

## مقاله پژوهشی

## تغییر بیان ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در اضطراب ذاتی در قشر پرفرونتال موش‌های نابالغ، بالغ و پیر

محمد جواد اسپرهم، ساحل متقی\*، محیا مرادی سیرچی

گروه علوم پایه دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران

پذیرش: ۱۱ تیر ۱۴۰۳

دریافت: ۹ خرداد ۱۴۰۳

## چکیده

**زمینه و هدف:** سن حیوانات آزمایشگاهی یک متغیر مهم در زمان آزمایش است. گابا میانجی عصبی است که از اسیدآمینو گلوتامات توسط آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز سنتز می‌شود. ایزوفرم ۶۷ آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز مسئول اصلی تولید گابا است و کاهش آن باعث کاهش سطح گابا می‌شود. از آنجایی که قشر پرفرونتال یکی از ساختارهای مغزی مهم در مدارهای نرونی اضطراب است و مطالعه جامعی در رابطه با اضطراب و تغییر بیان ژن این آنزیم در قشر پرفرونتال در سنین مختلف نداریم، در این مطالعه به کمک دستگاه ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع این مهم مورد بررسی قرار گرفت.

**روش‌ها** در این مطالعه از موش‌های صحرایی با سه گروه سنی ۲۱، ۴۲ و ۳۶۰ روزه استفاده شد. در هر سن گروه‌بندی حیوانات به این صورت بود: (۱) گروه کنترل، (۲) گروهی که به منظور ارزیابی اضطراب ذاتی در دستگاه ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع قرار گرفت، (۳) گروه تجویز دیازپام + اضطراب ذاتی. بلافاصله بعد از اتمام تست برای بررسی بیان ژن، پرفرونتال میانی مغز حیوانات جدا و بیان ژن به کمک تکنیک واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

**یافته‌ها:** نتایج ما نشان داد که اضطراب ذاتی در موش‌های ۲۱ روزه بالاتر از سایر سنین بود. بیان گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفرونتال در اضطراب ذاتی تغییری پیدا نکرد و سن اثری بر این پارامتر نداشت ( $p > 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** به نظر می‌رسد که در اضطراب ذاتی سایر اجزای سیستم گاباژیک در قشر پرفرونتال درگیر باشند و یا نقص در سایر میانجی‌های عصبی و مکانیسم‌های مربوط به آنها مانند سروتونین، نوراپی‌نفرین و غیره مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: اضطراب، قشر پرفرونتال، گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷

## مقدمه

اضطرابی می‌شود سیستم گاباژیک<sup>۳</sup> است. به طوری که تداخلات فارماکولوژیک که سبب افزایش این نوروترنسمیتر<sup>۴</sup> در مغز می‌شود، سبب کاهش اضطراب می‌گردند. از درمان‌های دارویی مهم در درمان اضطراب استفاده از بنزودیازپین‌ها است که جایگاه گیرنده آن‌ها رسپتورهای گابا است. گابا یا همان گاما آمینو بوتیریک اسید، نوروترنسمیتری است که از اسیدآمینو اسید گلوتامیک<sup>۵</sup> و بوسیله آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز<sup>۶</sup> سنتز

سن حیوانات آزمایشگاهی یک متغیر بسیار مهم در زمان آزمایش محسوب می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که اضطراب<sup>۱</sup> و پاسخ به داروهای بنزودیازپینی<sup>۲</sup> که از درمان‌های دارویی مهم در درمان اضطراب هستند در سنین مختلف متفاوت است [۱]، بنابراین شناخت عوامل موثر و مکانیسم‌های درگیر در اضطراب در سنین متفاوت می‌تواند در طراحی داروهای جدید راهگشا باشد.

از سیستم‌هایی که نقص در آن سبب ایجاد اختلالات

<sup>3</sup> Gabaergic system<sup>4</sup> Neurotransmitter<sup>5</sup> Glutamic acid<sup>6</sup> Glutamate decarboxylase<sup>1</sup> Anxiety<sup>2</sup> Benzodiazepine

## مواد و روش‌ها

### حیوانات و شرایط آزمایشگاهی

در این مطالعه، از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار نابالغ ۲۱ روزه، بالغ ۴۲ روزه و موش‌های ۳۶۰ روزه استفاده شد. موش‌های ۲۱ و ۴۲ روزه از دانشگاه علوم پزشکی کرمان و موش‌های ۳۶۰ روزه از انستیتو پاستور تهران تهیه شدند. موش‌ها به مدت یک هفته در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی، در دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۵-۴۵ درصد نگهداری شدند. در طول مدت دوره تحقیق، حیوانات به صورت نامحدود دسترسی به آب و غذا داشتند. روش کار این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی حیوانات آزمایشگاهی، و با کد ۸۷۶/س۹۹ به تصویب کمیته اخلاق دانشگاه شهید باهنر کرمان رسید. قبل از شروع آزمایش، حیوانات به منظور سازش با محیط جدید ۲۴ ساعت قبل به محل آزمایش منتقل می شدند.

### طراحی آزمایش

گروه‌بندی حیوانات در هر سن به صورت زیر و هر گروه شامل هشت حیوان بود:

- ۱- گروه کنترل که هیچ آزمایشی روی آن‌ها صورت نمی‌گیرد و قشر پرفرونتال میانی جدا و در ازت ۷۰- قرار داده شد.
- ۲- گروهی که بلافاصله بعد از تست ماز مغز آن‌ها جدا و قشر پرفرونتال میانی آن‌ها در ازت ۷۰- قرار داده شد (اضطراب ذاتی).
- ۳- گروهی که نیم ساعت قبل از تست ماز به آن‌ها دیاپیام با دوز سه میلی‌گرم به ازای کیلوگرم تزریق شد و قشر پرفرونتال میانی آن‌ها جدا و در ازت ۷۰- قرار داده شد.

### تست رفتاری: ماز بعلاوه ای شکل مرتفع

دستگاه ماز بعلاوه مرتفع به‌عنوان یک مدل غیرشرطی جهت تولید و سنجش اضطراب در جوندگان محسوب می‌گردد. اجزای تشکیل‌دهنده این دستگاه شامل دو بازوی باز و دو بازوی بسته مقابل هم است. هر چهار بازو دارای سقف باز هستند. طول هر بازو ۵۰ سانتی‌متر و پهنای آن ۱۰ سانتی‌متر می‌باشد. بازوهای بسته دارای دیواره‌ای به ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر و بازوهای باز دارای ارتفاع ۲/۵ سانتی‌متر هستند و در مرکز نیز

می‌شود. آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز در پستانداران دارای دو ایزوفرم با وزن‌های مولکولی ۶۵ و ۶۷ کیلوالتون است. آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ مسئول اصلی تولید گابا است و کاهش آن باعث کاهش سطح گابا می‌شود. سلول‌های گاباژیک انواع مختلفی دارند و ۲۰ درصد کل نورون‌ها را تشکیل می‌دهند. یک دسته از این نورون‌ها در مناطقی از مغز که در اضطراب نقش مهمی دارند از جمله هیپوکمپ<sup>۷</sup> و قشر پرفرونتال<sup>۸</sup> و آمیگدال<sup>۹</sup> یافت می‌شوند [۲]. مطالعات اخیر نشان داده‌اند رابطه مستقیمی بین افزایش سن و افزایش بیش از حد عملکرد قشر پرفرونتال مشاهده شده است [۳، ۴]. خاموش کردن ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در سلول‌های پرفرونتال باعث کاهش اضطراب در موش‌های بالغ و افزایش اضطراب در موش‌های نوجوان می‌شود [۵]. این امر نشان می‌دهد که تغییر بیان این ژن و در نتیجه تغییر میزان گابا در ایجاد اضطراب یا کاهش آن می‌تواند نقش داشته باشد. مطالعات دیگر نیز اثر سن را بر میزان نوروترنسمیترها و همچنین اضطراب نشان می‌دهند به‌عنوان مثال، یورگاسون<sup>۱۰</sup> و همکاران نشان دادند ایزوله کردن موش‌های بالغ تأثیری در رفتارهای اضطرابی و میزان دوپامین در هسته اکومبنس نداشت در حالیکه در موش‌های نوزاد با افزایش اضطراب و دوپامین در این هسته همراه بود [۶]. از طرف دیگر، اختلال اضطراب می‌تواند احتمال ابتلا به سایر بیماری‌ها از جمله بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، افتادگی، ناتوانی و حتی مرگ را افزایش دهد. اخیراً هم ارتباط بین اختلال اضطراب و کاهش حافظه کلامی، زبان و عملکردهای اجرایی در افراد بدون اختلال فراموشی نشان داده شده است [۷].

از آنجایی که قشر پرفرونتال یکی از ساختارهای درگیر در اضطراب است و مطالعات جامعی در رابطه با اضطراب و تغییر بیان این آنزیم در قشر پرفرونتال در سنین مختلف صورت نگرفته است در این مطالعه به کمک دستگاه ماز بعلاوه ای شکل مرتفع این امر مورد مطالعه قرار می‌گیرد.

<sup>7</sup> Hippocampus

<sup>8</sup> prefrontal

<sup>9</sup> Amygdala

<sup>10</sup> Yorgason

مربع  $10 \times 10$  سانتی متر بازوها را به یکدیگر مرتبط می‌سازد. دستگاه به میزان ۵۰ سانتی متر از سطح زمین ارتفاع داشته و ۱/۵ متر بالاتر از آن یک لامپ ۲۰ وات با پردازش نوری یکنواخت قرار گرفته است. اساس کار دستگاه ماز بعلاوه مرتفع، ترس حیوان از ارتفاع و رفتن به سمت بازوی بسته است که هرچه میزان ورود و مدت زمان سپری شده در بازوی بسته بیشتر باشد نشان‌دهنده افزایش اضطراب در حیوان و برعکس هرچه تعداد ورود و مدت زمان سپری شده در بازوی باز بیشتر باشد نشان‌دهنده کاهش اضطراب حیوان می‌باشد. در ابتدای آزمون هر حیوان به گونه‌ای در دستگاه قرار داده می‌شد که سر آن به طرف بازوی باز باشد. سپس به حیوان اجازه داده می‌شد به مدت ۵ دقیقه آزادانه در دستگاه گردش کند. جهت جلوگیری از یادگیری هر حیوان تنها یکبار تست می‌گردید [۹، ۸]. یک دورین نیز برای ضبط در بالای ماز نصب شده بود که حرکات توسط یک سیستم ردیاب ویدیویی تجزیه و تحلیل می‌شد (تکنیک آزما، ایران) و درصد مدت زمان اقامت و تعداد ورود به بازوهای باز و بسته برای آنالیز آماری ثبت می‌گردید. بعد از هر بار تست از اتانول ۷۰ درصد برای پاکسازی ماز استفاده شد تا در آزمون بعدی تداخلی ایجاد نکند. دستگاه ماز بعلاوه مرتفع به عنوان مدلی است که بر اساس تضاد طراحی شده است و جزو حساس‌ترین مدل‌ها نسبت به دستکارهای سیستم گابا و ابزاری ارزشمند در ارزیابی پتانسیل ضد اضطرابی است [۹].

بلافاصله بعد از اتمام تست برای بررسی بیان ژن مورد نظر، حیوانات با گاز دی‌اکسید کربن بیهوش، سر آن‌ها توسط گیوتین قطع شد و مغز آن‌ها جدا و سپس قسمت پرفروتال جدا و بلافاصله به تانک ازت منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات مولکولی در فریزر  $-80^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند.

### روش انجام آزمایشات مولکولی

روش انجام آزمایشات مولکولی مشابه کارهای قبلی بود [۱۱، ۱۰]. بطور خلاصه، به منظور بررسی سطح بیان ژن‌های مورد نظر در ابتدا استخراج ریبونوکلئیک اسید صورت پذیرفت. بنابراین ابتدا قسمت میانی قشر پرفروتال از بافت مغز توسط سرنگ انسولین هموژن گردید و سپس با استفاده از کیت استخراج ریبونوکلئیک اسید (دنازیست آسیا، ایران)، طبق پروتکل شرکت سازنده ریبونوکلئیک اسید نمونه‌ها استخراج شد. بطور خلاصه روند کار به این صورت بود که ۶۰۰

میکرولیتر از بافر جی یک کیت به دو میکرولیتر از نمونه بافت مغز اضافه و پیپتینگ گردید. بعد از ۵ دقیقه، نمونه حاصل به مدت ده دقیقه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد لایه رویی نمونه‌ها جدا و به میکروتیوب جدید منتقل و به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد و ۱۵ ثانیه شیک گردید. نمونه‌های حاصل به مدت پنج دقیقه بر روی یخ انکوبه شدند و مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. بعد از انتقال لایه رویی به میکروتیوب‌های جدید و اضافه کردن به همان میزان از نسبت حجمی مساوی ایزوپروپانول و بافر جی دو، نمونه‌ها مجدداً شیک گردیدند و بر روی یخ به مدت ده دقیقه انکوبه شدند. در مرحله بعد از سانتریفیوژ یخچال دار استفاده گردید و بعد از مشاهده رسوب ته میکروتیوب‌ها مایع رویی دور ریخته شد و به بقیه میکروتیوب ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت پنج ثانیه ورتکس شدند و این بار با دور ۷۵۰۰ مجدداً در دمای چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. در آخر، مجدداً فاز رویی دور ریخته شد و میکروتیوب‌ها با درب باز در محیط آزمایشگاه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند تا کاملاً خشک شوند. به رسوب خشک شده به میزان ۲۰-۱۵ میکرولیتر آب فاقد ریبونوکلئاز اضافه و با دور بالا اسپین شد. ریبونوکلئیک اسیدهای بدست آمده طی پروتکل بالا در دمای  $-80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به منظور کسب اطمینان از غلظت، کیفیت و نیز نرمال کردن مقدار ریبونوکلئیک اسید نمونه‌ها، برای انجام مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمریزاسیون از نانودراپ استفاده شد و غلظت ریبونوکلئیک اسید سنجیده شد. ریبونوکلئیک اسید در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ ارزیابی گردید. یکپارچگی و سالم بودن ریبونوکلئیک اسید نیز با استفاده از ژل آگارز بررسی شد. ریبونوکلئیک اسید در مقایسه با دزوکسی نوکلئیک اسید از پایداری نسبی کمتری برخوردار است. بنابراین ابتدا از روی ریبونوکلئیک اسید، دزوکسی نوکلئیک اسیدهای مکمل ساخته می‌شود. با استفاده از کیت سنتز دزوکسی نوکلئیک اسید مکمل (پارس توس، ایران)، نمونه‌های دزوکسی نوکلئیک اسید مکمل ساخته شد. طبق پروتکل شرکت سازنده کیت به میکروتیوب حاوی یک میکرولیتر از نمونه ریبونوکلئیک اسید، هشت میکرولیتر آب دیپس اضافه شد. سپس نمونه‌ها به سرعت

جدول ۱- درصد تعداد ورود به بازوهای باز ماز بعلاوه در سنین مختلف.

سن (روز)	۲۱	۴۲	۳۶۵	گروه
	۴۸/۲۵ ± ۱/۲	۴۹/۰ ± ۰/۸۷ <sup>≠</sup>	۵۰/۰ ± ۰/۰۳	ماز
	۵۳/۲ ± ۱/۲ <sup>*</sup>	۵۱/۱۵ ± ۰/۴۵ <sup>≠*</sup>	۶۰/۱ ± ۸/۰	ماز + دیازپام

\*: تفاوت معنی دار با گروه ماز با  $p < ۰/۰۵$ ،  $p < ۰/۰۵$ : تفاوت معنی دار با سن ۲۱ روزگی با  $p < ۰/۰۵$ .

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۳، و با روش‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی دانکن انجام شد.  $p < ۰/۰۵$  به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### پارامترهای سنجش اضطراب و تیمار با داروی دیازپام

جدول ۱ و ۲ به ترتیب درصد تعداد ورود و درصد مدت زمان اقامت در بازوهای باز را در گروه تست ماز و گروه تیمار با داروی دیازپام + تست ماز در موش‌های ۲۱، ۴۲ و ۳۶۵ روزه را نشان می‌دهند. همانگونه که در جداول مشاهده می‌شود تیمار با دیازپام سبب افزایش مدت زمان اقامت در بازوهای باز در همه سنین و افزایش تعداد ورود به بازوهای باز در سن ۲۱ روزگی می‌شود که هر دو پارامتر نشان‌دهنده کاهش اضطراب است.

#### اثر سن بر پارامترهای سنجش اضطراب و تیمار با دیازپام

مقایسه پارامترهای سنجش اضطراب در سنین مختلف در جداول شماره یک و دو آورده شده است. همانگونه نشان داده شده است تعداد ورود در بازوهای باز در گروه‌های ماز و ماز + دیازپام در سن ۲۱ روزگی نسبت به سن ۴۲ روزگی به طور معنی دار کمتر است ( $p < ۰/۰۵$ ). در مورد درصد مدت زمان اقامت در هر دو گروه در سن ۲۱ روزگی بطور معنی دار کمتر از سایر سنین بود ( $p < ۰/۰۱$ ،  $p < ۰/۰۰۱$ ).

اسپین شدند و روی یخ قرار گرفتند. در این مرحله، به آن‌ها ده میکرولیتر از محلول بافر مربوطه و دو میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ده دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری اسپین شدند و به ترتیب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پنج دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری در دستگاه ترموسایکلر قرار گرفتند و نمونه‌های دزوکسی نوکلئیک اسید مکمل حاصل در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. یکپارچگی و سالم بودن نمونه‌ها نیز با استفاده از ژل آگارز بررسی گردید. در نهایت، به منظور بررسی بیان نسبی ژن‌ها به دزوکسی نوکلئیک اسیدهای مکمل حاصل طی مراحل مخلوط اصلی qPCR (پارس توس، ایران) و پرایمرها اضافه شد و PCR با رنگ گزارشگر سایبرگرین و در دستگاه PCR (روشه لایف ساینس<sup>۱۱</sup>، آلمان) با سه تکرار انجام شد و داده‌های بیان ژن با استفاده از نرم‌افزار دستگاه با ورژن ۱/۱ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برنامه دستگاه برای ژن‌ها شامل مراحل زیر بود: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۴۸۰ ثانیه، به دنبال آن ۴۰ چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه. ژن گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز بعنوان ژن مرجع در نظر گرفته شد. توالی پرایمرهای استفاده شده به شرح زیر بود:

*GAD 67*: Forward: CAC AGA GAC GGA CTT CTC CA; Reverse: AAC TGC ACA GTT TGC TCC TC,  
*GAPDH*: Forward: CAA GGC TGA GAA TGG GAA GC; Reverse: GAA GAC GCC AGT AGA CTC CA.

برای بیان میزان بیان نسبی ژن‌ها از روش لیواک<sup>۱۲</sup> و همکاران و معادله ریاضی  $2^{-\Delta\Delta CT}$  استفاده شد [۱۲].

<sup>11</sup> Roche Life Science

<sup>12</sup> Livak

جدول ۲- درصد مدت زمان اقامت در بازوهای باز ماز بعلاوه در سنین مختلف.

سن (روز)	۲۱	۴۲	۳۶۵
گروه ماز	۵/۵۷ ± ۱/۲۸	۲۱/۲۵ ± ۲/۳#	۲۳/۶ ± ۴/۵۷##
گروه ماز + دیازپام	۶۵/۲۸ ± ۸/۲***	۴۸/۷۰ ± ۷/۸۶##*	۶۷/۰ ± ۱۲/۴۷####

\* تفاوت معنی‌دار با گروه ماز با  $p < ۰/۰۵$ . \*\* تفاوت معنی‌دار با گروه ماز با  $p < ۰/۰۱$ . \*\*\* تفاوت معنی‌دار با گروه ماز با  $p < ۰/۰۰۱$ . #: تفاوت معنی‌دار با سن ۲۱ روزگی با  $p < ۰/۰۵$ . #: تفاوت معنی‌دار با سن ۲۱ روزگی با  $p < ۰/۰۱$ .

## تغییرات بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفرونتال در گروه‌های کنترل، ماز و تیمار با دیازپام در سنین مختلف

نمودار ۱ تغییرات بیان ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفرونتال را در گروه‌های کنترل، ماز و تیمار با دیازپام در سنین مختلف را نشان می‌دهد. همانگونه که در این نمودار مشاهده می‌شود تفاوت معنی‌داری بین بیان ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در گروه‌های کنترل و ماز در سنین مختلف وجود ندارد یا به عبارتی اضطراب ذاتی بیان ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ را در قشر پرفرونتال تغییر نمی‌دهد. در سن ۴۲ روزگی بیان ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در گروه تیمار با دیازپام بطور معنی‌دار پایین تر از سایر گروه‌ها بود ( $p < ۰/۰۰۱$ ).

## اثر سن بر بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفرونتال

نمودار ۲ اثر سن را بر بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در قشر پرفرونتال نشان می‌دهد. همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌شود، سن اثری بر بیان این ژن در گروه‌های کنترل و ماز (اضطراب ذاتی) ندارد. بیان ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در سن ۴۲ روزگی در گروه تیمار با دیازپام نسبت به سایر سنین کمتر بود ( $p < ۰/۰۰۱$ ).

## بحث

مطالعه حاضر نشان داد که اضطراب ذاتی در سن ۲۱ روزگی بالاتر از سایر سنین بود. مدل‌های حیوانی یافته‌های متناقضی در مورد تاثیر سن بر سطح اضطراب را نشان داده‌اند.

به‌طورمثال، در مطالعه آندراده<sup>۱۳</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۳ مشخص شد سطح اضطراب ذاتی در موش‌های نوجوان کاهش می‌یابد [۱۳] ولی در مطالعه دورموس<sup>۱۴</sup> و همکاران مشخص شد سطح اضطراب در نوجوانی نسبت به دوران بلوغ افزایش می‌یابد [۱۴]. این اختلافات در نتایج به احتمال زیاد به خاطر ترکیبی از عوامل مختلف مانند نژاد، جنسیت، سن موش‌ها در زمان آزمایش و ساعات انجام آزمایشات می‌باشد [۱۵]. در این مطالعه، ما به بررسی تغییرات بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در قشر پرفرونتال موش‌های نابالغ، بالغ و پیر در یک مدل حیوانی اضطراب ذاتی یعنی تست ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع پرداختیم. نتایج ما نشان داد که در هر گروه سنی بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفرونتال در اضطراب ذاتی تغییری پیدا نکرد و سن اثری بر این پارامتر نداشت. تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تغییرات بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفرونتال در تست ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع وجود ندارد ولی تغییرات بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در سایر مدل‌های حیوانی اضطراب مورد بررسی قرار گرفته است. بورز<sup>۱۵</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که استرس مقید کردن سبب افزایش بیان ژن این آنزیم در یک سری از مناطق مغزی درگیر در اضطراب از جمله هیپوکمپ و هیپوتالاموس می‌شود [۲]. استرس تابعیت اجتماعی مزمن سبب افزایش بیان ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در هیپوکمپ و قشر پرفرونتال که جز ساختارهای مغزی جامعیت دهنده استرس هستند می‌شود [۱۶]. مرادی و همکاران نیز در سال ۲۰۲۲ در یک مدل اضطراب وضعیتی افزایش بیان این آنزیم را نشان دادند [۱۱]. همچنین

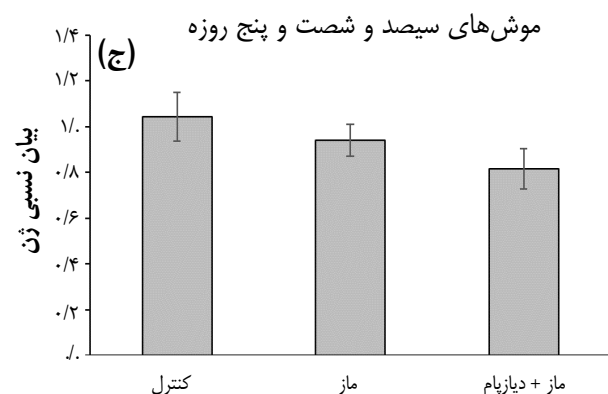
<sup>13</sup> Andrade

<sup>14</sup> Doremus

<sup>15</sup> Bowers

آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در قشر پرفروتال تغییری در پارامترهای ماز بعلاوه‌ای شکل مرتفع ایجاد نشد [۱۷].

مطالعات با نتایج متناقض نیز وجود دارد. کوردرد<sup>۱۷</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که در موش‌های نوجوان تازه بالغ با حذف ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ از نورون‌های بینابینی و گابارژیک حاوی نوروپپتید Y (NPY) در قشر پرفروتال رفتارهای اضطرابی در تست ماز افزایش یافت [۵] درحالی‌که اسکمیت<sup>۱۸</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که حذف این ژن در این نورون‌ها در موش‌های بالغ اضطراب ذاتی را کاهش می‌دهد [۱۸]. بطور کلی، نتیجه‌ای که از این مطالعات بدست می‌آید این است که نقص در ژن آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ بسته به سن، نوع نورون بینابینی و همچنین ساختار مغزی نتایج متفاوتی را در رفتار اضطراب ذاتی ایجاد می‌کند. در هر صورت، نقش پرفروتال در بسیاری از اختلالات اضطرابی مشخص شده است. اعتقاد بر این است که قشر پرفروتال رفتارهای اضطرابی را به واسطه ارتباطاتی که با قسمت قاعده‌ای جانبی آمیگدال که ساختار اصلی مدار نورونی اضطراب است دارد، تعدیل می‌کند [۱۹]. به نظر می‌رسد که پرفروتال تظاهر یا تجربه ترس را از طریق تعدیل فعالیت نورون‌های آمیگدال قاعده‌ای جانبی انجام می‌دهد و سیستم گابارژیک درون پرفروتال نقش کلیدی در تنظیم فعالیت آمیگدال ایفا می‌کند [۲۰]. یکی از خصوصیات بارز آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ این است که بیان آن در نورون‌ها تحت شرایط فیزیولوژیک و پاتولوژیک دستخوش تغییر می‌شود. تعدیل سنتز گابا باعث تنظیم مهار بر روی مدارهای نورونی می‌شود و آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ به‌طور مستقیم بر روی این مهار سیناپسی اثر دارد [۲۱]. مطالعات نشان دادند که افزایش محتوای گابا داخل قشر پرفروتال باعث افزایش فعالیت آمیگدال و در نتیجه افزایش رفتارهای اضطرابی گردید [۲۲، ۲۳]. استرس نیز سبب افزایش مهار در قشر پرفروتال می‌گردد [۲۴]. در این خصوص، مشاهده شده است که در اختلالات اضطرابی قشر پرفروتال کمتر فعال است و فعالیت آمیگدال بالاتر از افراد نرمال است [۲۴]. دلیل این امر این است که افزایش گابا در قشر پرفروتال باعث کاهش مهار گابارژیک



**نمودار ۱-** تغییرات بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفروتال در گروه‌های کنترل، ماز و تیمار با دیازپام در سنین مختلف. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار از میانگین نمایش داده شده است. \*\*\*:  $P < 0.001$  در مقایسه با سایر گروه‌ها.

یک سری از اطلاعات ما با کمک دستکاری‌های ژنتیکی بر روی آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ به‌دست آمده است. به‌عنوان مثال، مشابه مطالعه حاضر در مطالعه‌ی اسکمیت<sup>۱۸</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۸ مشاهده شد که با حذف یک ال از ژن

<sup>17</sup> Corder

<sup>18</sup> Schmidt

<sup>16</sup> Smith

دوپامین نیز مطرح باشد [۲۵] مطالعات دقیق تر در این زمینه ضروری به نظر میرسد.

### نتیجه گیری

نتایج ما نشان داد که اضطراب ذاتی در موش‌های ۲۱ روزه بالاتر از سایر سنین بود. بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفرونتال در اضطراب ذاتی تغییری پیدا نکرد و سن اثری بر این پارامتر نداشت.

### سپاسگزاری

این مطالعه بخشی از پایان نامه آقای محمد جواد اسپرهم در مقطع دکترای عمومی دامپزشکی با شماره ثبت ۱۳۹۹/۷۸ می‌باشد.

### ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی نویسنده مسئول انجام شد.

### تعارض در منافع

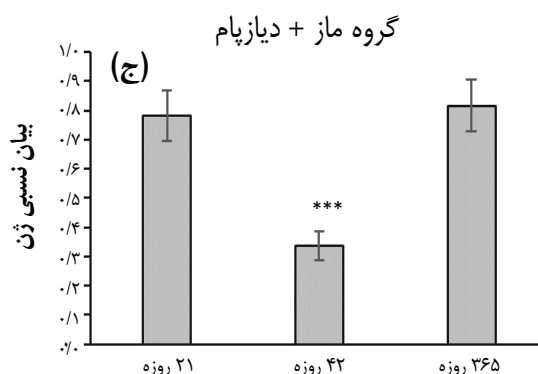
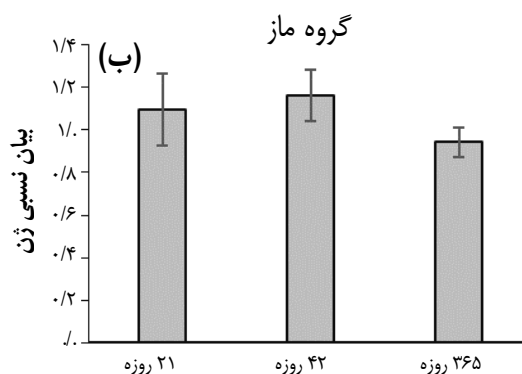
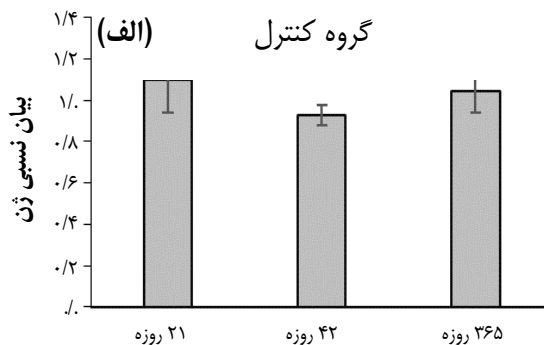
نویسندگان این مقاله تعارض در منافع ندارند.

### نقش نویسندگان

م. ج. ا.: انجام مطالعه؛ س. م.: ایده، آنالیز داده‌ها، نگارش مقاله و نظارت بر حسن اجرای مطالعه؛ م. م. س.: کمک در انجام مطالعات رفتاری و ملکولی.

### فهرست منابع

- [1] File SE, Age and anxiety: Increased anxiety, decreased anxiolytic, but enhanced sedative, response to chlordiazepoxide in old rats. *Hum Psychopharmacol* 5 (1990) 169-173.
- [2] Bowers G, Cullinan WE, Herman JP, Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci* 18 (1998) 5938-5947.
- [3] Meyza KZ, Boguszewski PM, Nikolaev E, Zagrodzka J, Age increases anxiety and reactivity of the fear/anxiety circuit in Lewis rats. *Behav Brain Res* 225 (2011) 192-200.
- [4] Roalf DR, Pruis TA, Stevens AA, Janowsky JS, More is less: emotion induced prefrontal cortex activity habituates in aging. *Neurobiol Aging* 32 (2011) 1634-1650.



**نمودار ۲-** اثر سن بر بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ در قشر پرفرونتال. نتایج به صورت میانگین و انحراف معیار از میانگین نمایش داده شده است. \*\*\*:  $p < 0.001$  در مقایسه با سایر سنین.

درون آمیگدال و در نتیجه افزایش فعالیت آن می‌شود [۲۰، ۲۲]. در مطالعه حاضر، ارتباطی بین اضطراب ذاتی و آنزیم دکربوکسیلاز ۶۷ قشر پرفرونتال مشاهده نشد و حتی با این که اضطراب ذاتی در موش‌های ۲۱ روزه بالاتر بود تفاوتی بین میزان بیان آنزیم گلوتامات دکربوکسیلاز ۶۷ آن‌ها با سایر سنین مشاهده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد که در قشر پرفرونتال در این نوع از اضطراب نقص در سایر میانجی‌ها و مکانیسم‌های مربوط به آن‌ها مانند سروتونین، نوراپینفرین و

- [5] Corder KM, Cortes MA, Bartley AF, Lear SA, Lubin FD, Dobrunz LE, Prefrontal cortex-dependent innate behaviors are altered by selective knockdown of Gad1 in neuropeptide Y interneurons. *PLoS One* 13 (2018) e0200809.
- [6] Yorgason JT, España RA, Konstantopoulos JK, Weiner JL, Jones SR, Enduring increases in anxiety-like behavior and rapid nucleus accumbens dopamine signaling in socially isolated rats. *Eur J Neurosci* 37 (2013) 1022-1031.
- [7] Perna G, Iannone G, Alciati A, Caldirola D, Are anxiety disorders associated with accelerated aging? A focus on neuroprogression. *Neural Plast* 2016 (2016) 8457612.
- [8] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M, Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 14 (1985) 149-167.
- [9] Hogg S, A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 54 (1996) 21-30.
- [10] Motaghi S, Moghaddam Dizaj Herik H, Sepehri G, Abbasnejad M, Esmaili-Mahani S, The anxiolytic effect of salicylic acid is mediated via the GABAergic system in the fear potentiated plus maze behavior in rats. *Mol Biol Rep* 49 (2022): 1133-1139.
- [11] Sirchi MM, Motaghi S, sadat Hosseininassab N, Abbasnejad M, Esmaili-Mahani S, Sepehri G, Age-related changes in glutamic acid decarboxylase 1 gene expression in the medial prefrontal cortex and ventral hippocampus of fear-potentiated rats subjected to isolation stress. *Behav Brain Res* 453 (2023) 114630.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25 (2001) 402-408.
- [13] Andrade MM, Tomé MF, Santiago ES, Lúcia-Santos A, de Andrade TG, Longitudinal study of daily variation of rats' behavior in the elevated plus-maze. *Physiol Behav* 78 (2003) 125-133.
- [14] Doremus TL, Brunell SC, Varlinskaya EI, Spear LP, Anxiogenic effects during withdrawal from acute ethanol in adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav* 75 (2003) 411-418.
- [15] Masur J, Schutz MT, Boerngen R, Gender differences in open-field behavior as a function of age. *Dev Psychobiol* (1980) 107-110.
- [16] Makinson R, Lundgren KH, Seroogy KB, Herman JP, Chronic social subordination stress modulates glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in central stress circuits. *Physiol Behav* 146 (2015) 7-15.
- [17] Smith KM, Hyperactivity in mice lacking one allele of the glutamic acid decarboxylase 67 gene. *Atten Defic Hyperact Disord* 10 (2018) 267-271.
- [18] Schmidt MJ, Horváth S, Ebert P, Norris JL, Seeley EH, Brown J, Gellert L, Everheart M, Garbett KA, Grice TW, Caprioli RM, Modulation of behavioral networks by selective interneuronal inactivation. *Mol Psychiatry* 19 (2014) 580-587.
- [19] Hare BD, Duman RS, Prefrontal cortex circuits in depression and anxiety: contribution of discrete neuronal populations and target regions. *Mol Psychiatry* 25 (2020) 2742-2758.
- [20] Nuss P, Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. *Neuropsychiatr Dis Treat* 11 (2015) 165-175.
- [21] Lazarus MS, Krishnan K, Huang ZJ, GAD67 deficiency in parvalbumin interneurons produces deficits in inhibitory transmission and network disinhibition in mouse prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 25 (2015) 1290-1296.
- [22] Delli Pizzi S, Padulo C, Brancucci A, Bubbico G, Edden RA, Ferretti A, Franciotti R, Manippa V, Marzoli D, Onofrij M, Sepede G, GABA content within the ventromedial prefrontal cortex is related to trait anxiety. *Soc Cogn Affect Neurosci* 11 (2016) 758-766.
- [23] Etkin A, Wager TD. Functional neuroimaging of anxiety: a meta-analysis of emotional processing in PTSD, social anxiety disorder, and specific phobia. *Am J Psychiatry* 164 (2007) 1476-1488.
- [24] Shepard R, Page CE, Coutellier L. Sensitivity of the prefrontal GABAergic system to chronic stress in male and female mice: relevance for sex differences in stress-related disorders. *Neuroscience* 332 (2016): 1-12.
- [25] Liu Y, Zhao J, Guo W, Emotional roles of monoaminergic neurotransmitters in major depressive disorder and anxiety disorders. *Front Psychol* 9 (2018) 2201.

## Research paper

## Changes in the prefrontal cortex glutamate decarboxylase 67 gene expression of immature, adult and old rats in innate anxiety

Mohammad Javad Esperham, Sahel Motaghi\*, Mahya Moradi Sirchi

Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran

Received: 29 May 2024

Accepted: 1 July 2024

## Abstract

**Background and Aim:** The age of laboratory animals is an important variable at the time of the experiment. GABA is a neurotransmitter that is synthesized from the amino acid glutamate by the enzyme glutamate decarboxylase (GAD). GAD67 is the main enzyme responsible for the production of GABA and its reduction causes a decrease in GABA levels. Since the prefrontal cortex is one of the important brain structures in the neuronal circuits of anxiety and there has not been a comprehensive study related to anxiety and the change in gene expression of this enzyme in the prefrontal cortex at different ages, in this study, with the help of the elevated plus maze device, this assay was investigated.

**Methods:** Rats with three age groups of 21, 42 and 360 days were used. At each age, the grouping of animals was as follows: 1) control group, 2) innate anxiety group in which the rats were placed in the elevated maze test, 3) diazepam administration group + innate anxiety group. Immediately after the test, the medial prefrontal cortex of the animals was isolated and evaluated with the help of a real time PCR technique.

**Results:** Our results showed that anxiety in 21-day-old mice were higher than other ages. GAD67 enzyme expression of the prefrontal cortex did not change in innate anxiety and age had no effect on it ( $p > 0.05$ ).

**Conclusion:** It seems that in the prefrontal cortex, other components of the GABAergic system or other neurotransmitters such as serotonin, norepinephrine, etc. and their related mechanisms are involved in innate anxiety.

**Keywords:** Anxiety, Prefrontal cortex, Glutamate decarboxylase 67

Please cite this article as follows:

Esperham MJ, Motaghi S, Sirchi MM, Changes in the prefrontal cortex glutamate decarboxylase 67 gene expression of immature, adult and old rats in innate anxiety. *Iran J Physiol Pharmacol* 8 (2024) 57-65.

\*Corresponding authors: sahelmotaghi@uk.ac.ir (ORCID: 0000-0002-2159-6195)