *J. psychat*, 29: 77-94.

19. Mahmoodi G., Ahmadi S., Pourmotabbed A., Oryan S., Zarrindast M.R. (2010), Inhibitory avoidance memory deficit induced by scopolamine: Interaction of cholinergic and glutamatergic systems in the ventral tegmental area. *Neurobiol Learn Mem*, 94(1): 83-90.

20. McDonald A.J. (1992), Projection neurons of the *basolateral amygdala*: a correlative Golgi and retrograde tract tracing study. *Brain Res Bull*, 28(2): p. 179-85.

21. Misgeld U., Bijak M., Jarolimek W. (1995), A physiological role for GABAB receptors and the effects of *baclofen* in the

Archive of SID

www.SID.ir

31. Sharma A.C., Kulkarni S.K. (1993), (+/-) Baclofen sensitive *scopolamine*-induced short-term memory deficits in mice. *Indian J Exp Biol*, 31(4): 348-352.

32. Sidel E.S., Tilson H. A., McLamb R.L., Wilson W.A., Swartzwelder H.S. (1988), Potential interactions between GABAb and cholinergic systems: *baclofen* augments *scopolamine*-induced performance deficits in the eight-arm radial maze. *Psychopharmacology*, 96(1): 116-120.

33. Stackman R.W., Walsh T.J. (1994), *Baclofen* produces dose-related working memory impairments after intraseptal injection. *Behav Neural Biol*, 61(2): 181-185.

34. Woodruff A.R., Monyer H., Sah P. (2006), GABAergic excitation in the *basolateral amygdala*. *J Neurosci*, 26(46): 11881-11887.

Archive of SID

www.SID.ir