Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2016; 19(115): 25-38

The Role of $GABA_A$ Receptor in Antispasmodic Activity of Hydroalcholic Extract of *Petroselinum Crispum* (Parsley) Seed in Rat Ileum

Feryal Savary[1*], Ahmad Ali Moazedi[2], Mohammad Kazem Gharib-Naseri[3], Mohammad Reza Zadkarami [4]

1- M.Sc., Department of Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2- Professor, Department of Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3- Professor, Department of Physiology, Physiology Research Center, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran
4- Professor, Department of Statistics, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received:31 Jul 2016, Accepted: 26 Oct 2016

Abstract

Background: Parsley is one of the medicinal herbs used for gastrointestinal disorders. However, spasmolytic activity of *Petroselinum crispum* (parsley) extract has been reported, there is a lack of information to support the mechanism of this antispasmodic activity. Taking this into account, the purpose of the present work was to investigate the role of $GABA_A$ receptor on antispasmodic activity of the hydroalcoholic extract of parsley seed in isolated rat ileum.

Materials and Methods: In this study, terminal portion of ileum (2 cm) was dissected out and mounted in an organ bath containing air bubbled Tyrode solution (37^oC, pH=7.4). Under 1gr resting tension, ileal contraction was induced by KCl (60 mM) and recorded isotonically. The effects of non-cumulative (0.1-0.5 mg/ml) concentrations of extract on KCl-induced contractions were examined. After evaluating the effect of agonist and antagonist $GABA_A$ receptor, the effect of parsley extract was assessed in the presence of muscimol (25 μM) and bicuculline (10 μM) as agonist and antagonist of $GABA_A$, respectively.

Results: Parsley seed extract reduced the KCl-induced ileal contraction in a concentration-dependent manner ($n=7$, $p<0.001$). Both muscimol and bicuculline exerted relaxant effect on ileal contraction ($n=7$, $p<0.05$, $p<0.01$, respectively). Surprisingly, agonist and antagonist of $GABA_A$ both potentiated the spasmolytic effect of extract (0.2 mg/ml). Altogether, spasmolytic effect of extract was not attenuated in the presence of $GABA_A$ antagonist.

Conclusion: It seems that $GABA_A$ receptor is not involved in the antispasmodic effect of parsley seeds extract in rat ileum.

Keywords: Antispasmodic, GABAA receptor, Ileum, Parsley seed extract

*Corresponding Author:
Address: Department of Biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Email: feryal.savary@yahoo.com

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۹، شماره ۱۰ (شماره پیاپی ۱۱۵)، دی ۱۳۹۵، ۳۸-۲۵

نقش گیرنده $GABA_A$ در فعالیت ضد انقباضی عصاره هیدروالکلی بذر جعفری در ایلئوم موش صحرایی

فریال سواری[1*]، احمد علی معاضدی[2]، محمدکاظم غریب ناصری[3]، محمدرضا زاد کرمی [4]

۱.کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲.استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳.استاد، گروه فیزیولوژی، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۴.استاد، گروه آمار، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۵/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۰۵

چکیده

زمینه و هدف: جعفری یکی از گیاهان دارویی مورد مصرف در اختلالات گوارشی است. اگر چه فعالیت ضد انقباضی عصاره جعفری به اثبات رسیده است، اما اطلاعات محدودی از مکانیسم اثر ضد انقباضی عصاره جعفری وجود دارد. بر این اساس، هدف از این تحقیق، بررسی نقش گیرنده $GABA_A$ بر فعالیت ضد انقباضی عصاره هیدروالکلی بذر جعفری در ایلئوم جدا شده از موش‌صحرایی است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، بخش انتهایی ایلئوم (۲ سانتی‌متر) جدا شد و در حمام بافت حاوی محلول تایرود اکسیژنه (pH=۷/۴ ، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) قرار گرفت. انقباض ایلئومی القاء شده با کلرور پتاسیم(۶۰ میلی مولار) تحت یک گرم کشش اولیه، به صورت ایزوتونیک ثبت گردید. اثرات غلظت‌های غیرتجمعی عصاره(۰/۱ تا ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بر انقباضات القاء شده با کلرور پتاسیم بررسی گردید. به دنبال ارزیابی اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ ، اثر عصاره جعفری در حضور موسیمول و بیکوکولین(به ترتیب به عنوان آگونیست و آنتاگونیست $GABA_A$) بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره بذر جعفری، انقباض ایلئومی القاء شده با کلرور پتاسیم را به روش وابسته به غلظت کاهش داد ($n=۷, p<۰/۰۰۱$). موسیمول و بیکوکولین هر دو اثر شل‌کنندگی بر انقباض ایلئومی اعمال کردند ($p<۰/۰۵$، $p<۰/۰۱$، $n=۷$). هم‌چنین، موسیمول و بیکوکولین اثر ضد انقباضی عصاره را (۰/۲میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تقویت کردند. در مجموع، اثر ضد انقباضی عصاره در حضور آنتاگونیست $GABA_A$ کاهش نیافت.

نتیجه گیری: به نظر می‌رسد که گیرنده $GABA_A$ در فعالیت ضد انقباضی عصاره بذر جعفری بر ایلئوم موش صحرایی دخالت ندارد.

واژگان کلیدی: ضد اسپاسم، گیرنده $GABA_A$ ، ایلئوم، عصاره جعفری

***نویسنده مسئول:** ایران، اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه زیست شناسی

Email: feryal.savary@yahoo.com

مقدمه

حدود ۸۰ درصد از جمعیت جهان متکی بر استفاده از درمان سنتی هستند که غالباً بر پایه ترکیبات گیاهی هستند. داروهای گیاهی به واسطه اثربخشی و نیز هزینه مناسب، در سال‌های اخیر اهمیت پیدا کرده‌اند(۱). ضد اسپاسم‌ها داروهای شل کننده عضلانی هستند که جهت رفع گرفتگی یا اسپاسم عضله صاف اندام‌هایی چون معده، روده و مثانه به کار می‌روند. بنابر این، ضد اسپاسم‌ها به فراوانی در رابطه با برخی‌از اختلالات گوارشی تجویز می‌شوند(۲). با توجه به این که استفاده از چنین داروهایی می‌تواند با ظهور عوارض جانبی نامطلوب همراه باشد، جستجوی داروهای ضد اسپاسم بی خطر و مشتق شده از گیاهان به یک گزینه حائز اهمیت تبدیل شده است. جعفری یکی از گیاهان دارویی مورد استفاده در اختلالات گوارشی است(۳). جعفری با نام علمی Petroselinum crispum، متعلق به خانواده چتریان و بومی منطقه مدیترانه است که در سرتاسر دنیا کشت می‌شود. این گیاه در طب سنتی به عنوان مدر، اشتهاآور، قاعدگی‌آور و سقط‌کننده جنین مصرف می‌شود(۳- ۵). هم‌چنین جعفری به عنوان یک عامل هیپوگلیسمیک در بیماری دیابت استفاده می‌شود(۶). آنالیز فیتوشیمیایی جعفری وجود ترکیباتی چون فلاونوئیدها، کارتنوئیدها، اسکوربیک‌اسید، توکوفرول، کومارین‌ها، فتالیدها و ترکیبات معطر مثل آپیول را ثابت کرده است(۳، ۶).

تنظیم فعالیت عضله صاف و حرکت احشاء در سطوح متعددی رخ می‌دهد. هورمون‌ها و نوروترانسمیترها ترکیبات اصلی هستند که وارد عمل شده و به طور مستقیم و غیر مستقیم بر سلول‌های عضلانی اثر می‌کنند(۷). گاما آمینوبوتیریک اسید با نام اختصاری گابا(GABA) به عنوان یک نوروترانسمیتر در سیستم عصبی انتریک دستگاه گوارش ثابت شده است (۸- ۱۰). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که نوروترانسمیتر گابا حرکات دستگاه گوارش را تعدیل می‌کند(۸- ۱۲). تاکنون سه نوع گیرنده گابا به ترتیب $GABA_A$، $GABA_B$ و $GABA_C$ شناسایی شده‌اند. گیرنده‌های اینوتروپیک $GABA_A$, $GABA_C$ کانال‌های یونی وابسته به لیگاند هستند در حالی که گیرنده $GABA_B$ از نوع متابوتروپیک جفت شونده به G پروتئین است(۱۳). فعال‌سازی این گیرنده‌ها اثرات مختلفی را با توجه به ناحیه مورد نظر از دستگاه گوارش یا نوع گونه حیوانی مورد مطالعه نشان می‌دهد(۸، ۱۰ و ۱۲). گیرنده‌های $GABA_A$ به طور اختصاصی توسط موسیمول فعال شده و به ترتیب به صورت رقابتی و غیر رقابتی توسط بیکوکولین و پیکروتوکسین آنتاگونیزه می‌گردند(۱۴).

پیش از این، فعالیت ضد انقباضی عصاره الکلی بذر جعفری بر انقباضات ایلئومی القاء شده با کلرور پتاسیم در موش‌های صحرایی نر توسط معاضدی و همکاران گزارش شده است(۳). از طرفی، میرزایی و همکاران نشان دادند که گیرنده‌های آدرنرژیک در عملکرد شل‌کنندگی عصاره جعفری دخالت ندارند(۴). هم‌چنین، در مطالعه‌ای بر روی فعالیت ضد انقباضی عصاره بذر جعفری در ایلئوم، نیتریک‌اکساید(NO) در عملکرد ضد انقباضی این عصاره نقشی نداشت(۱۵).

علی‌رغم این گزارشات، اطلاعات اندکی در زمینه سایر مکانیسم‌های احتمالی عملکرد ضد انقباضی عصاره بذر جعفری وجود دارد. بر این اساس، هدف از این مطالعه، بررسی نقش گیرنده $GABA_A$ بر فعالیت ضد انقباضی عصاره بذر جعفری در ایلئوم جدا شده از موش‌صحرایی است.

مواد و روش‌ها

روش تهیه عصاره هیدروالکلی بذر جعفری:

بذرهای جعفری از یک فروشگاه معتبر در شهر اهواز تهیه گردید. نمونه‌های بذر جعفری بومی خوزستان بوده و شناسایی آن توسط متخصص گیاه شناسی(در دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران اهواز) مورد تأیید قرار گرفت. بذرها به کمک آسیاب برقی پودر شد و به منظور آماده سازی عصاره(به روش خیساندن) ۱۰۰ گرم از پودر حاصل با ۱۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد در دمای اتاق به

خوبی مخلوط و خیسانده شد(۱۶، ۱۷). مخلوط حاصل روزانه در چند نوبت به هم زده می‌شد و پس از ۷۲ ساعت با عبور از کاغذ صافی واتمن شماره ۱، محلول به دست آمده تغلیظ و خشک گردید. عصاره حاصل تا زمان انجام آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هنگام مصرف در محلول تایرود حل شد.

داروها و محلول‌ها

کلیه نمک‌های مورد استفاده در تهیه محلول تایرود و دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) (مرک آلمان)، موسیمول و بیکوکولین به ترتیب، آگونیست و آنتاگونیست اختصاصی گیرنده $GABA_A$(سیگما آمریکا) تهیه شدند. موسیمول با غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ میکرومولار در محلول تایرود حمام بافت ایجاد شد و بیکوکولین با غلظت‌های ۱ تا ۱۰۰ میکرومولار در محلول DMSO تهیه گردید(۱۱). محلول کلرور پتاسیم که جهت ایجاد انقباض به کار رفت از حل کردن کلرورپتاسیم در محلول تایرود تهیه شد، به طوری که اضافه کردن ۰/۲ میلی‌لیتر از آن به حمام بافت، غلظت نهایی ۶۰ میلی‌مولار کلرورپتاسیم را در حمام به وجود آورد(۱۷). محلول تایرود با ترکیب(بر حسب میلی‌مول در لیتر) NaCl (۱۳۶/۹) کلرور پتاسیم (۲/۶۸)، $CaCl_2$ (۱/۸)، $MgCl_2$ (۱/۰۵)، NaH_2PO_4 (۰/۴۲)، $NaHCO_3$ (۱۱/۹) و گلوکز (۵/۵۵) در آب مقطر تهیه شد. عصاره بذر جعفری نیز با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در محلول تایرود تهیه و افزودن ۰/۱ میلی لیتر از آن به حمام، غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در حمام بافت به وجود می‌آمد.

حیوانات آزمایشگاهی و جداسازی بافت ایلئوم

در این تحقیق تجربی، موش‌های صحرایی نر بالغ از نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی ۲۰۰-۲۵۰ گرم(مرکز تکثیر و نگهداری حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز) استفاده شدند. حیوانات مورد آزمایش در شرایط استاندارد و دمای ۲۴°C-۲۰ و دوره ۱۲ ساعتی تاریکی- روشنایی با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند. حداقل دوره سازگاری به محیط آزمایشگاه، یک هفته بود. موش‌ها ۲۴ ساعت پیش از انجام آزمایش، در قفس‌های با کف توری(برای جلوگیری از مدفوع خواری) از غذا محروم شدند، ولی به آب دسترسی داشتند. تمام روش‌های کار با حیوان آزمایشگاهی در این تحقیق به تصویب کمیته اخلاق پژوهش دانشگاه شهید چمران اهواز رسید.

موش‌ها با زدن یک ضربه ناگهانی به پشت گردن کشته شدند و بلافاصله با باز کردن شکم، یک قطعه به طول ۲ سانتی‌متر از بخش انتهایی ایلئوم جدا گردید(به جزء چند سانتی‌متر آخر) و درون آن با جریان ملایم محلول تایرود سرد اکسیژنه شده شستشو داده شد تا محتویات آن کاملاً خارج گردد. از هر موش فقط یک نمونه بافت ایلئوم جداسازی می‌گردید.

قطعه ایلئوم پس از آماده سازی، جهت ثبت فعالیت مکانیکی، در حمام بافت(۱۰ میلی‌لیتر) حاوی محلول تایرود با دمای ۳۷°C و pH=۷/۴ قرار داده و یک طرف ایلئوم به گیره استیل ته حمام بافت و طرف دیگر آن به وسیله قلاب و نخ به بازوی ترانسدیوسر ایزوتونیک (Harvard Universal, UK) متصل گردید. انقباضات ایلئوم منتقل شده به ترانسدیوسر پس از تقویت توسط دستگاه ثبات (اوسیلوگراف هاروارد) با سرعت ۰/۱ میلی‌متر در ثانیه به صورت منحنی‌هایی رسم می‌شد. در تمام مدت آزمایش، جریان دائم اکسیژن در حمام برقرار بود و یک گرم کشش دائم به بافت وارد می‌شد. دوره سازگاری ایلئوم در حمام بافت ۱ ساعت بود که طی آن هر ۱۵ دقیقه محلول حمام بافت تعویض می‌گردید.

روش کار

در اولین بررسی، پس از سازگاری یک ساعته بافت، اثر ضد انقباضی عصاره هیدروالکلی بذر جعفری مورد ارزیابی قرار گرفت. در شروع هر مرحله از آزمایش، از کلرور پتاسیم(۶۰ میلی‌مولار) جهت فعال‌سازی کانال‌های کلسیمی و ایجاد انقباض تونیک استفاده شد. هنگامی‌که انقباض به حالت کفه رسید، هر یک از غلظت‌های غیر

تجمعی عصاره به صورت جداگانه به حمام بافت اضافه شد. به طوری که پس از شستشو و استراحت ۱۵ دقیقه ای بافت و افزودن کلرور پتاسیم، غلظت بعدی عصاره اضافه شد.

به منظور بررسی دخالت احتمالی گیرنده $GABA_A$ در فعالیت ضد انقباضی عصاره بذر جعفری، در یکی از مراحل آزمایش، منحنی‌های غلظت – پاسخ مربوط به آگونیست و آنتاگونیست این گیرنده به صورت غیر تجمعی و به ترتیب با افزودن غلظت‌هایی از موسیمول و بیکوکولین ثبت گردید. شرط اضافه کردن هر غلظت بعدی از آگونیست و یا آنتگونیست، رسیدن انقباض به کفه جدید بود.

هم‌چنین در مراحل جداگانه، اثر ضد انقباضی عصاره جعفری در حضور موسیمول و بیکوکولین بررسی شد. پس از تجویز کلرور پتاسیم به حمام بافت، دوز منتخبی(زیر بیشینه) از آگونیست به حمام بافت اضافه و بلافاصله غلظتی از عصاره جعفری با رسیدن به مرحله کفه جهت ارزیابی اثر این دارو بر فعالیت ضد انقباضی عصاره افزوده شد. این پروتکل در رابطه با غلظت مشخصی از عصاره در حضور بیکوکولین به عنوان آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ جهت مقایسه بهتر اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده بر فعالیت شل‌کنندگی عصاره جعفری تکرار شد.

با توجه به این که بیکوکولین به عنوان آنتاگونیست اختصاصی گیرنده $GABA_A$ اثر گابا و سایر آگونیست‌های گیرنده‌ی مذکور را آنتاگونیزه می‌کند، در این مرحله اثر بیکوکولین بر موسیمول به عنوان آگونیست اختصاصی گیرنده $GABA_A$ مورد بررسی قرار گرفت. از این رو، در یک مرحله جداگانه، بیکوکولین با غلظت ۱۰ میکرومولار و به مدت ۳۰ دقیقه قبل از تحریک بافت توسط کلرور پتاسیم به حمام بافت اضافه گردید. سپس غلظت ۲۵ میکرو مولار موسیمول به حمام افزوده شد.

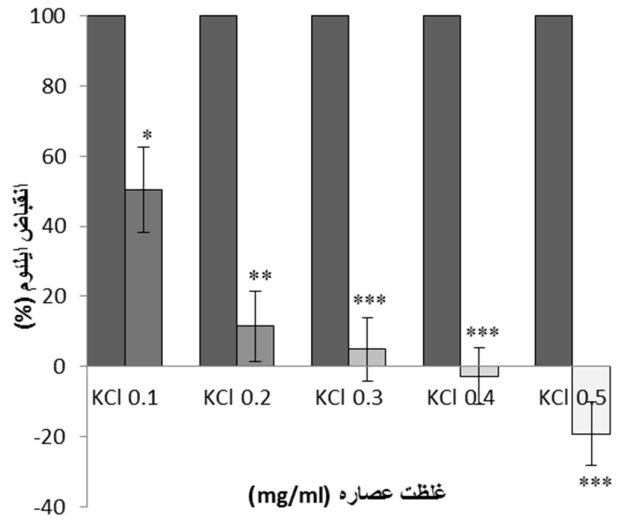
تحلیل آماری

در این تحقیق، انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم به عنوان ۱۰۰ درصد انقباض تلقی شد و درصد تغییرات کفه انقباض ناشی از سایر عوامل اندازه گیری شدند و نتایج هر گروه به صورت میانگین ± انحراف معیار محاسبه و ارائه شده‌اند. تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ورژن ۱۹) انجام گردید. روش آماری ANOVA یک‌طرفه، تی تست و نیز تست تکمیلی LSD برای مقایسه چندین میانگین درون یک جامعه استفاده شد و p کوچکتر از ۰/۰۵ به عنوان تغییر معنی دار میانگین‌ها تلقی گردید.

یافته‌ها

۱) تأثیر غلظت‌های غیر تجمعی عصاره بذر جعفری بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم(۶۰ میلی مولار):

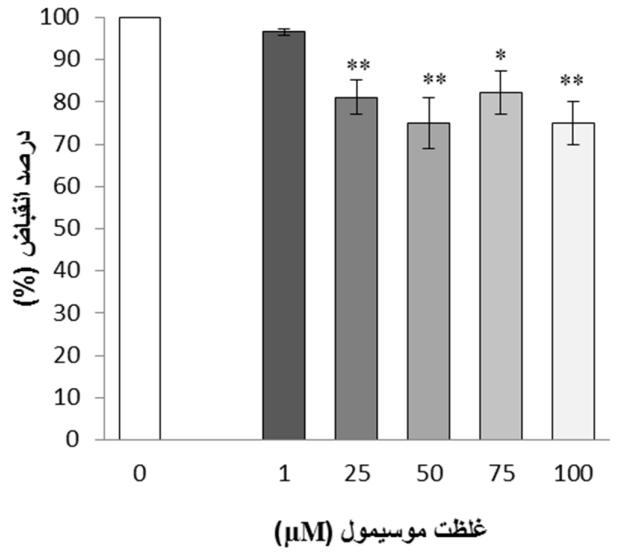
در این بخش، هر بار قبل از افزودن هر غلظت عصاره، بعد از شستشوی بافت و ۱۵ دقیقه استراحت، کلرور پتاسیم به حمام اضافه می‌شد. مقایسه آماری ANOVA یک‌طرفه نشان می‌دهد، غلظت‌های غیر تجمعی عصاره (۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴ و ۰/۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نیز انقباض ناشی از کلرور پتاسیم را به صورت وابسته به غلظت کاهش داد. مقایسه آماری t-test نشان می‌دهد که انقباضات کلرور پتاسیم توسط غلظت‌های غیر تجمعی عصاره به صورت معنی‌دار کاهش یافته است ($p<۰/۰۵$، $p<۰/۰۱$، $p<۰/۰۰۱$، $n=۷$). نمودار ۱ درصد عملکرد ضد انقباضی غلظت‌های مختلف عصاره به صورت غیر تجمعی بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم را نشان می دهد.



نمودار ۱. اثر ضد انقباضی غلظت‌های غیرتجمعی عصاره بذر جعفری بر انقباض ناشی از کلرور پتاسیم(۶۰ میلی‌مولار) (*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، ***p<۰/۰۰۱، n=۷ ، *= در مقایسه با انقباض ناشی از کلرور پتاسیم)

۲) تأثیر موسیمول بر انقباض ناشی از کلرورپتاسیم

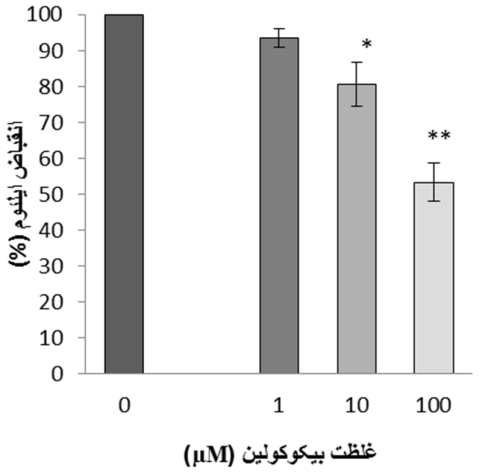
نمودار ۲ نشان می‌دهد که غلظت‌های تجمعی موسیمول (۱، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و۱۰۰ میکرومولار) به عنوان آگونیست $GABA_A$ موجب کاهش معنی‌دار در انقباض ناشی از کلرور پتاسیم گردیده است (p<۰/۰۵، p<۰/۰۱، p<۰/۰۰۱، n=۷). اما اثر کاهشی موسیمول بر انقباض، وابسته به غلظت نبود (ANOVA یک‌طرفه).



نمودار ۲. اثر ضد انقباضی غلظت‌های مختلف موسیمول بر انقباض ناشی از کلرور پتاسیم (۶۰ میلی مولار) (*p<۰/۰۵، **p<۰/۰۱، n=۷، *= در مقایسه با انقباض ناشی از کلرورپتاسیم)

۳) تأثیر بیکوکولین بر انقباض ناشی از کلرورپتاسیم

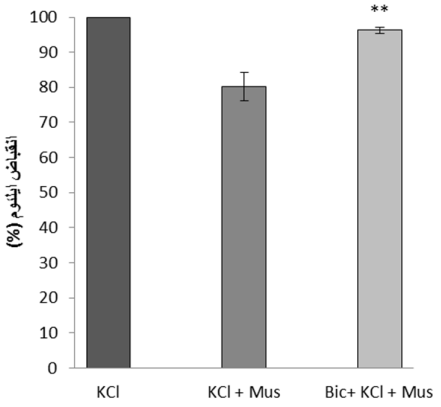
همان طوری که نمودار ۳ نشان می‌دهد، غلظت‌های تجمعی بیکوکولین(۱، ۱۰و ۱۰۰ میکرومولار) به عنوان آنتاگونیست $GABA_A$ سبب کاهش معنی‌دار ($p<۰/۰۵$ ، $p<۰/۰۱$، $n=۷$) و وابسته به غلظت (ANOVA یک طرفه، $F=۱۵/۲۳$، $p<۰/۰۰۱$) در انقباض ناشی از کلرور پتاسیم گردیده است. با توجه به این که بیکوکولین در حلال DMSO حل گردید، در مرحله‌ای جداگانه اثر حلال به تنهایی بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این عمل نشان داد که حلال DMSO هیچ گونه اثری بر انقباض ندارد.



نمودار ۳. اثر ضد انقباضی غلظت‌های مختلف بیکوکولین بر انقباض کلرور پتاسیم۶۰ میلی‌مولار ($p<۰/۰۵$*،$n=۷$، *= در مقایسه با انقباض ناشی از کلرورپتاسیم).

۴) تأثیر بیکوکولین بر عملکرد موسیمول

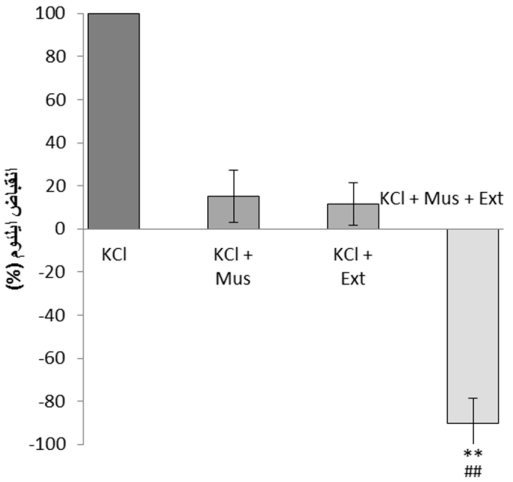
به منظور بررسی سلامت عملکرد آنتاگونیستی بیکوکولین و تأثیر آن بر عملکرد موسیمول این آزمایش انجام شد. نمودار ۴ نشان می‌دهد که در حضور بیکوکولین(۱۰میکرو مولار) تأثیر ضد انقباضی موسیمول(۲۵میکرو مولار) بر انقباض ناشی از کلرور پتاسیم کاملاً حذف شده و سطح انقباض به میزان قبل از افزودن موسیمول بازگشته است ($p<۰/۰۰۱$ ، $n=۷$).



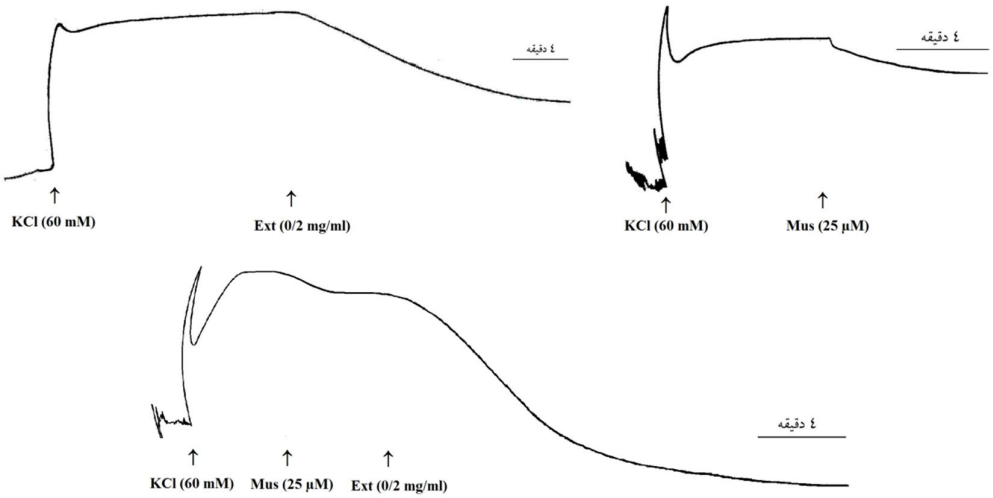
نمودار ٤. کاهش اثر ضد انقباضی موسیمول بر انقباض ایلئوم پس از انکوباسیون با بیکوکولین ($p<۰/۰۱$،$n=۷$، *= در مقایسه با اثر موسیمول بر انقباض). کلرور پتاسیم ٦٠، موسیمول (Mus: ۲۵میکرومولار)، بیکوکولین (Bic: ۱۰میکرومولار، ۳۰دقیقه)**

۵) تأثیر موسیمول بر عملکرد ضد انقباضی عصاره بذر جعفری

پس از ثبت انقباض ناشی از کلرورپتاسیم، عملکرد غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره بر آن نشان داده شد. سپس بافت به پس از شستشو و استراحت (۱۵ دقیقه)، مجدداً توسط کلرورپتاسیم منقبض شد. در سطح کفه انقباض، موسیمول(۲۵میکرو مولار) اضافه گردید و سپس در حضور آن، عصاره با غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مجدداً به حمام بافت اضافه شد(شکل ۱). نمودار ۵ نشان می‌دهد که موسیمول موجب تشدید عملکرد ضد انقباضی عصاره شده است ($p<۰/۰۱$، $n=۷$).



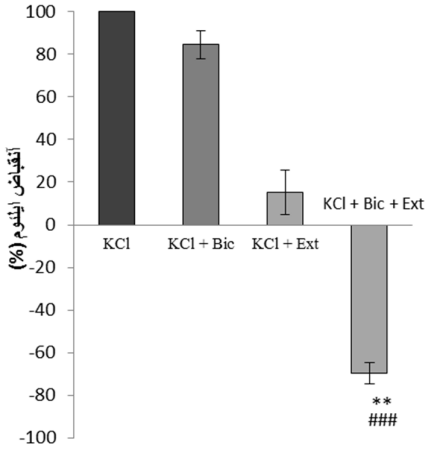
نمودار ۵. اثر ضد انقباضی غلظت عصاره جعفری بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم پس‌از قرار دادن بافت در معرض موسیمول ($n=۷$،$p<۰/۰۱$، *= در مقایسه با اثر موسیمول بر انقباض، #= در مقایسه با اثر عصاره بر انقباض). کلرور پتاسیم (KCl: ۶۰ میلی مولار)، عصاره (Ext: ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، موسیمول (Mus: ۲۵ میکرو مولار)



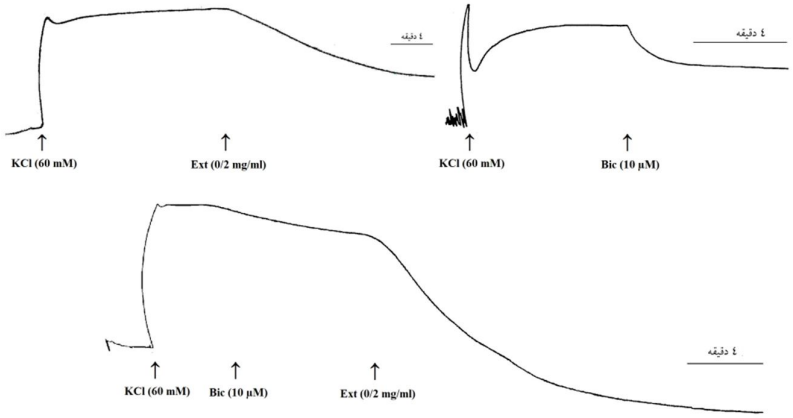
شکل ۱. ثبت حقیقی از اثر ضد انقباضی عصاره جعفری بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم در حضور موسیمول. کلرور پتاسیم (KCl: ۶۰ میلی مولار)، عصاره (Ext: ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، موسیمول (Mus: ۲۵ میکرو مولار)

۶) تأثیر بیکوکولین بر عملکرد ضد انقباضی عصاره بذر جعفری

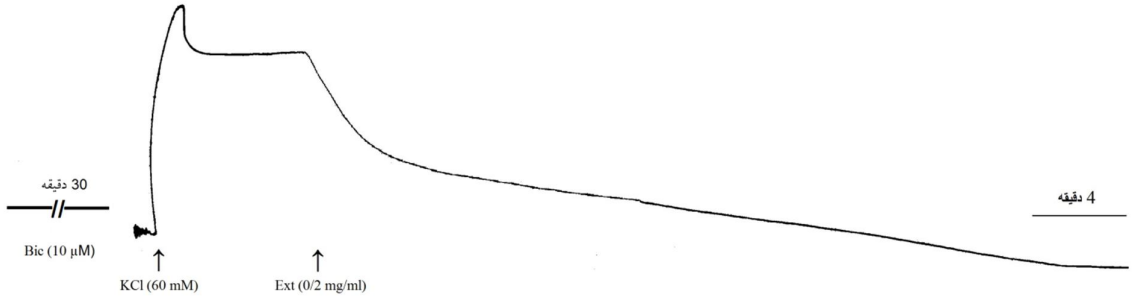
ابتدا انقباض ناشی از کلرورپتاسیم ثبت و عملکرد غلظت ۰/۲ عصاره بر آن ثبت گردید. پس از شستشو و استراحت(۱۵ دقیقه)، سپس مجدداً بافت توسط کلرورپتاسیم منقبض گردید. در سطح کفه انقباض بیکوکولین(۱۰میکرو مولار) به حمام اضافه شد و در حضور بیکوکولین عصاره با غلظت ۰/۲ مجدداً به حمام بافت افزوده شد(شکل ۲). نمودار ۶ نشان می‌دهد که بیکوکولین نیز مانند موسیمول موجب تشدید عملکرد ضد انقباضی عصاره شده است($n=۷$ ،$p<۰/۰۱$). در همین راستا تلاش شد تا عملکرد ضد انقباضی عصاره پس از انکوبه کردن بافت در بیکوکولین نیز مشخص گردد. بدین منظور، بافت به مدت ۳۰ دقیقه با بیکوکولین(۱۰ میکرو مولار) انکوبه و مجدداً بافت به ترتیب مورد تأثیر کلرورپتاسیم و عصاره قرار گرفت. ثبت حقیقی (شکل ۳) نشان می‌دهد که در این حالت نیز آنتاگونیزه کردن طولانی مدت(۳۰ دقیقه) گیرنده $GABA_A$ موجب تقویت تأثیر ضد انقباضی عصاره می‌گردد.



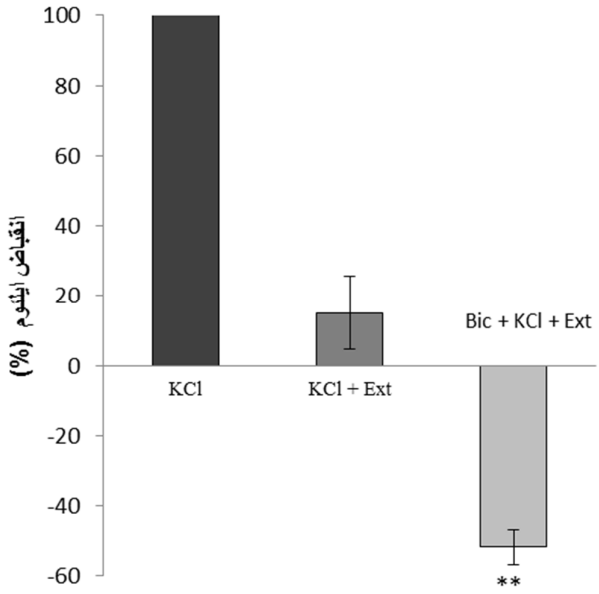
نمودار ٦. اثر ضد انقباضی عصاره بذر جعفری در حضور بیکوکولین بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم ($n=۷$،$p<۰/۰۱$،$p<۰/۰۰۱$ ،*= در مقایسه با اثر بیکوکولین بر انقباض، #= در مقایسه با اثر عصاره بر انقباض). کلرور پتاسیم (KCl: ٦٠ میلی مولار)، عصاره (Ext: ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، بیکوکولین (Bic: ۲۵ میکرو مولار)



شکل ۲. ثبت حقیقی اثر ضد انقباضی عصاره جعفری پس از افزودن بیکوکولین بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم. کلرور پتاسیم (KCl: ٦٠ میلی مولار)، عصاره (Ext: ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، بیکوکولین (Bic: ۲۵ میکرو مولار)



شکل ۳. ثبت حقیقی از اثر ضد انقباضی عصاره بذر جعفری پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون با بیکوکولین پیش از تحریک انقباض با کلرور پتاسیم. کلرور پتاسیم (KCl: ٦٠ میلی مولار)، عصاره (Ext: ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، بیکوکولین (Bic: ۱۰ میکرومولار)



نمودار ۷. اثر ضد انقباضی عصاره جعفری بر انقباض ایلئوم ناشی از کلرور پتاسیم پس از انکوباسیون بافت با بیکوکولین به مدت ۳۰ دقیقه ($n=7$، $^{**}p<0/01$، *= در مقایسه با اثر عصاره بر انقباض). کلرور پتاسیم (KCl: ٦٠ میلی مولار)، عصاره (Ext: ۰/۲ میلی گرم بر میلی لیتر)، بیکوکولین (Bic: ۱۰ میکرو مولار)

بحث

نتایج این تحقیق نشان داد عملکرد ضد انقباضی عصاره بذر جعفری نتیجه فعال شدن گیرنده $GABA_A$ نمی‌باشد. از نکات قابل توجه آن‌که تأثیر ضد انقباضی عصاره بذر جعفری تا زمانی تداوم خواهد داشت که عصاره در حمام بافت حضور دارد و لذا، بعد از شستشو و خروج عصاره از حمام، بافت مجدداً قابلیت اولیه انقباض خود را باز خواهد یافت. این نکته نشان می‌دهد که عملکرد ضد انقباضی عصاره در سطح خارجی بافت رخ داده و ماده یا مواد مؤثره عصاره به درون بافت نفوذ نمی‌کنند. از طرف دیگر در این تحقیق از کلرور پتاسیم به منظور تحریک و القاء انقباض استفاده شد. افزایش غلظت پتاسیم خارج سلولی (به طور مثال ۶۰ میلی‌مولار) با ممانعت از نشت طبیعی پتاسیم از داخل به خارج سلول‌های عضلانی موجب افزایش پتاسیم داخل سلول‌ها، دپولاریزاسیون سلول‌ها و در نهایت سبب فعال شدن کانال‌های کلسیمی وابسته به ولتاژ نوع L می‌گردد (۱۶، ۱۸ و ۱۹). وجود این نوع کانال‌های کلسیمی در عضلات صاف ایلئوم موش‌صحرایی به اثبات رسیده

است(۲۰). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که عصاره هیدروالکلی بذر جعفری سبب کاهش معنی‌داری در پاسخ انقباضی قطعات ایلئومی جدا شده موش‌صحرایی می‌شود(۱۵). پیشنهاد شده است موادی که بتوانند انقباض ناشی از کلرورپتاسیم را در عضله صاف مهار کنند، اثر خود را از طریق انسداد کانال‌های کلسیمی وابسته‌به‌ولتاژ نوع L به انجام می‌رسانند(۲۱). با این وجود اطلاعات دقیقی در زمینه مکانیسم عمل اثر ضد انقباضی عصاره جعفری وجود ندارد.

هم‌چنین تجربیات نویسندگان این مقاله نشان می‌دهد که استمرار حضور کلرور پتاسیم حتی پس از ۳۰ تا ۴۵ دقیقه موجب بروز خستگی و افت انقباض نمی‌گردد و لذا کاهش قدرت انقباض مشاهده شده در این تحقیق ناشی از عملکرد مواد افزوده شده به حمام بافت بوده و نتیجه خستگی عضله نبوده است(۱۵).

تنظیم عصبی حرکات گوارشی از طریق اعصاب داخلی و خارجی صورت می‌گیرد. سیستم عصبی انتریک(ENS) به عنوان اعصاب داخلی دستگاه گوارش شناخته شده است(۷). تمام نوروترانسمیترهایی که تاکنون در شبکه عصبی مرکزی شناخته شده‌اند، در شبکه انتریک نیز بیان می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به استیل‌کولین، نورآدرنالین، سروتونین، گلوتامات و گابا اشاره کرد(۲۲). گابا و آنزیم سازنده آن موسوم به گلوتامات اسید دکربوکسیلاز(GAD)، در برخی از نورون‌های انتریک روده کوچک وجود دارند (۸، ۹ و ۱۱). وجود گیرنده‌های GABA در روده باریک موش‌صحرایی با تراکم کاهشی به ترتیب از دئودنوم، ژژونوم و ایلئوم به اثبات رسیده است. تراکم این گیرنده در لایه‌های عضلانی طولی و حلقوی ایلئوم یکسان است که از این جنبه با بخش‌های دئودنوم و ژژونوم متفاوت می‌باشد(۲۳).

به‌طورکلی پذیرفته شده است که فعال‌سازی گیرنده $GABA_A$ نهایتاً منجر به فعال‌سازی نورون‌های غیرآدرنرژیک غیرکولینرژیک (NANC) می‌گردد(۱۲-۸). با توجه به نقش گابا در فعالیت‌های گوارشی از جمله ترشح، رفلکس انقباض و شل‌شدگی عضلات دیواره لوله گوارش، بررسی دخالت این نوروترانسمیتر در ایجاد انقباض توسط عوامل اسپاسموژن یا حتی القاء شل‌شدگی به واسط عوامل برطرف کننده اسپاسم حائز اهمیت می‌نماید. این امر به بهبود و توسعه‌ی تولید داروهای ضد اسپاسم جدید با پتانسیل و کارایی بیشتر کمک خواهد کرد.

فعال‌سازی این گیرنده در ایلئوم و کولون دیستال خوکچه هندی منجر به اثرات تحریکی شده که به واسطه رهاسازی استیل کولین صورت می‌گیرد. مشخص شده است که اهمیت فیزیولوژیک اثرات گابا، در ظهور آن‌ها وابسته به گونه حیوانی است(۸). نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که موسیمول(۱، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میکرومولار) از طریق فعال سازی گیرنده‌های $GABA_A$ باعث شل‌شدگی ایلئوم انقباض یافته با کلرور پتاسیم در موش صحرایی گردید. در سال ۱۹۸۷، کرانتیس و هاردینگ گزارش کردند که آگونیست‌های گیرنده $GABA_A$ منجر به ظهور اثرات دوگانه شل‌شدگی و انقباضی می‌شوند، که دامنه و نوع پاسخ وابسته به محل مورد مطالعه است. آنان اشاره کرده‌اند که تمام نواحی روده موش‌صحرایی در پاسخ به گابا به عنوان آگونیست گیرنده $GABA_A$ شل می‌شود. با این‌وجود ژژونوم و ایلئوم نوعی پاسخ انقباضی کولینرژیک نیز نشان می‌دهند. نتایج ایشان پیشنهاد می‌کند که گابا در ایلئوم اثر انقباضی بارزتری نسبت به اثر شل‌کنندگی به نمایش می‌گذارد، در حالی که اثر شل‌کنندگی در دئودنوم از سایر بخش‌های روده کوچک بارزتر است(۲۴). بر اساس تحقیقات انجام شده این پاسخ‌های انقباضی می‌تواند به واسطه تحریک رهاسازی استیل‌کولین(۲۴) و یا مهار سنتز NO و کاهش شل‌شدگی ناشی از فعالیت NANC در ایلئوم صورت گیرد (۲۵).

نکته حائز اهمیت این است که اثر موسیمول و گابا در ایلئوم وابسته به غلظت است. پیش از این نیز گیوتی و همکاران نشان دادند که گابا در دوز پایین دارای اثر شل کنندگی و در دوزهای بالاتر اثر دوگانه انقباضی- شل کنندگی دارد(۲۶). پیش از این نتایج تحقیق کزیم اثر انقباضی وابسته به غلظت موسیمول را در دئودنوم و ایلئوم

موش‌صحرایی نشان داده است(۲۷). اثر انقباضی که در نتایج کرانتیس گزارش شد در دوزهای بالاتر(۳۰ تا ۵۰۰ میکرو مولار) بوده است. در حالی که غلظت‌های به کار رفته از موسیمول در مطالعه حاضر دوزهای پایین‌تری(۱ تا ۱۰۰ میکرومولار) را شامل می‌شود(۲۴). از این رو، به نظر می‌رسد که افزایش دوز دارو می‌تواند اثر شل‌کنندگی آن را به اثر انقباضی تبدیل کند. بنابراین اثر شل‌کنندگی مشاهده شده از موسیمول در این مطالعه می‌تواند ناشی از ماهیت وابسته به دوز بودن این دارو به عنوان آگونیست گابا باشد.

در هر حال نتایج قابل تأملی در رابطه با اثرات گابا در روده وجود دارد. به عنوان مثال، ثابت شده است که گابا اثر شل‌کنندگی خود در دئودنوم موش‌صحرایی را طی فعال‌سازی نورون‌های NANC موجود در دیواره روده القاء می‌کند(۲۸). اما همان طور که پیش از این نیز اشاره شد، کزیم انقباض وابسته به غلظت گابا و موسیمول را در دئودنوم و ایلئوم موش صحرایی گزارش کرده است(۲۷).

در مرحله‌ای از این مطالعه، بیکوکولین نیز انقباض ناشی از کلرورپتاسیم در ایلئوم را کاهش داد. انکوباسیون بافت با بیکوکولین(۳۰ دقیقه) موجب مهار تقریباً کامل اثر موسیمول در حضور بیکوکولین گردید. این امر بر صحت اثر بیکوکولین بر فعالیت انقباضی بافت و به نوبه آن اثر شل‌کنندگی موسیمول صحه می‌گذارد. بدین ترتیب می توان اثر شل‌کنندگی مشاهده شده توسط بیکوکولین بر انقباض ایجاد شده با کلرور پتاسیم و هم‌چنین تشابه اثر آن با موسیمول علی‌رغم وجود رابطه آگونیست و آنتاگونیستی این دو دارو را صحیح دانست.

پیش از این نیز، تشابه اثر آگونیست و آنتاگونیست گیرنده‌های $GABA_A$ گزارش شده است. در سال ۲۰۰۱ دولین با بررسی اثر گابا در نوعی خارپوست(اکینودرم) عنوان کردند که گیرنده‌های $GABA_A$ در اکینودرم می‌تواند واسطه پاسخ‌های تحریکی گابا باشد. در این بررسی کاربرد آگونیست و آنتاگونیست این گیرنده اثری مشابه بر فعالیت انقباضی عضله طولی اعمال کرده و موجب افزایش انقباض شدند. اگر چه مطابق با اصول فارماکولوژی سنتی، آگونیست و آنتاگونیست اثرات معکوسی دارند، اما دولین با توجه به یافته‌های خود بیان داشته که تشابه اثر موسیمول و بیکوکولین بر فعالیت انقباضی عضله می‌تواند از موارد نادر باشد(۲۹). نتایج بررسی‌های اسپربر و همکاران طی تزریق موسیمول و بیکوکولین به جسم سیاه جهت بررسی اثر گیرنده $GABA_A$ در بروز تشنج در موش‌صحرایی نیز حاکی از اثر مشابه آگونیست و آنتاگونیست گیرنده مذکور در تسهیل حمله صرع پس از تزریق به درون جسم سیاه بود(۳۰). لذا به نظر می‌رسد که آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌ها در همه موارد الزاماً عملکرد متضادی را از خود نشان نمی‌دهند(۳۱).

در بخش دیگری از آزمایش، عصاره جعفری در دو پروتکل مجزا بلافاصله پس از ثبت اثر کاهنده موسیمول(۲۵ میکرومولار) و بیکوکولین(۱۰ میکرومولار) بر پاسخ انقباضی کلرورپتاسیم، به حمام بافت اضافه شد. در اینجا نیز آگونیست و آنتاگونیست $GABA_A$ اثرات افزاینده مشابهی بر فعالیت ضد انقباضی عصاره(غلظت ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) داشتند. از طرف دیگر، انکوباسیون بافت با بیکوکولین(۳۰ دقیقه) نیز نتوانست اثر شل‌کنندگی عصاره را کاهش دهد و حتی بر خلاف انتظار، فعالیت ضد انقباضی عصاره در حضور بیکوکولین تشدید شد. مقایسه آماری اثر شل‌کنندگی عصاره بذر جعفری در دو حالت تجویز بیکوکولین پیش و پس از تحریک بافت با کلرور پتاسیم نشان داد که زمان تجویز بیکوکولین به حمام بافت تأثیری بر میزان شل‌کنندگی عصاره نداشته است. براساس نتایج حاصل از این مطالعه، می‌توان نتیجه گرفت که این گیرنده در فعالیت ضد انقباضی عصاره بذر جعفری دخالتی ندارد.

نتیجه گیری

با توجه به اثر مشاهده شده از عصاره بذر جعفری در حضور بیکوکولین به عنوان آنتاگونیست گیرنده $GABA_A$ و ناتوانی بیکوکولین در حذف و حتی کاهش فعالیت ضد انقباضی عصاره، به نظر می‌رسد که گیرنده

$GABA_A$ دخالتی در فعالیت ضد انقباضی عصاره بذر جعفری نداشته باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل از کار پایان نامه دانشجویی با عنوان "نقش گیرنده $GABA_A$ در فعالیت ضد انقباضی عصاره هیدروالکلی بذر جعفری در ایلئوم موش صحرایی" می‌باشد. بدین وسیله محققان از حمایت مالی دانشگاه شهید چمران اهواز و از همکاری آقای دکتر سید نژاد در شناسایی علمی گیاه جعفری صمیمانه تشکر می‌نمایند. مراحل مختلف آزمایش در آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشکده علوم دانشگاه شهید چمران و نیز مرکز تحقیقات فیزیولوژی دانشگاه جندی شاپور انجام پذیرفته است.

منابع

1. Ameer OZ, Salman IM, Siddiqui MJA, Yam MF, Sriramaneri RN, Sadikun A, et al. In vitro cholinomimetic effect of *Loranthus Ferrugineus* in isolated guinea pig ileum. J Acupunct Meridian Stud 2009; 2: 288-293.

2.Kamalraj R, Devdass G. Antispasmodic studies on leaf extract of *Erythrina indica* Lam. Inter J Res Ayu Pharm 2011; 2: 1380-1382.

3. Moazedi AA, Mirzaie DN, Seyyednejad SM, Zadkarami MR, Amirzargar A. spasmolytic effect of *Petroselinum crispum* (parsley) on rat's ileum at different calcium chloride concentration. Pak J Biol Sci 2007; 10: 4036-4042.

4.Mirzaie Damabi N, Moazedi AA, Seyyednejad SM. The role of α- and β-adrenergic receptors in the spasmolytic effects on rat ileum of *Petroselinum crispum* Latifolum (parsley). Asian Pac J Trop Med 2010; 3: 866-870.

5.Al-Howiriny T, Al-Sohaibani M, El-Tahir K, Rafatullah S. Prevention of experimentally-induced gastric ulcers in rats by an ethanolic extract of parsley *Petroselinum crispum*. Am J Chin Med 2003; 31: 699-711.

6.Ozsoy-Sacan O, Yanardag R, Orak H, Ozgey Y, Yarat A, Tunali T. Effects of parsley (*Petroselinum crispum*) extract versus glibornuide on the liver of streptozotocin-induced diabetic rats. J Ethnopharmacol 2006; 104: 175-181.

7.Hansen MB. Neurohumoral control of gastrointestinal motility. Physiol Res 2003; 52: 1-30.

8.Bayer S, Crenner F, Aunis D, Angel F. Effects of GABA on circular smooth muscle spontaneous activities of rat distal colon. Life Sci 2002; 71: 911-925.

9.Krantis A. GABA in the mammalian enteric nervous system. News Physio Sci 2000; 15: 284-290.

10.Bayer S, Jellali A, Crenner F, Aunis D, Angel F. Functional evidence for a role of GABA receptors in modulating nerve activities of circular smooth muscle from rat colon in vitro. Life Sci 2003; 72: 1481-1493.

11.Rotondo A, Serio R, Mule F. Functional evidence for different roles of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptors in modulating mouse gastric tone. Neuropharmacology 2010; 58: 1033-1037.

12.Zizzo MG, Mule F, Serio R. Functional evidence for GABA as modulator of the contractility of the longitudinal muscle in mouse duodenum: role of $GABA_A$ and $GABA_C$ receptors. Neuropharmacology 2007; 52: 1685-1690.

13.Johnston GAR. $GABA_A$ receptor channel pharmacology. Curr Pharm Des 2005; 11: 1867-1885.

14.Korpi ER, Grunder G, Luddens H. Drug interactions at $GABA_A$ receptors. Prog Neurobiol 2002; 67: 113-159.

15.Savary F, Moazedi AA, Gharibnaseri MK, Zadkarami MR. The role of nitric oxide and opioid receptors in antispasmodic activity of *Petroselinum crispum* (parsley) seed extract on rat ileum. KAUMS Journal (Feyz). 2015; 18 (6): 531-538. [Persian]

16.Moazedi AA, Dabir N, Gharib Naseri MK, Zadkarami MR. The role of opioid and α-adrenergic receptors in the ileal antispasmodic activity of *Ruta chalepensis* extract. J Biol Sci 2010; 10: 779-784.

17.Gharib Naseri MK, Heidari A. Antispasmodic effect of *Anethum graveolens* fruit extract on rat ileum. Int J Pharmacol 2007; 3: 260-264.

18.Ventura-Martinez R, Rivero-Osorno O, Gomez C, Gonzalez-Trujano ME. Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. J Ethnopharmacol 2011; 137: 1528-1532.

19.Ahangarpour A, Heidari R, Abdolahzadeh M, Oroojan AA. Antispasmodic effects of

aqueous and hydroalcoholic *Punica granatum* flower extracts on the uterus of non-pregnant rats. J Reprod Infertil 2012; 13: 138-142.
20.Gharib Naseri MK, Adibpour N, Namjooyan F, Rezaee S, Shahbazi Z. Spasmolytic effect of *Stachys lavandulifolia* Vahl. crude methanolic extract and fractions on rat ileum. Iran J Pharm Res 2011; 10: 307-312.
21.Gilani AH, Aziz N, Khurram JM, Chaudhary KS, Iqbal A. Bronchodilator, spasmolytic and calcium antagonist activities of *Nigella sativa* seeds (Kalonji): a traditional herbal product with multiple medicinal uses. J Pak Med Assoc 2001; 51(3): 115-120.
22.Serio R, Zizzo MG, Mastropaolo M. The enteric nervous system: New developments and emerging concepts. Malta Med J 2011; 23. (Review)
23.Napoleone P, Cavallotti C, de Vincentis G, Amenta F. Autoradiographic Localization of the $GABA_A$-receptor agonist (^3H)-muscimol in the rat intestinal musculature. Pharmacology 1991; 42:103–110.
24.Krantis A, Harding RK. GABA-related actions in isolated in vitro preparations of the rat small intestine. Eur J Pharmacol 1987; 141: 291-298.
25.Kurjak M, Fichna J, Harbarth J. Effect of GABA-ergic mechanisms on synaptosomal NO synthesis and the nitrergic component of NANC relaxation in rat ileum. Neurogastroenterol Motil 2011; 23: e181-e190.
26.Giotti A, Luzzi S, Spagnesi S, Zilletti L. $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor-mediated effects in guinea-pig ileum. Br J Pharmacol 1983, 78: 469-478.
27.Kesim SM. The effects of GABA in isolated rat duodenum and ileum. J ExpClin Med 1999; 16: 187-199.
28.Maggi CA, Manzini S, Meli A. Evidence that $GABA_A$ receptors mediate relaxation of rat duodenum by activating intramural nonadrenergic-noncholinergic neurons. J Auton Pharmacol 1984; 4: 77-85.
29.Devlin CL. The pharmacology of γ-aminobutyric acid and acetylcholine receptors at the echinoderm neuromuscular junction. J ExpBiol 2001; 204: 887-896.
30.Sperber EF, Wong BY, Wurpel JND, Moshe SL. Nigral infusions of muscimol or bicuculline facilitates seizures in developing rats. Brain Res 1987; 37: 243-250.
31.Sabzehkhah, S, Vaezi GhH, Bakhtiarian A, Salarian A, Zare Haghighi M. The effect of D2 agonist versus D2 antagonist on the fear behavior in the male rats using plus-maze method: the prospective study. Tehran Univ Med J 2009; 67 (8): 535-541. (Persian