

مقاله پژوهشی

بررسی نقش گیرنده‌های $GABA_A$ و $GABA_B$ در رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از

لیپوپلی ساکاریدها در آزمون جعبه تاریک و روشن در موش‌های سوری نر

معصومه علیشاهی^{۱*}، مریم بنانج^۱، جلال صولتی^۲، رامین حاجی خانی^۱، مصطفی قادری^۳

۱- گروه زیست‌شناسی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۳- گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

*مسئول مکاتبات: alishahi.1300@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۰

چکیده

سیستم گاباژتیک یک سیستم ضد اضطراب در مغز محسوب می‌شود. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی نقش گیرنده‌های $GABA_A$ و $GABA_B$ در رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از لیپوپلی ساکاریدها در موش‌های سوری نر می‌باشد. در این آزمایش موش‌ها ۲ ساعت بعد از تزریق LPS موسیمول (۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میکروگرم بر موش)، بیکوکولین (۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر موش)، باکلوفن (۱، ۲ و ۴ میکروگرم بر موش)، CGP (۰/۸، ۰/۴، ۰/۲ میکروگرم بر موش) و Celebrex را بصورت درون بطنی دریافت کردند. ۵ دقیقه بعد از تزریق درون بطنی تست LDB انجام گرفت. این مطالعه نشان داد که موسیمول موجب کاهش معنی دار رفتار اضطرابی در آزمون LDB شد ($p < ۰/۰۵$). اما تجویز موسیمول و LPS تغییر معنی داری نداشته است ($P \geq 0.05$). دوزهای مختلف بیکوکولین و LPS موجب افزایش معنی دار رفتار اضطرابی در آزمون LDB شد ($p < ۰/۰۵$). باکلوفن و CGP به تنهایی و همراه با LPS تغییر معنی داری در رفتار اضطرابی حیوان در آزمون LDB نداشته است ($p < ۰/۰۵$). تزریق Celebrex متعاقب LPS موجب رفع رفتار شبه اضطرابی ناشی از تزریق LPS شد. به طور کلی میتوان گفت رفتارهای شبه اضطرابی در حیوانات دریافت‌کننده LPS ممکن است ناشی از مهار گیرنده‌های $GABA_A$ و $GABA_B$ و افزایش سطح فاکتورهای التهابی بافت مغز بوده باشد.

کلمات کلیدی: لیپوپلی ساکارید، رفتار شبه اضطرابی، گابا A، گابا B، جعبه تاریک و روشن.

مقدمه

شوند که شامل عوامل فکری و روانی، عوامل و اتفاقات محیطی می‌باشند. یکی از عوامل ایجاد استرس و اضطراب در جانور آلودگی‌های میکروبی و تنش ایمنولوژیک در جانوران است. مطالعات اخیر نشان داده است که حتی تغییرات در سطح باکتری های فلور طبیعی دستگاه گوارش و یا حضور باکتری-

اضطراب شایع‌ترین اختلال روانی می‌باشد که بخش بزرگی از انسان‌ها در جوامع مختلف آن را تجربه می‌کنند. قسمت‌های مختلف مغز در واسطه‌گری اضطراب نقش دارند که از مهمترین آنها، آمیگدال، هیپوتالاموس، هیپوکامپ و سیتوم را می‌توان نام برد (۳). عوامل متعددی می‌توانند موجب ایجاد اضطراب

شامل گیرنده‌های یونوتروپیک $GABA_A$ و گیرنده‌های متابوتروپیک $GABA_B$ می‌باشند. گیرنده‌های $GABA_A$ کانال‌های کلری وابسته به لیگاند هستند، که فعالیت آنها باعث افزایش ورود کلر به نورون و مهار آن می‌شود (۱۳، ۲۶). در حالی که گیرنده‌های متابوتروپیک $GABA_B$ پاسخ مهاری کند و طولانی مدت ایجاد می‌کنند (۷). مطالعات متعددی شواهدی درباره نقش نورون‌های گابا ارژیک در تعدیل رفتارهای شبه اضطرابی حیوانات ارائه داده‌اند (۴). فعال شدن سیستم گابا به طور کلی منجر به کاهش اضطراب شده (۱۶)، و داروهایی موثر بر سیستم گابا ارژیک اثرات ضد اضطرابی داشته‌اند (۲۸، ۳۰).

با توجه به اینکه نقش سیستم گابا ارژیک در تعدیل رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از LPS به خوبی مشخص نشده است. لذا، هدف از این مطالعه بررسی نقش گیرنده‌های $GABA_A$ و $GABA_B$ در رفتارهای شبه اضطرابی ناشی از لیپوپلی ساکاریدها در آزمون جعبه تاریک و روشن در موش‌های سوری نر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از موش‌های سوری نر با محدوده وزنی ۳۰-۳۵ گرم استفاده شد. موش‌ها به طور تصادفی به گروه‌های ۱۰-۸ تایی (گروه‌های ۸ تایی در جراحی استرئوتاکسی و گروه‌های ۱۰ تایی در گروه‌های تزریقی) تقسیم شدند. رژیم استاندارد آزمایشگاهی (غذای پلت استاندارد) و آب بدون محدودیت در دسترس موش‌ها قرار داده شد. شرایط اتاق نگهداری حیوانات با چرخه ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه و رطوبت نسبی ۲۵ تا ۳۰ درصد بود. جهت رعایت اصول اخلاق پژوهشی، حیوانات در شرایط استاندارد نگهداری و در خصوص آنها دستورات کمیته اخلاقی رعایت شد و تحت

های پاتوژن در دستگاه گوارش و یا دیگر دستگاه‌های بدن مثل دستگاه ادراری و تولیدمثلی ممکن است باعث افزایش اختلالات روانی مثل اضطراب و افسردگی گردد (۸، ۱۴). مولکول‌های لیپوپلی ساکارید (LPS) که همچنین به عنوان لیپوگلیکان شناخته می‌شوند، مولکول‌های بزرگی هستند که شامل یک جزء لیپیدی و یک جزء پلی‌ساکاریدی هستند که توسط یک پیوند کووالانسی به هم متصل شده‌اند. این مولکول‌ها در غشاء خارجی باکتری‌های گرم منفی یافت می‌شوند و به عنوان اندوتوکسین عمل می‌کنند و پاسخ‌های ایمنی شدیدی را در حیوان ایجاد می‌کنند. به خوبی مشخص شده که تجویز LPS طیف وسیعی از پاسخ‌های رفتاری را در مدل‌های حیوانی ایجاد می‌کند که شامل رفتارهای شبه اضطرابی، کاهش فعالیت‌های حرکتی و جستجوگرانه حیوان می‌باشند (۱۷-۳۴). فعال شدن نورون‌های محیطی از طریق ترکیبات میکروبی یا سایتوکاین‌های محیطی موجب فعال شدن نورون‌های آوران به مغز شده و از این طریق پاسخ ایمنی در مغز به سرعت شکل می‌گیرد (۷). LPS با آزاد کردن سیتوکین‌های التهابی باعث تحریک پاسخ‌های ایمنی شده که موجب افزایش رفتارهای شبه افسردگی و شبه اضطرابی در حیوان می‌شود (۲۲، ۳۶). به دنبال التهاب محیطی، رهایش سیتوکین‌ها از سلول‌های ایمنی افزایش یافته که متعاقب آن اختلالات شناختی، رفتارهای شبه افسردگی و شبه اضطرابی در حیوان افزایش پیدا می‌کند (۱۰، ۱۳). همچنین برخی مطالعات بیانگر تداخل مستقیم مولکول‌های LPS با گیرنده‌های نورونی دخیل در التهاب نورونی بوده‌اند (۲۹).

گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) یکی از نوروترانسمیترهای مهم مهاری در سیستم عصبی مرکزی (CNS) است (۲۴). مهار نورونی GABA توسط دو نوع از گیرنده‌های سلولی انجام می‌شود که

بیهوشی کامل جراحی شده و پس از پایان دوره تیمار قربانی شدند.

در این پژوهش به منظور تزریق درون بطنی، کانول ساخته شده از سرسوزن شماره ۲۱ در بطن جانبی مغز موش، با استفاده از روش جراحی استرئوتاکسی تعبیه شد. بدین منظور موش‌ها پس از بیهوشی به وسیله مخلوط کتامین با دوز ۱۰۰ میگروگرم بر کیلوگرم و زایلازین با دوز ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم به صورت تزریق داخل صفاقی، تحت عمل جراحی قرار گرفتند. به کمک دستگاه استرئوتاکسی (USA, Stoelting) و اطللس واتسون-پاکینسون مختصات مغز موش برای بطن سوم (AP: 0.9; ML: -1.4; DV: 2) پیدا شده و کانول از سطح جمجمه در داخل بطن سوم جایگذاری شد. جهت بهبودی کامل به مدت یک هفته به حیوان استراحت داده شد و در طی این مدت حیوان روزانه با دست مقید شده تا آثار و عوارض استرس ناشی از مقید کردن در هنگام تزریقات اصلی به حداقل رسید.

در این مطالعه، جهت ارزیابی رفتارهای شبه اضطرابی حیوانات از آزمون جعبه تاریک و روشن (LDB) استفاده شد. آزمون جعبه روشن و تاریک مبتنی بر خصوصیت ذاتی جوندگان در گریز از مناطق روشن و همچنین جستجوگری ذاتی آنان می باشد. جعبه تاریک و روشن شامل دو محفظه از جنس پلکسی گلاس می باشد که توسط تونل کوچکی به هم وصل شده اند. یکی از محفظه‌ها به رنگ سیاه و کاملاً تاریک و دیگری به رنگ سفید و روشن می باشد. موش در محفظه تاریک قرار داده می شود و از آنجا می تواند وارد محفظه روشن شده و آن را بازدید کند. میزان تاخیر در اولین ورود به محفظه روشن، زمان کلی که حیوان در محفظه روشن می گذراند و تعداد ورودش به محفظه روشن، در طی مشاهده به مدت ۵ دقیقه ثبت شد. موش‌های سالم با حس کنجکاوی ذاتی تمایل بالایی به

تجربه مکان‌های جدید دارند، لذا با تأخیر اندکی وارد محفظه روشن می‌شوند، اما موش‌های مضطرب تمایل کمی به کاوش در مکان‌های ناآشنا دارند و ترجیح می دهند در محفظه تاریک بمانند. گروه‌های آزمایشی به شرح زیر بودند؛

مرحله اول: بررسی اثرات اضطراب زایی LPS

۱. گروه کنترل: این گروه فقط آب مقطر استریلیزه (حلال LPS) را به مقدار ۰/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم بصورت درون صفاقی دریافت کردند و ۲ ساعت بعد از تزریق، تست جعبه تاریک و روشن انجام گرفت.
۲. گروه تیماری LPS: این گروه LPS را با دوز $\mu\text{g}/\text{kg}$ ۲۰ بصورت درون صفاقی دریافت کردند و ۲ ساعت بعد از تزریق LPS، تست جعبه تاریک و روشن انجام گرفت.

مرحله دوم: بررسی نقش سیستم گاباآرژیک در واسطه گری اثرات اضطراب زایی LPS

۳. گروه کنترل ۲: این گروه ابتدا LPS را با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم بصورت درون صفاقی دریافت کرده و سپس ۲ ساعت بعد از تزریق LPS، سالین (حلال داروها) را به مقدار ۵ میکرولیتر بصورت درون بطنی دریافت کرده و ۵ دقیقه بعد از تزریق درون بطنی تست جعبه تاریک و روشن انجام گرفت.

۴. گروه‌های تیماری آگونیست GABA_A : این گروه‌ها ابتدا LPS را با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم بصورت درون صفاقی دریافت و ۲ ساعت بعد از دریافت LPS، موسیمول را در سه دوز ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میکروگرم بر موش بصورت درون بطنی دریافت کردند. ۵ دقیقه بعد از تزریق درون بطنی تست جعبه تاریک و روشن انجام گرفت.

۵. گروه‌های تیماری آنتاگونیست GABA_A : این گروه‌ها ابتدا LPS را با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم بصورت درون صفاقی دریافت و ۲ ساعت بعد از دریافت LPS، بیکوکولین را در سه دوز ۰/۲۵، ۰/۵ و

پشتیبان Tukey جهت بررسی اختلاف بین گروه‌های مختلف استفاده شد.

نتایج

نتایج حاصل از شکل ۱ نشان می‌دهد که درصد زمان سپری شده در جعبه روشن (۱A) در حیوانات دریافت کننده دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میکروگرم بر موش موسیمول (آگونیست گیرنده‌های $GABA_A$) نسبت به گروه دریافت کننده سالین (کنترل) افزایش معنی‌داری داشته است (به ترتیب $p < 0/05$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/001$). اما، درصد زمان سپری شده در جعبه روشن (۱ B) در حیواناتی که به صورت همزمان دوزهای ۰/۰۵، ۰/۱ و ۰/۲ میکروگرم بر موش موسیمول و LPS (دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) را دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است ($p \geq 0/05$).

نتایج حاصل از نمودار ۲ نشان می‌دهد که درصد زمان سپری شده در جعبه روشن (۲ A) در حیوانات دریافت کننده دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر موش بیکوکولین (آنتاگونیست گیرنده‌های $GABA_A$) نسبت به گروه دریافت کننده سالین (کنترل) کاهش معنی‌داری داشته است (به ترتیب $p < 0/001$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/05$). همچنین، درصد زمان سپری شده در جعبه روشن (۲ B) در حیواناتی که LPS (دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و دوزهای ۰/۲۵ و ۰/۵ و ۱ میکروگرم بر موش بیکوکولین دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری داشته است (به ترتیب $p < 0/001$ ، $p < 0/01$ و $p < 0/05$).

با توجه به نتایج نمودار ۳ می‌توان گفت که درصد زمان سپری شده در جعبه روشن (۳A) در حیوانات دریافت کننده دوزهای ۴ و ۲ و ۱ میکروگرم بر موش باکلوفن (آگونیست گیرنده‌های $GABA_B$) نسبت به گروه دریافت‌کننده سالین (کنترل) تغییر معنی‌داری

۱ میکروگرم بر موش بصورت درون بطنی دریافت کردند. ۵ دقیقه بعد از تزریق درون بطنی تست جعبه تاریک و روشن انجام گرفت.

۶. گروه‌های تیماری آگونیست $GABA_B$: این گروه‌ها ابتدا LPS را با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم بصورت درون صفاقی دریافت و ۲ ساعت بعد از دریافت LPS، باکلوفن را در سه دوز ۱، ۲ و ۴ میکروگرم بر موش بصورت درون بطنی دریافت کردند. ۵ دقیقه بعد از تزریق درون بطنی تست جعبه تاریک و روشن انجام گرفت.

۷. گروه‌های تیماری آنتاگونیست $GABA_B$: این گروه‌ها ابتدا LPS را با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم بصورت درون صفاقی دریافت و ۲ ساعت بعد از دریافت LPS، CGP را در سه دوز ۰/۸، ۰/۴ و ۰/۲ میکروگرم بر موش بصورت درون بطنی دریافت کردند. ۵ دقیقه بعد از تزریق درون بطنی تست جعبه تاریک و روشن انجام گرفت.

۸. گروه‌های تیماری Celebrex: این گروه‌ها ابتدا LPS را با دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم بصورت درون صفاقی دریافت و ۲ ساعت بعد از دریافت LPS، Celebrex را بصورت درون بطنی دریافت کردند. ۵ دقیقه بعد از تزریق درون بطنی تست جعبه تاریک و روشن انجام گرفت.

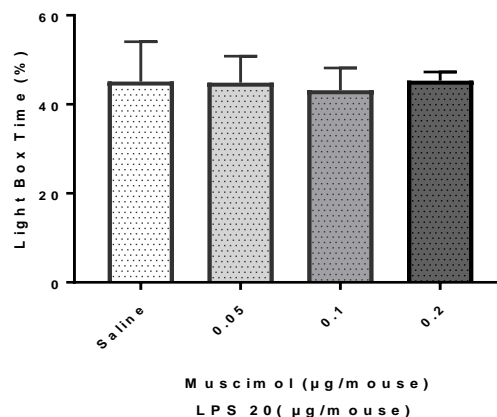
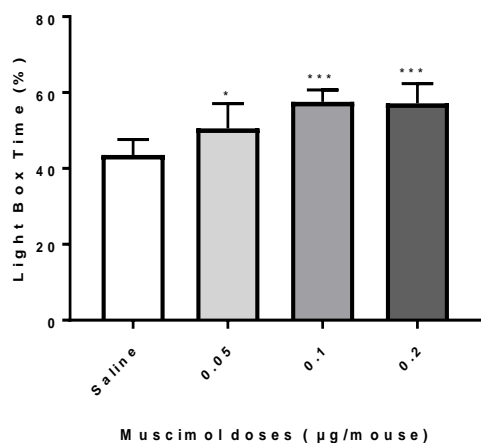
جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف توزیع نتایج مورد بررسی قرار گرفت و چون توزیع در کلیه نمونه‌ها طبیعی بود، لذا از آزمون‌های پارامتریک استفاده شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm خطای معیار از میانگین ($Mean \pm SEM$) بیان شدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۱۹ آزمون‌های مختلف تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی نتایج در گروه‌های مختلف از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (one way ANOVA) و تست

LPS (دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و دوزهای ۴ و ۲ و ۱ میکروگرم بر موش CGP دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است ($p > 0.05$).

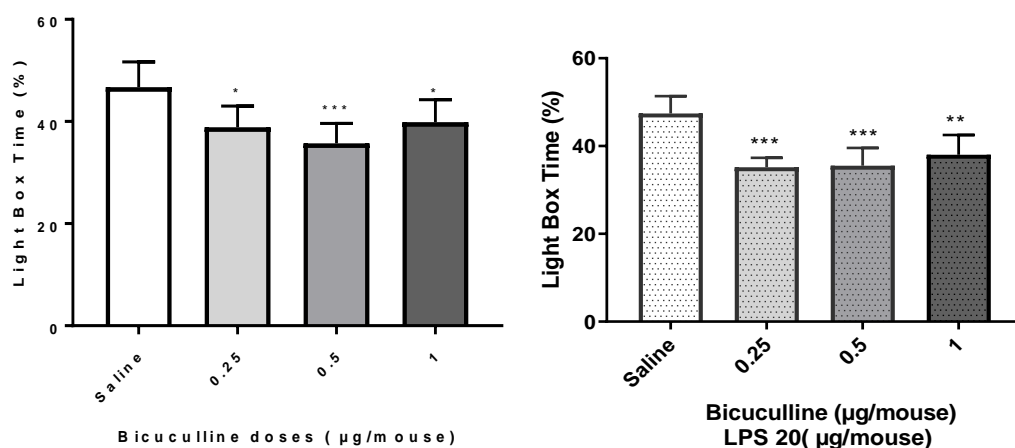
نتایج حاصل از نمودار ۵ نشان می‌دهد که درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در حیوانات دریافت کننده LPS (دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه دریافت کننده سالین (کنترل) کاهش معنی‌داری داشته است ($p < 0.05$). در حالی که گروه celebrix + LPS تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل و گروه LPS نداشته است ($p > 0.05$).

نداشته است. همچنین، درصد زمان سپری شده در جعبه روشن (۳B) در حیواناتی که LPS (دوز ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و دوزهای ۱، ۲ و ۴ میکروگرم بر موش باکلوفن دریافت کرده بودند نسبت به گروه کنترل تغییر معنی‌داری نداشته است ($p > 0.05$).

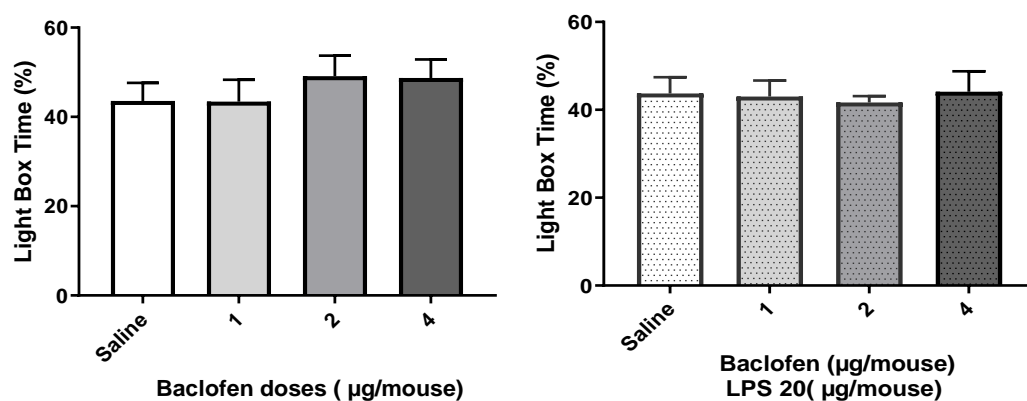
با توجه به نتایج نمودار ۴ می‌توان گفت که درصد زمان سپری شده در جعبه روشن (A) در حیوانات دریافت کننده دوزهای ۰/۸، ۰/۴ و ۰/۲ میکروگرم بر موش CG (آنتاگونیست گیرنده‌های GABA_B) نسبت به گروه دریافت کننده سالین (کنترل) تغییر معنی‌داری نداشته است ($p > 0.05$). همچنین، درصد زمان سپری شده در جعبه روشن (B) در حیواناتی که



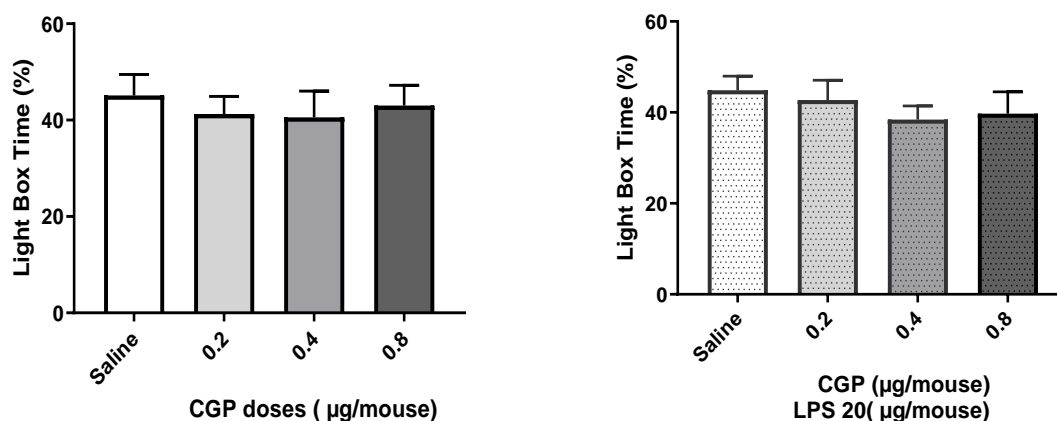
نمودار ۱- بررسی رفتار شبه اضطرابی حیوان در آزمون جعبه تاریک و روشن. (A) درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه دریافت کننده دوزهای مختلف موسیمول (آگونیست گیرنده‌های GABA_A), (B) درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه‌های دریافت کننده LPS (۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و موسیمول (mean ± S.E.M, N= ۸). $p < 0.001$, $p < 0.05$. *** مقایسه نسبت به گروه کنترل.



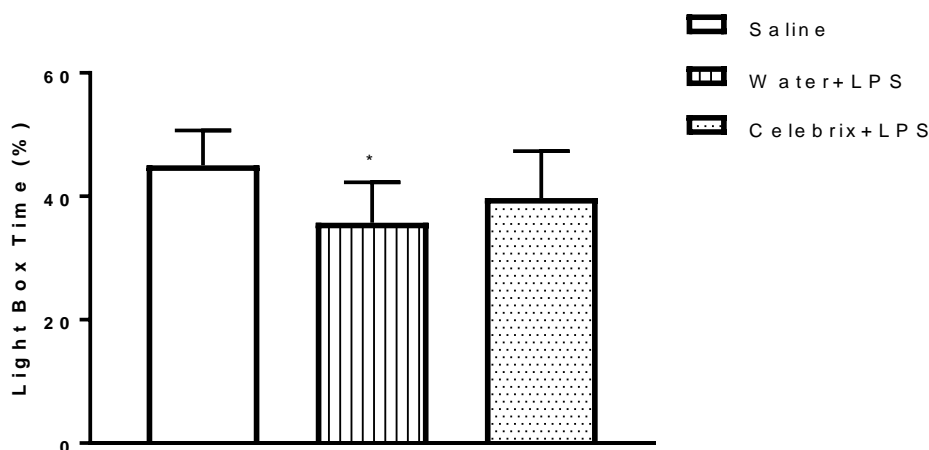
نمودار ۲- بررسی رفتار شبه اضطرابی حیوان در آزمون جعبه تاریک و روشن. (A) درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه دریافت کننده دوزهای مختلف بیکوکولین (آنتاگونیست گیرنده‌های $GABA_A$)، (B) درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه‌های دریافت کننده LPS (۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و بیکوکولین (mean \pm S.E.M, N= ۸).
 $p < 0/01$ ، $p < 0/001$ *** مقایسه نسبت به گروه کنترل.



نمودار ۳- بررسی رفتار شبه اضطرابی حیوان در آزمون جعبه تاریک و روشن. (A) درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه دریافت کننده دوزهای مختلف باکلوفن (آگونیست گیرنده‌های $GABA_B$)، (B) درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه‌های دریافت کننده LPS (۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و باکلوفن.



نمودار ۴- بررسی رفتار شبه اضطرابی حیوان در آزمون جعبه تاریک و روشن. (A) درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه دریافت کننده دوزهای مختلف CGP (آنتاگونیست گیرنده‌های $GABA_B$)، (B) درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه‌های دریافت کننده LPS (۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و CGP.



نمودار ۵- بررسی رفتار شبه اضطرابی حیوان بر اساس درصد زمان سپری شده در جعبه روشن در گروه‌های دریافت کننده LPS (۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم) و Celebrix در آزمون جعبه تاریک و روشن. (mean \pm S.E.M, N=8). *P<0.05، مقایسه نسبت به گروه کنترل.

بحث

در کنترل اضطراب می‌باشد. آلودگی‌های میکروبی و فعال شدن سیستم ایمنی (خصوصاً در مغز) باعث فعال شدن سیستم گاباژژیک و افزایش ترشح گابا می‌شود که این امر باعث تغییر فعالیت سلول‌های دفاعی بدن و افزایش ترشح سیتوکاین‌ها می‌شود (۳). گابا نوروترانسمیتر مهاری اصلی است که در تعدیل اضطراب و حافظه و فعالیت‌های حرکتی نقش

امروزه مشخص شده است که عوامل متعددی در ایجاد اضطراب نقش دارند و یکی از این موارد آلودگی‌های میکروبی و تنش ایمنولوژیک می‌باشند و حضور باکتری‌های پاتوژن در بدن با به هم ریختن فلور باکتریایی بدن باعث افزایش اختلالات روانی مثل اضطراب و افسردگی می‌گردند (۸، ۱۴). سیستم گاباژژیک یکی از مهمترین سیستم‌های عصبی درگیر

و TNF و افزایش شدت استرس اکسیداتیو در حیوان بوده است (۳۵). مطالعه Li و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داده که با تجویز LPS میزان شاخص‌های التهابی در مغز افزایش یافته و رفتار افسردگی حیوان در آزمون FST در حیوان می‌شود (۱۵). تجویز موسیمول همراه با LPS موجب حذف اثرات ضد اضطرابی این دارو شده و حتی رفتارهای شبه اضطرابی حیوان را افزایش داده است که ممکن است ناشی از اینترکشن LPS با گیرنده‌های GABA_A بوده باشد.

داروی بیکوکولین (آنتاگونیست گیرنده‌های GABA_A) بعنوان یک داروی اضطراب‌زا (anxiogenic) شناخته می‌شود که موجب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی در حیوان می‌شود (۳۲). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، رفتارهای شبه اضطرابی در حیوانات دریافت‌کننده بیکوکولین در آزمون LDB افزایش معنی‌داری داشته است. مطالعات گذشته نیز نشان داده اند که تزریق بیکوکولین درون مغز موجب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی حیوان در EPM می‌شود (۳۸, ۳۲). با توجه به نتایج مطالعه ما، تجویز LPS و بیکوکولین موجب افزایش معنی‌دار رفتارهای شبه اضطرابی در آزمون LDB شد. با توجه به اینکه تجویز LPS رفتارهای شبه اضطرابی را در حیوان افزایش می‌دهد (۳۵). بنابراین، افزایش معنی‌دار رفتارهای شبه اضطرابی حیوان در تست LDB ممکن است ناشی از اثرات سینرژیک بیکوکولین با LPS بوده باشد که موجب مهار گیرنده GABA_A شده باشد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر، رفتارهای شبه اضطرابی در حیوانات دریافت‌کننده LPS و باکلوفن (آگونیست گیرنده‌های GABA_B) در آزمون LDB تغییر معنی‌داری نداشته است. برخلاف نتایج ما، مطالعه Darin و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان‌کننده اثرات ضد اضطرابی باکلوفن در مدل حیوانی بوده است (۳۳). تجویز LPS موجب افزایش سطح

دارد (۳). گیرنده‌های GABA_A و GABA_B هر دو در کنترل اضطراب درگیر هستند (۲۲، ۲۵). مطالعات نشان می‌دهند که در موش‌های با نقص در عملکرد در گیرنده‌های GABA_A و GABA_B، رفتارهای شبه اضطرابی بیشتری مشاهده می‌شود (۲۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تجویز دوزهای مختلف موسیمول بعنوان آگونیست گیرنده‌های GABA_A موجب کاهش رفتارهای شبه اضطرابی حیوان (افزایش زمان ماندن حیوان در جعبه روشن) در آزمون آزمون جعبه تاریک و روشن (LDB) می‌شود. در این آزمون موش‌های سالم با حس کنجکاوی ذاتی تمایل بالایی به تجربه مکان‌های جدید دارند، لذا با تاخیر اندکی وارد محفظه روشن می‌شوند، اما موش‌های مضطرب تمایل کمی به کاوش در مکان‌های ناآشنا دارند و ترجیح می‌دهند در محفظه تاریک بمانند (۵). نتایج ما با مطالعه Dalvi و همکاران در سال ۱۹۹۶ مطابقت دارد که نشان دادند با تجویز موسیمول رفتار اضطرابی حیوان بصورت معنی‌داری کاهش پیدا میکند (۹). بنا بر مطالعه Noronha و همکاران در سال ۲۰۱۷، تزریق درون هیپوتالاموسی موسیمول موجب افزایش رفتارهای اضطرابی در حیوان می‌شود (۱۲)، که با نتایج مطالعه ما و سایر محققین همخوانی ندارد. موسیمول بعنوان یک دارویی با اثرات ضد ترس و اضطراب شناخته می‌شود (۲۷). نتایج مطالعه ما بیان‌کننده اثرات ضد اضطرابی موسیمول بوده است. بخش دیگری از نتایج مطالعه ما نشان داد که رفتار شبه اضطرابی در حیوانات دریافت‌کننده LPS و موسیمول تغییر معنی‌داری نداشت. برخلاف نتایج ما، مطالعه Sulakhiya و همکاران در سال ۲۰۱۶ بیانگر افزایش رفتارهای شبه اضطرابی در آزمون ماز بعلاوه مرتفع (EPM) و افزایش افسردگی در آزمون شنای اجباری (FST) در حیوانات دریافت‌کننده LPS بودند که ناشی از افزایش اینترلوکین‌های التهابی IL-1، IL-6

شبه اضطرابی و میزان سیتوکاین‌های بافت مغز در موش‌های مسموم شده با سویه Plasmodium berghei مشاهده کردند که سطوح سیتوکاین‌های التهابی IL-1 β و TNF- α در مغز افزایش یافته و موجب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی در حیوان شده است که بیانگر نقش این سیتوکاین‌ها در رفتارهای اضطرابی حیوان بوده است (۱۱). همچنین، مطالعه Wang و همکاران در سال ۲۰۱۴ بیان کننده اثرات ضد اضطرابی کورکومین در حیوانات دریافت کننده LPS بودند که ناشی از اثرات ضدالتهابی کورکومین بوده است (۳۷).

بنابراین بر اساس مطالعه حاضر و سایر مطالعات، استفاده از داروهای ضدالتهابی مانند Celebrex موجب کاهش سیتوکاین‌های التهابی القا شده با LPS شده و از این طریق رفتارهای شبه اضطرابی در حیوان را کاهش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که رفتارهای شبه اضطرابی در حیوانات دریافت کننده LPS افزایش پیدا می‌کند. بر اساس نتایج این مطالعه و استفاده از داروهای آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های GABA_A، GABA_B و همچنین داروی Celebrex میتوان گفت ممکن است LPS به صورت سینرژیست با بیکوکولین موجب مهار گیرنده‌های GABA_A و GABA_B شده و از این طریق موجب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی حیوان در آزمون LDB شده باشد. همچنین اثرات مهاری تجویز Celebrex بر رفتارهای شبه اضطرابی حیوان در آزمون LDB نشان داد که ممکن است LPS از طریق افزایش فاکتورهای التهابی موجب بروز رفتارهای اضطرابی شده باشد. بنابراین جهت مشخص شدن مکانیسم دقیق اثرات اضطرابی LPS، بررسی اثرات تزریق LPS

فاکتورهای التهابی در بافت مغز حیوان شده و رفتارهای شبه اضطرابی را در حیوان افزایش می‌دهد (۳۵، ۱۵). عدم تغییر معنی‌دار تزریق همزمان LPS و باکلوفن بر رفتارهای شبه اضطرابی حیوان ممکن است ناشی از عدم تاثیر LPS بر گیرنده‌های GABA_B بوده باشد.

همچنین نتایج ما نشان داد که رفتارهای شبه اضطرابی در حیوانات دریافت کننده CGP (آنتاگونیست گیرنده‌های GABA_B) در آزمون LDB تغییر معنی‌داری نداشته است. بر خلاف یافته‌های ما، Mombereau و همکاران نشان دادند که در موش‌های با نقص در عملکرد دو گیرنده گیرنده‌های GABA_A و GABA_B، رفتارهای شبه اضطرابی بیشتری مشاهده می‌شود که بیانگر نقش این دو گیرنده گابا در رفتارهای اضطرابی و افسردگی موش می‌باشند (۲۵).

تعداد زیادی از مطالعات بیانگر ارتباط مستقیم التهاب و افزایش سطح سیتوکاین‌های التهابی بدن با رفتارهای اضطرابی در انسان‌ها می‌باشند (۲۱).

در مدل‌های حیوانی نیز نشان داده شده که سیتوکاین‌های التهابی یا محرک‌های سیتوکاین‌ها (مانند LPS) موجب افزایش رفتارهای شبه اضطرابی می‌شوند (۱۸، ۲۳).

استفاده از ضد اضطراب‌ها در انسان و حیوان موجب کاهش سطح سیتوکاین‌های التهابی می‌شوند (۲، ۶).

نتایج مطالعه ما نشان داد که رفتارهای شبه اضطرابی حیوانات در آزمون LDB در حیوانات دریافت کننده LPS افزایش داشته است. اما رفتارهای شبه اضطرابی در حیوانات دریافت کننده Celebrex (داروی کاهنده سیتوکاین‌ها) و LPS تغییر معنی‌دار نداشته است. که بیانگر ضدیت Celebrex با افزایش التهاب ناشی از LPS بوده و از این طریق موجب تقلیل رفتارهای شبه اضطرابی در حیوانات دریافت کننده LPS و Celebrex شده است. Miranda و همکاران با بررسی رفتارهای

bupropion lowers production of tumor necrosis factor-alpha and interferon gamma in mice. *International immunopharmacology. International Journal of Immunopharmacology*, 6(6): 903-907.

7. Bowery N., 2010. Historical perspective and emergence of the GABAB receptor. *Advances in Pharmacology*, 58: 1-18.

8. Cromer BA, Morton CJ, Parker , MW., 2002. Anxiety over GABAA receptor structure relieved by AChBP. *Trends Biochem Sci.* 27(6): 280-287.

9. Dalvi A., Rodgers RJ., 1996. GABAergic influences on plus-maze behaviour in mice. *Psychopharmacology*, 128(4): 380-397.

10. Dantzer R., O'Connor J.C., Freund G.G., Johnson R.W., Kelley K.W., 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nature Reviews and Neuroscience*, 9(1):46

11. De Miranda A.S., Lacerda-Queiroz N., de Carvalho Vilela M., Rodrigues D.H, Rachid M.A., Quevedo J., et al., 2011. Anxiety-like behavior and proinflammatory cytokine levels in the brain of C57BL/6 mice infected with Plasmodium berghei (strain ANKA). *Neuroscience Letters*, 491(3): 202-6.

12. De Noronha S.R., Campos G.V., Abreu A.R., de Souza A.A., Chianca Jr D.A., de Menezes R.C., 2017. High fat diet induced-obesity facilitates anxiety-like behaviors due to GABAergic impairment within the dorsomedial hypothalamus in rats. *Behavioral Brain Research*, 316: 38-46.

13. D'Mello C., Swain M.G., 2011. Liver-brain inflammation axis. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 301(5): G749-G61.

14. Foster J.A., Neufeld K-A.M., 2013. Gut-brain axis., how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in Neuroscience*, 36(5): 305-312

بر بیان سینتوکاین‌های التهابی و آنزیم‌های دخیل در سنتز نوروترانسمیتر GABA توصیه میشود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه آزاد جمهوری اسلامی ایران واحد شمال تهران نهایت تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

1- Adriani W., Laviola G., 2000. A unique hormonal and behavioral hyporesponsivity to both forced novelty and d-amphetamine in periadolescent mice. *Neuropharmacology*, 39(2): 334-346.

2- Akhondzade S., Jafari S., Raisi F., Nasehi A.A., Ghoreishi A., Salehi B., et al., 2009. Clinical trial of adjunctive celecoxib treatment in patients with major depression: a double blind and placebo controlled trial. *Depression and Anxiety*, 26(7): 607-611.

3- Barragan A., Weidner JM., Jin Z., Korpi E.R., Birnir B., 2015. GABAergic signalling in the immune system. *Acta physiologica. Acta Physiol (Oxf)*, 213(4): 819-827.

4- Barbalho C.A., Nunes-de-Souza R.L., Canto-de-Souza A., 2009. Similar anxiolytic-like effects following intra-amygdala infusions of benzodiazepine receptor agonist and antagonist: evidence for the release of an endogenous benzodiazepine inverse agonist in mice exposed to elevated plus-maze test. *Brain research*, 1267: 65-76.

5. Bilkei-Gorzo A., Gyertyan I., Levay G., 1998. mCPP-induced anxiety in the light-dark box in rats—a new method for screening anxiolytic activity. *Psychopharmacology*, 136(3): 291-298.

6. Brustolim D., Ribeiro-dos-Santos R., Kast R., Altschuler E., Soares M.B.P., 2006. A new chapter opens in anti-inflammatory treatments: the antidepressant

23. Mello B.S.F., Monte A.S., McIntyre R.S., Soczynska J.K., Custódio C.S., Cordeiro R.C., 2013. Effects of doxycycline on depressive-like behavior in mice after lipopolysaccharide (LPS) administration. *Psychiatric Research*, 47(10): 1521-1529.
24. Mihic S., Sanna E., Whiting P., Harris R., 1995. Pharmacology of recombinant GABAA receptors. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 48:17
25. Mombereau C., Kaupmann K., Gassmann M., Bettler B, van der Putten H., Cryan J.F., 2005. Altered anxiety and depression-related behaviour in mice lacking GABAB (2) receptor subunits. *Neuroreport*, 28;16(3): 307-310.
26. Mody I., Pearce R.A., 2004. Diversity of inhibitory neurotransmission through GABAA receptors. *Trends in Neurosciences*, 27(9): 569-575.
27. Nascimento , J.O.G., Zangrossi Jr. .H., Viana , M.d.B., 2010. Effects of reversible inactivation of the dorsomedial hypothalamus on panic-and anxiety-related responses in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(9): 869-873
28. Nunes-de-Souza R., Canto-de-Souza A., Da-Costa M., Fornari R., Graeff F., Pela I., 2000. Anxiety-induced antinociception in mice: effects of systemic and intra-amygdala administration of 8-OH-DPAT and Midazolam. *Psychopharmacology*, 150(3): 300-310.
29. Park B.S., Lee J.O., 2013. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(12): e66.
30. Pesold C., Treit D., 1995. The central and basolateral amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Research*, 13;671(2): 213-221.
31. Salazar A., Gonzalez-Rivera B.L., Redus L., Parrott J.M., O'connor J.C. 2012.
15. Ge Li., Liu L., Liu H., Liu S., Xue H., Wang X., 2015. Resveratrol abrogates lipopoly saccharide-induced depressive-like behavior, neuroinflammatory response, and CREB/BDNF signaling in mice. *European Journal of Pharmacology*, 5(768): 49-57.
16. Heldt S., Mou L., Ressler K., 2012. In vivo knockdown of GAD67 in the amygdala disrupts fear extinction and the anxiolytic-like effect of diazepam in mice. *Translational Psychiatry*, 2(11): e181.
17. Jangra A., Lukhi M.M., Sulakhiya K, Baruah C.C., Lahkar M. 2014. Protective effect of mangiferin against lipopolysaccharide-induced depressive and anxiety-like behaviour in mice. *European Journal of Pharmacology*, 740: 337-345.
18. Jiang H., Wang Z., Wang Y., Xie K., Zhang Q., Luan Q., et al., 2013. Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: involvement of its anti-inflammatory action. *Progress Neuro Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 47:33-39.
19. Jin Z., Mendu S.K., Birnir B., 2013. GABA is an effective immunomodulatory molecule. *Amino acids*, 45(1): 87-94.
20. Knapp D.J., Overstreet D.H., Breese GR., 2007. Baclofen blocks expression and sensitization of anxiety-like behavior in an animal model of repeated stress and ethanol withdrawal. *Alcoholism Clinical and Experimental Research*, 31(4):582-595
21. Krogh J., Benros ME., Jørgensen MB., Vesterager L., Elfving B., 2014. Nordentoft M. The association between depressive symptoms, cognitive function, and inflammation in major depression. *Brain Behavior Immunology*, 35: 70-76
22. Lacosta S., Merali Z., Anisman H. , 1999. Behavioral and neurochemical consequences of lipopolysaccharide in mice: anxiogenic-like effects. *Brain Research*, 818(2): 291-303

- Munde N., et al., 2016. Lipopolysaccharide induced anxiety-and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin. *Neuroscience Letters*, 611: 106-111.
36. Sulakhiya K., Kumar P., Jangra A., Dwivedi S., Hazarika N.K., Baruah C.C., et al., 2014. Honokiol abrogate lipopolysaccharide-induced depressive like behavior by impeding neuro inflammation and oxido-nitrosative stress in mice. *European Journal of Pharmacology*, 744: 124-131.
38. Zaretskaia M.V., Zaretsky D.V., Sarkar S., Shekhar A., DiMicco J.A., 2008. Induction of Fos-immunoreactivity in the rat brain following disinhibition of the dorsomedial hypothalamus. *Brain Research*, 200: 39-50.
- Indoleamine 2, 3-dioxygenase mediates anhedonia and anxiety-like behaviors caused by peripheral lipopolysaccharide immune challenge. *Hormones and Behavior*, 62(3): 202-209.
32. Shekhar A., Hingtgen J., DiMicco J. , 1990. GABA receptors in the posterior hypothalamus regulate experimental anxiety in rats. *Brain Research*, 512(1): 81-88.
33. Sieghart W., 2006. Structure, pharmacology, and function of GABAA receptor subtypes. *Advances in Pharmacology*, 54: 231-263.
34. Soncini R., de Souza D.F., 2012. Neves A.P., Braga D.S., Andrade C.A., Giusti-Paiva A. Dipyrrone attenuates acute sickness response to lipopolysaccharide in mice. *Neuroscience Letters*, 516(1): 114-118.
35. Sulakhiya K., Keshavlal G.P., Bezbaruah B.B., Dwivedi S., Gurjar S.S.,