

# تداخل اثر بیس فنول آ و یادگیری احترازی غیر فعال بر توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته‌های اکامبنس و پوتامن دمی در موش صحرائی نر

شیوا برومند، مهناز طاهریانفرد\*

گروه فیزیولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱/۱۷

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۷/۴

## چکیده

زمینه و هدف: قرار گرفتن در معرض بیس فنول آ (BPA) افزایش قابل توجهی در سطوح mRNA گیرنده D1 دوپامین در کل مغز ایجاد می‌کند. لذا هدف تحقیق حاضر بررسی اثر BPA بر توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته‌های اکامبنس و پوتامن دمی در مغز موش‌های صحرائی نر در شرایط بدون یادگیری و همراه با یادگیری بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۳۰ سر موش صحرائی نر با وزن ۲۲۰-۳۰۰ گرم به ۶ گروه ۵ تایی تقسیم شدند. گروه‌های آزمایشی BPA در دو دوز ۵ و ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی استفاده شد. گروه‌های شاهد روغن کنجد را به عنوان حلال PBA، به صورت گاوآذ دریافت کردند. تست یادگیری و حافظه احترازی غیر فعال به وسیله شاتل باکس انجام شد. بررسی توزیع گیرنده D1 دوپامین به وسیله تکنیک ایمنوهیستوشیمی انجام گردید. جهت مقایسه رنگ در نمونه‌ها از نرم‌افزار تحلیل‌گر تصویر (Image Analyzer) و همچنین برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه و تست تشخیصی توکی استفاده شد.

یافته‌ها: داده‌های این پژوهش نشان داد که BPA در هر دو دوز در مقایسه با گروه شاهد باعث کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته اکامبنس در موش‌های صحرائی نر همراه با یادگیری شد. BPA در هر دو دوز در مقایسه با گروه شاهد ۱ و ۲ باعث کاهش معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) در توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته پوتامن دمی در موش‌های صحرائی نر بدون یادگیری و همراه با یادگیری شد. توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته‌های اکامبنس و پوتامن در گروه شاهد ۲ به طور معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بیش از شاهد ۱ بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاضر BPA باعث اختلال در توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته‌های اکامبنس و پوتامن شد، در حالی که BPA در موش‌های آموزش دیده اثر قابل توجهی بر توزیع گیرنده D1 دوپامین در موش‌هایی که در معرض BPA قرار داشتند، نداشت.

واژه‌های کلیدی: هسته‌های اکامبنس و پوتامن دمی، یادگیری احترازی غیر فعال، شاتل باکس، گیرنده D1 دوپامین، موش صحرائی

\* نویسنده مسئول: مهناز طاهریانفرد، شیراز، دانشگاه شیراز، گروه فیزیولوژی ورزش

Email: taherian2001@yahoo.com



## مقدمه

می تواند در مدت طولانی صورت گرفته باشد. BPA باعث اختلال در تقویت طولانی مدت (LTP) و تضعیف طولانی مدت (LTD) در قسمت پشتی جانبی استریاتوم به وسیله تغییر در عملکرد گیرنده دوپامین در موش های صحرایی نر می شود (۵). از طرفی BPA به طور مستقیم تکامل سیستم دوپامینرژیک مرکزی را می تواند تحت تأثیر قرار دهد، آزمایش های نشان می دهد که BPA باعث افزایش در دانسیته ی گیرنده D1 در استریاتوم می شود و به گیرنده ترانس میتر دوپامین باند می شود و در معرض قرار گرفتن مزمن با BPA باعث نوسانات در گیرنده دوپامین می شود. دوپامین نقش مهمی در پروسه های یادگیری و حافظه از طریق دو دسته از گیرنده های جفت شده به G protein شامل؛ D1 (D1, D5) و D2 (D2, D3, D4) در سه ناحیه مغزی چون استریاتوم هیپوکامپ و قشر پری فرونتال مغز برعهده دارد (۶). در معرض قرار گرفتن با BPA در دوران جنینی و بعد از آن باعث تغییر در انتقالات نورونی از طریق گیرنده دوپامینرژیک می شود (۷). در هیپوکامپ دوپامین به نظر می رسد نقش تقویت کننده بر یادگیری و حافظه دارد (۸). فقدان دوپامین در قشر پری فرونتال مغز باعث اختلال حافظه کاری در موش صحرایی و میمون شده است. مکانیسم های پایه در فعال شدن (LTP) و (LTD) به وسیله دو دسته گیرنده D1 و D2 تعدیل می شود (۹). یادگیری احترازی غیرفعال، نوعی فعالیت یادگیری ارتباطی وابسته به گیرنده D1 در هیپوکامپ محسوب می شود (۱۰).

زنو استروژن ها، استروژن های سنتزی هستند که به صورت گسترده در ترکیب های صنعتی استفاده می شوند و علی رغم این که از لحاظ شیمیایی با استروژن های طبیعی ساخته شده به وسیله سیستم غدد داخلی بدن متفاوت هستند، اما دارای اثرات استروژنی در موجودات زنده می باشند. از جمله زنو استروژن های محیطی بیس فنول آ (BPA) می باشد. این ماده شیمیایی در ساخت پلاستیک های پلی کربناتی، اپوکسی رزین، برخی از مواد دندان پزشکی و به عنوان ماده غیر پلیمری اضافه شونده به پلاستیک ها استفاده می شود (۱). BPA به علت تشابه ساختاری می تواند جایگزین استروئید های طبیعی بدن شود و ساخت عملکرد هورمون های استروئیدی بدن را مختل نماید. مدت ها تصور می شد که این اتصال فقط در غلظت های بسیار بالا صورت می پذیرد، اما اخیراً مشخص شده که دوز پایین BPA هم اثرات سوء را به جا می گذارد (۲). یادگیری و حافظه از موضوعاتی است که بیشترین مطالعه در علوم اعصاب را به خود اختصاص داده و برای فهمیدن مکانیسم های سلولی و مولکولی آن شیوه های متفاوتی به کار گرفته شده است (۳). حافظه حاصل شکل پذیری سیناپسی است، از این رو شکل پذیری سیناپسی به عنوان اولین مرحله در ساخت مدل یادگیری و حافظه شناخته شده است (۴). در واقع توانایی مغز به سازماندهی مجدد مسیرهای عصبی بر اساس تجارب جدید است و

با توجه به اینکه، BPA باعث اختلالاتی در سیستم دوپامینرژیک می‌شود و از طرفی دوپامین نیز در پروسه یادگیری و حافظه نقش مهمی دارد، لذا هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر BPA بر توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته‌های اکامبنس و پوتامن دمی در مغز موش‌های صحرایی نر با و بدون یادگیری احترازی غیر فعال بود.

### روش بررسی

مطالعه حاضر از نوع تجربی است. در این تحقیق از ۳۰ سر موش صحرایی نر از نژاد اسپراگ دولی با سن تقریبی ۱۸ هفته و وزن ۲۲۰-۳۰۰ گرم استفاده گردید. کلیه حیوانات ۲ هفته قبل از شروع تحقیق به منظور سازگاری با شرایط محیط در قفس‌های پلکسی گلاس استاندارد نگهداری شدند. غذا و آب آزادانه در اختیار آن‌ها قرار داشت. حیوانات در درجه حرارت کنترل شده ( $22 \pm 2$ ) نگهداری شدند و شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. حیوانات در ۶ گروه ۵ تایی مورد بررسی قرار گرفتند؛ گروه اول، شاهد ۱، این گروه حجم مشابه گروه‌های آزمایشی روغن کنجد به عنوان حلال BPA را به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی به وسیله گاواژ دریافت کردند. گروه دوم، شاهد ۲، این گروه حجم مشابه گروه‌های آزمایشی روغن کنجد حلال BPA را به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی به وسیله گاواژ دریافت کردند و سپس از روز ۱۶ به مدت ۵

روز تست یادگیری احترازی غیر فعال انجام شد. گروه سوم، آزمایشی ۱، این گروه BPA را در دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی به وسیله گاواژ دریافت کردند. گروه چهارم، آزمایشی ۲، این گروه BPA را در دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی به وسیله گاواژ دریافت کردند. گروه پنجم، آزمایشی ۳، این گروه BPA را در دوز ۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی به وسیله گاواژ دریافت کردند و سپس از روز ۱۶ به مدت ۵ روز تست یادگیری احترازی غیر فعال انجام شد. گروه ششم، آزمایشی ۴، این گروه BPA را در دوز ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۱۵ روز به صورت خوراکی به وسیله گاواژ دریافت کردند و سپس از روز ۱۶ به مدت ۵ روز تست یادگیری احترازی غیر فعال انجام شد.

در تمام گروه‌های بدون یادگیری، پس از اتمام دوره گاواژ و در موش‌هایی که تست یادگیری داشتند پس از آخرین مرحله یادگیری توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته‌های اکامبنس و پوتامن دمی به وسیله روش ایمنوهیستوشیمی بررسی شد. همچنین پس از اتمام دوره گاواژ، بلافاصله مرحله القاء یادگیری احترازی غیر فعال به وسیله دستگاه شاتل باکس آغاز شد. القاء یادگیری احترازی غیر فعال

از ۱۲۰ ثانیه تأخیر می کرد، از آزمایش حذف می شد. روز سوم جهت یادگیری، مشابه روز دوم انجام گرفت و روز چهارم جهت تثبیت حافظه، مانند روز دوم اما به موش شوک وارد نشد و فقط مدت زمان حضور موش در ناحیه روشن ثبت گردید. روز پنجم به عنوان بقاء حافظه، مشابه روز چهارم انجام شد. در روزهای یادگیری، تثبیت حافظه و بقای حافظه در صورتی که حیوان بیش از ۱۲۰ ثانیه از ورود به ناحیه تاریک احتراز می کرد، به عنوان معیار انجام کامل یادگیری و احتراز کامل در نظر گرفته شد.

۲۴ ساعت بعد از پایان آخرین مرحله از تست یادگیری، هر حیوان مورد مطالعه با تزریق داخل صفاقی داروی بیهوشی تیوپنتال سدیم ۱۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بیهوش گردید. سپس برای افزایش میزان فیکس شدن بافت مغز، فرمالین ۱۰ درصد بافره به آرامی و با دقت به قلب حیوان تزریق شد. بلافاصله پس از مرگ سر جدا و مغز به صورت کاملاً سالم خارج شد. بلافاصله مغز در فرمالین ۱۰ درصد بافره و پس از آن در فرمالین ۴ درصد بافره قرار گرفت.

نمونه های مخ جهت بررسی هسته های اکامبنس و پوتامن درون دستگاه پردازشگر اتوماتیک قرار داده شد. اساس کار این دستگاه عبور دادن بافت از الکل های با درجات الکی افزایشنده (از الکل ۷۰ درصد به ۸۰ و ۹۰ و سپس به الکل مطلق) است تا آبگیری از

در حیوان مورد مطالعه شامل ۵ روز و در هر روز یک جلسه می باشد. روز اول جهت آشنایی با دستگاه، حیوانات به طور جداگانه و به مدت ۲ دقیقه جهت سازش پذیری و آشنایی با دستگاه شاتل باکس در آن قرار داده شدند. در این حالت دریچه بین دو محفظه تاریک و روشن باز بوده و حیوانات می توانستند آزادانه و بدون آن که شوکی به پای آنها وارد شود، بین دو محفظه رفت و آمد کنند. این سازش پذیری ۳۰ دقیقه بعد هم تکرار شد. روز دوم به عنوان تأخیر اولیه، دکتور دستگاه، بر اساس شدت شوک ۰/۶ میلی آمپر، زمان تأخیر در شوک دهی یک ثانیه و زمان شوک دهی نیز یک ثانیه تنظیم شد. سپس حیوانات به طور جداگانه و به آرامی در منتهی الیه ناحیه روشن و در سمت مخالف دریچه قرار داده شدند. زمانی که حیوان طوری به ناحیه تاریک وارد می شد که هر ۴ پای آن روی میله های فلزی قرار می گرفت، درب کشویی بسته شده و با بسته شدن درب کلیدی که در گوشه پایین سمت راست ناحیه روشن دریچه تعبیه شده بود فعال شده و شوک الکتریکی به کف پای حیوان وارد می شد و به وسیله دستگاه مدت زمان حضور موش در ناحیه روشن، ثبت می گردید. پس از پایان شوک دهی، حیوانات بلافاصله از دستگاه خارج شده و در قفس های خود قرار می گرفتند. در جلسه اول و دوم از یادگیری در صورتی که حیوان برای ورود به ناحیه تاریک بیش

بافت صورت گرفته و واکنش‌های اضافی درون سلول متوقف شود. سپس دستگاه نمونه‌ها را به زایلول (برای شفاف سازی) و سپس به پارافین (جهت استحکام بافت) منتقل می‌کند. زمان لازم حدود ۱۷/۵ ساعت در نظر گرفته شد. در این مرحله نمونه در قالب‌های مخصوص قرار داده شده و با اضافه کردن پارافین مذاب به آنها (با دمای ذوب حدود ۵۶ درجه)، بلوک‌هایی برای برش‌گیری تهیه شد. از بلوک‌های پارافینی به وسیله میکروتوم، برش‌های سریالی به ضخامت ۴ میکرون گرفته شد، سپس روی لام آغشته به چسب پلی‌الایزین قرار داده شدند.

روش ایمنوهیستوشیمی برای شناسایی و میزان توزیع پروتئین‌های اختصاصی از جمله گیرنده نروترانسمیترهای مغزی می‌باشد. در این روش ابتدا اسلایدها در زایلول غلیظ جهت پارافین زدایی قرار گرفتند. اسلایدها در الکل‌های نزولی (۱۰۰-۹۶-۷۰ درصد) جهت آبدهی بافت‌ها و سپس در آب مقطر به مدت ۱-۲ دقیقه تا آب‌گیری بافت‌ها کامل شود. پس از شستشو با بافر PBS، اسلایدها در آب اکسیژنه ۳ درصد سرد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس با بافر PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو و اسلایدها در بافر سیترات با pH=۶ قرار داده شدند. پس از آن اسلایدها در آب ۱۰۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفته و سپس سرد شدند و بعد از آن با بافر PBS به مدت ۵ دقیقه شستشو و دور نمونه‌ها با قلم داکو خط کشیده شد و سرم بز ۱۰ درصد به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به

مدت ۲۰ دقیقه به نمونه‌ها اضافه شد. بر روی نمونه‌ها آنتی‌بادی اولیه (آنتی بادی علیه گیرنده D1 دوپامین تهیه شده از شرکت ابکم انگلیس) به رقت ۱/۱۰۰۰ و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر ریخته می‌شود، اسلایدها در ظرف مرطوب درب‌دار یک شب در یخچال گذاشته می‌شوند. اسلایدها در دو نوبت ۱۰ دقیقه‌ای در محلول بافر فسفات گذاشته شده و بر روی نمونه‌ها آنتی‌بادی ثانویه (تهیه شده از شرکت داکو دانمارک) به مدت ۳۰ دقیقه ریخته شد. ۲ سی سی Dab (تهیه شده از شرکت داکو دانمارک) و یک قطره کروموژن به مدت ۳-۵ دقیقه در ظرف مرطوب، درب دار بر اسلایدها ریخته و با بافر PBS به مدت ۵ دقیقه و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. نمونه‌ها در همتوکسیلین برای رنگ‌آمیزی هسته‌ها به مدت ۵-۸ ثانیه قرار و با آب معمولی شستشو و نمونه‌ها به مدت چند ثانیه در آب آمونیاک برای از بین بردن رنگ‌های اضافی و سپس در آب مقطر قرار و بعد نمونه‌ها در الکل‌های صعودی (۹۰-۹۶-۱۰۰ درصد) قرار داده شدند. پس از بیرون آوردن نمونه‌ها از زایلول بر روی آنها چسب انتالن اضافه شده و بر روی آنها لامل گذاشته می‌شود به طوری که حباب هوا در زیر لامل تشکیل نشود. پس از خشک شدن نمونه‌ها آماده بررسی می‌باشد. پس از تهیه کلیه مقاطع بافتی و مطالعه آنها در زیر میکروسکوپ نوری، از مقاطع بافتی مورد نظر فوتومیکروگراف تهیه شد. برای این منظور از دوربین مخصوصی که روی میکروسکوپ تعبیه شده و به

هر دو دوز در گروه‌های بدون یادگیری اثری بر توزیع گیرنده D1 دوپامین در مقایسه با شاهد بدون یادگیری نداشت. مصرف BPA در دو دوز ۵ و ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز همراه با یادگیری باعث کاهش معنی‌داری ( $p=0/01$ ) در توزیع گیرنده D1 دوپامین در مقایسه با گروه شاهد همراه با یادگیری شد. در مقایسه گروه‌های همراه با یادگیری و بدون یادگیری توزیع گیرنده D1 دوپامین، گروه شاهد با یادگیری در مقایسه با شاهد بدون یادگیری افزایش معنی‌داری ( $p=0/004$ ) داشت. از طرفی در دو غلظت BPA توزیع گیرنده D1 دوپامین در گروه با یادگیری در مقایسه با گروه بدون یادگیری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (نمودار و تصویر ۱).

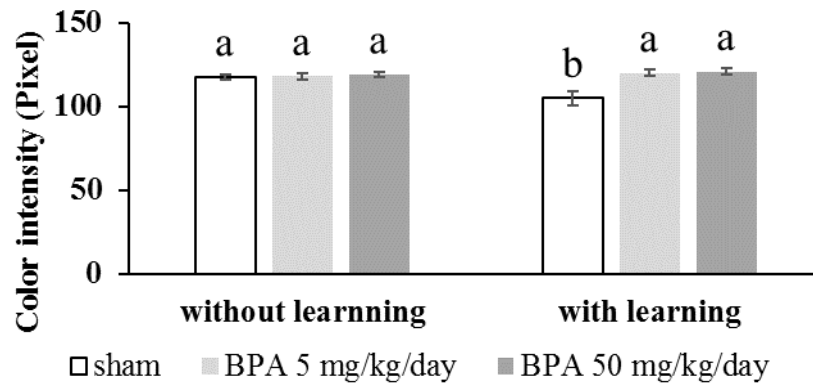
مصرف خوراکی BPA در دو دوز باعث کاهش معنی‌داری ( $p=0/004$ ) در توزیع گیرنده D1 دوپامین در مقایسه با شاهد بدون یادگیری در ناحیه هسته پوتامن می‌شد. همچنین مصرف BPA در هر دو دوز مورد استفاده همراه با یادگیری کاهش معنی‌داری ( $p=0/01$ ) در توزیع گیرنده D1 دوپامین در مقایسه با شاهد همراه با یادگیری داشت. در مقایسه گروه‌های همراه با یادگیری و گروه‌های بدون یادگیری کاهش معنی‌داری ( $p=0/01$ ) بین شاهد با یادگیری در مقایسه با شاهد بدون یادگیری وجود دارد. از طرفی در غلظت بالا و پایین BPA توزیع گیرنده D1 دوپامین در گروه با یادگیری در مقایسه با گروه بدون یادگیری اختلاف معنی‌داری نداشت (نمودار و تصویر ۲).

وسیله یک کابل USB به رایانه اتصال می‌یابد، استفاده گردید. فتومیکروگرافی با عدسی  $\times 40$  انجام شد. از آنجا که عدسی چشمی نیز تصاویر را ۱۰ برابر می‌کند، بنابراین بزرگنمایی واقعی با این عدسی چشمی  $\times 400$  خواهد بود. به منظور تعیین میزان تیرگی رنگ در تصاویر گرفته شده، از نرم افزار تحلیل‌گر تصویر استفاده شد، در این برنامه میزان رنگ قهوه‌ای را بر اساس سه ویژگی شدت (Intensity)، رنگ (Hue) و اشباع پذیری (Saturation) مورد بررسی و برنامه‌آوردی را بطور میانگین می‌دهد که این اعداد با توزیع گیرنده نسبت عکس داشت و هر چه میزان بیان گیرنده بیشتر بود، رنگ تیره‌تر و عدد کوچکتر بود و برعکس، سپس اعداد در گروه‌های مختلف به برنامه آماری منتقل و آنالیز آماری انجام گردید.

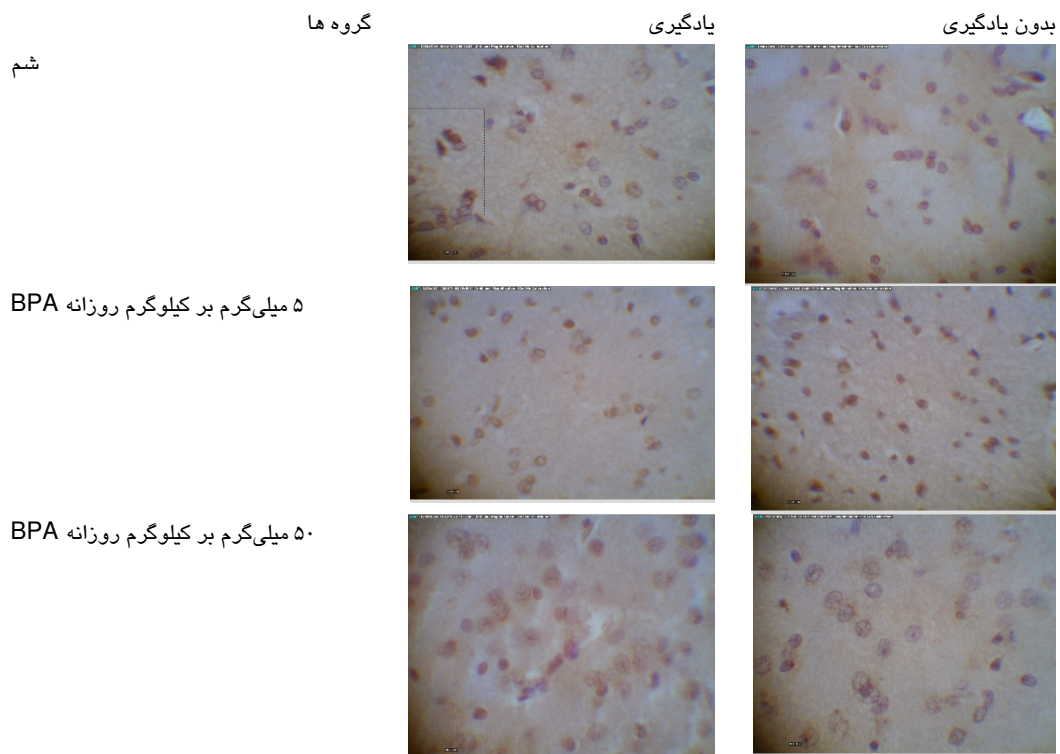
داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست توکی تجزیه و تحلیل شدند.

#### یافته‌ها

در این تحقیق، اثر BPA در دوزهای ۵ و ۵۰ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن در روز به مدت ۱۵ روز بر تراکم گیرنده D1 دوپامین در هسته‌های اکامبنس و پوتامن می‌در موش‌های بدون یادگیری و موش‌هایی که آموزش دیده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. در هسته اکامبنس مصرف خوراکی BPA در

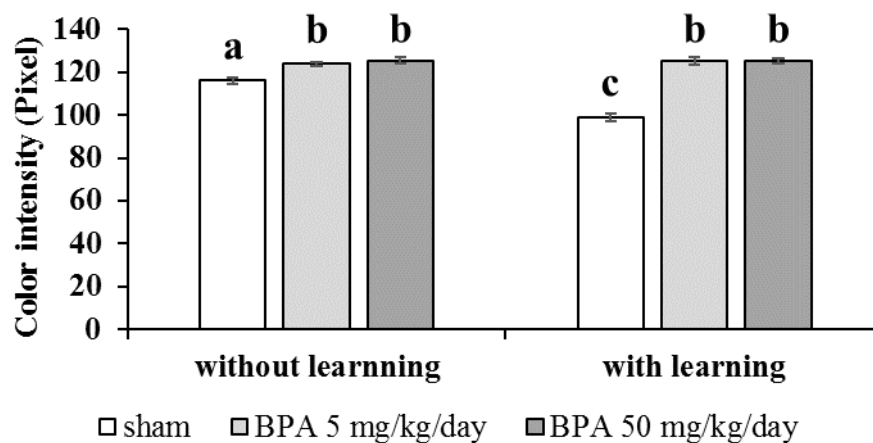


نمودار ۱: اثر BPA و یادگیری احترازی غیر فعال بر تراکم گیرنده D1 دوپامین در هسته اکامبنس در موش صحرائی، حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی دار در گروه‌ها است ( $p < 0.05$ ).

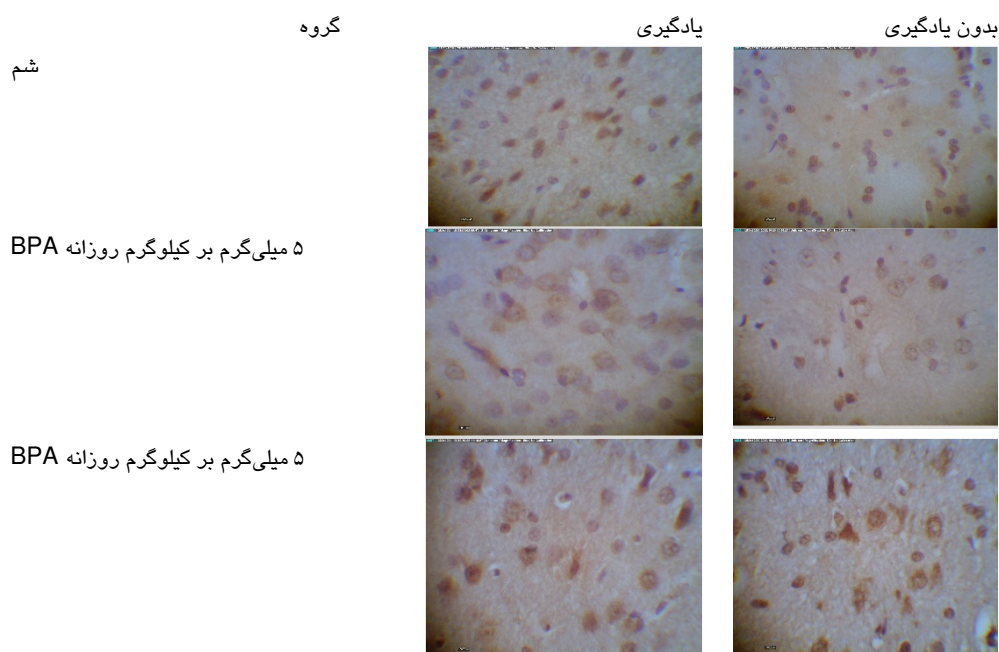


تصویر ۱: فتومیکروگراف از هسته اکامبنس نشان دهنده توزیع گیرنده D1 دوپامینی تحت تأثیر BPA در شرایط با یادگیری و بدون یادگیری در موش صحرائی نر ( $\times 400$ ).





نمودار ۲: اثر BPA و یادگیری احترازی غیر فعال بر تراکم گیرنده D1 دوپامین در هسته پوتامن دمی در موش صحرایی حروف غیر همنام نشان دهنده تفاوت معنی‌داری در گروه‌ها است ( $p < 0.05$ )



تصویر ۲: فتومیکروگراف از هسته پوتامن دمی نشان دهنده توزیع گیرنده D1 دوپامینی تحت تأثیر BPA در شرایط با یادگیری و بدون یادگیری در موش صحرایی نر ( $\times 400$ ).

## بحث

در روز در گروه‌های بدون یادگیری تفاوتی با شاهد ۱ نداشته است، اما در این هسته در گروه‌های دریافت کننده BPA در دو دوز ۵ و ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز در گروه‌های همراه با

نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که تراکم گیرنده D1 دوپامین در هسته اکامبنس در دو دوز ۵ و ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن

یادگیری تراکم گیرنده D1 دوپامین به مقدار قابل توجهی در مقایسه با شاهد ۲ کاهش داشته است. در هسته پوتامن دمی تراکم گیرنده D1 دوپامین در گروه‌های دریافت کننده‌ی BPA در دو دوز ۵ و ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن در روز در گروه‌های بدون یادگیری و با یادگیری کاهش معنی‌داری داشته است. بنابراین به نظر می‌رسد که این ماده باعث اختلال در حافظه و یادگیری شده است. بر طبق مطالعه بروسارد و همکاران فعالیت گیرنده D1 دوپامین در هیپوکامپ تعیین کننده شکل‌پذیری سیناپسی مرتبط با LTP در حافظه‌های پرهیزی می‌باشد (۱۱).

بر اساس مطالعه‌های قبلی دوز پایین BPA باعث تکثیر خارهای سیناپسی می‌شود و دوز بالای آن اثری ندارد (۱۲). این ماده خواص استروژنی ضعیفی دارد که حدوداً ۱۵۰۰۰ بار کمتر از ۱۷ بتا استرادیول است و به نظر می‌رسد که با استروژن برای باند شدن با گیرنده‌های آلفا و بتا رقابت می‌کند (۱۳). استروژن استراتژی یادگیری و حافظه را به وسیله تغییر در مدارهای مربوط به یادگیری و حافظه تحت تأثیر قرار می‌دهد. اگر فرآیند یادگیری بر پایه استراتژی هیپوکامپ باشد، کاربرد استروژن ممکن است عملکرد شناختی را افزایش دهد. اما اگر فرآیند یادگیری بر پایه استراتژی دیگر نواحی مغزی به خصوص استریاتوم باشد، استروژن ممکن است عملکرد شناختی را کاهش دهد و در نهایت اگر سهم استراتژی‌های بین هیپوکامپ و استریاتوم مساوی

باشد، استروژن ممکن است اثری بر عملکرد شناختی نداشته باشد (۱۴). به علاوه، تجویز استروژن خارجی نشان می‌دهد که دوز کم باعث اختلال و دوز زیاد باعث تسهیل کسب رفتار احترازی فعال می‌شود (۱۵). در مطالعه حاضر شدت شوک ۰/۶ میلی‌آمپر برای یک ثانیه بود. اورس و پارا گزارش کردند که شدت شوک ۰/۶ میلی‌آمپر جهت تولید یادگیری مهارتی شرطی کافی است (۱۶). در معرض قرار گرفتن با BPA به طور مزمن باعث افزایش در اثرات وابسته به پاداش گیرنده D1 دوپامین می‌باشد. BPA به طور مستقیم سیستم دوپامینرژیک مرکزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۷). بنابراین BPA باعث اختلال در سیگنال‌های دوپامینرژیک می‌شود، همچنین BPA باعث افزایش گیرنده‌های D1 دوپامین می‌شود و افزایش پاسخ کلسیم به دوپامین القا شده به وسیله‌ی BPA باعث افزایش تحریکی دوپامینرژیک می‌شود (۱۸). لرانس و همکاران نشان دادند BPA از تشکیل خار سیناپسی القا شده به وسیله استرادیول‌ها و تستوسترون در ناحیه لیمبیک مغز در موش‌های نر و ماده‌ای که گندهای آنها برداشته شده جلوگیری می‌کند و همچنین نشان دادند حتی دوز پایین BPA (۵ میلی‌گرم به ازای یک کیلوگرم وزن بدن در روز) اگر به صورت خوراکی داده شود، تشکیل خار سیناپسی را کاهش می‌دهد. بنابراین این ماده در تشکیل خار سیناپسی در هیپوکامپ و لایه‌های ۲ و ۳ قشر پری‌فرونتال تداخل ایجاد می‌کند (۱۹) و باعث کاهش خار دندریتها در قشر پری‌فرونتال در مغزهای اسکیزوفرنی

فعالیت‌های مغزی نظیر یادگیری و حافظه، رفتارهای هیجانی نقش دارد و بیماری‌های زیادی در سیستم عصبی مرتبط با عملکرد این گیرنده است، لذا هر گونه اختلال در عملکرد این نوروترانسمیتر به طور وسیعی اختلالاتی را در پی دارد و بنابراین یافتن عوامل مخل این سیستم بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاضر BPA باعث اختلال در توزیع گیرنده D1 دوپامین در هسته‌های اکامبوس و پوتامن شد، در حالی که، BPA در موش‌های آموزش دیده اثر قابل توجهی بر توزیع گیرنده D1 دوپامین در موش‌هایی که در معرض BPA قرار داشتند، نداشت.

### تقدیر و تشکر

تحقیق حاضر با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور و در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز انجام شد.

می‌شود (۲۰). گیرنده های D<sub>1</sub> بر روی نورون‌های قشری قرار دارند و آسیب‌های الکتریکی باعث تنظیم کاهش گیرنده D<sub>1</sub> قشر پری فرونتال می‌شود (۲۱). یافته‌ها نشان داد غلظت بالای زنواستروژن‌ها باعث اختلالات در یادگیری و کاهش سطح دوپامین در موش‌های صحرایی نژاد ویستار شد به این صورت که میزان گیرنده‌های استروژنی  $\alpha$  بر روی غشای پس سیناپسی با آزاد شدن دوپامین زیاد می‌شود و وقتی BPA از خروج دوپامین جلوگیری می‌کند، گیرنده‌های استروژنی  $\alpha$  غشا را ترک می‌کنند (۲۲).

میاتیک و همکاران نشان دادند BPA باعث افزایش پاسخ‌های کلسیم به دوپامین در نورون‌ها و آستروسیت می‌شود (۱۸). سوزوکی و همکاران نشان دادند که BPA باعث تنظیم افزایشی گیرنده‌ی D1 دوپامین می‌شود و به علاوه در معرض قرار دادن مزمن با این ماده باعث افزایش گیرنده D1 دوپامین در کل مغز می‌شود که این اثر مشابه اثر استروژن است که ترجمه ژن گیرنده D1 افزایش می‌دهد (۲۳). در این تحقیق نشان داده شد که با توجه به نقش استروئیدها در رشد و عملکرد سیستم عصبی انتظار می‌رود که BPA به علت تشابه ساختمان مولکولی بتواند اثر مثبتی بر عملکرد استروئیدها داشته باشد، در حالی که فرآیند یادگیری دچار اختلال شد. با توجه به این که دوپامین از نوروترانسمیترهایی است که در بسیاری از

**REFERENCES:**

1. Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ. The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm Behav* 2011; 59(3): 296-305.
2. Singleton DW, Khan SA. Xenoestrogen exposure and mechanisms of endocrine disruption. *Front Biosci* 2003; 8: s110-8.
3. Kim JJ, Jung MW. Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: a critical review. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2006; 30(2): 188-202.
4. Bell CC, Han VZ, Sugawara Y, Grant K. Synaptic plasticity in a cerebellum-like structure depends on temporal order. *Nature* 1997; 387(6630): 278-81.
5. Masuo Y, Ishido M. Neurotoxicity of endocrine disruptors: possible involvement in brain development and neurodegeneration. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2011; 14(5-7): 34: 369.
6. Xing B, Kong H, Meng X, Wei SG, Xu M, Li SB. Dopamine D1 but not D3 receptor is critical for spatial learning and related signaling in the hippocampus. *Neuroscience* 2010; 169(4): 1511-9.
7. Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, Yoshida T, Suzuki T. Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neurosci Lett* 2006; 402(3): 249-52.
8. Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews Neuroscience* 2004; 5(6): 483-94.
9. Gurden H, Takita M, Jay TM. Essential role of D1 but not D2 receptors in the NMDA receptor-dependent long-term potentiation at hippocampal-prefrontal cortex synapses in vivo. *Journal of Neuroscience Methods* 2000; 20: RC106.
10. Simonyi A, Serfozo P, Shelat PB, Dopheide MM, Coulibaly AP, Schachtman TR. Differential roles of hippocampal metabotropic glutamate receptors 1 and 5 in inhibitory avoidance learning. *Neurobiol Learn Mem* 2007; 88(3): 305-311.
11. Broussard JI, Yang K, Levine AT, Tsetsenis T, Jenson D, Cao F, Garcia I, Arenkiel BR, Zhou FM, et al. Dopamine Regulates aversive contextual learning and associated in vivo synaptic plasticity in the hippocampus. *Cell reports* 2016; 14(8):1930-9.
12. Keri RA, Ho SM, Hunt PA, Knudsen KE, Soto AM, Prins GS. An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reprod Toxicol* 2007; 24(2): 240-52.
13. Kuiper GG, Shughrue PJ, Merchenthaler I, Gustafsson JA. The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 1998; 19(4): 253-86.
14. Daniel JM, Lee CD. Estrogen replacement in ovariectomized rats affects strategy selection in the Morris water maze. *Neurobiol Learn Mem* 2004; 82(2):142-9.
15. Diaz-Veliz G, Urresta F, Dussaubat N, Mora S. Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. *Physiol Behav* 1991; 50(1): 61-5.
16. Everss E, Parra A. Inhibitory avoidance with a two\_way shuttle\_box. *Psicothema* 1998; 10(2): 387-91.
17. Mizuo K, Narita M, Miyagawa K, Okuno E, Suzuki T. Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A affects the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion in mice. *Neurosci Lett* 2004; 356(2): 95-8.
18. Miyatake M, Miyagawa K, Mizuo K, Narita M, Suzuki T. Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes. *J Neuroendocrinol* 2006; 18(6): 434-44.
19. Leranth C, Szigeti-Buck K, Maclusky NJ, Hajszan T. Bisphenol A prevents the synaptogenic response to testosterone in the brain of adult male rats. *Endocrinology* 2008; 149(3): 988-94.
20. Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG, Arnsten AF. Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *The Journal of neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 1997; 17(21): 8528-35.

21. Mizoguchi K, Ishige A, Takeda S, Aburada M, Tabira T. Endogenous glucocorticoids are essential for maintaining prefrontal cortical cognitive function. *The Journal of neuroscience. The Official Journal of the Society for Neuroscience* 2004; 24(24): 5492-9.
22. Alyea RA, Watson CS. Differential regulation of dopamine transporter function and location by low concentrations of environmental estrogens and 17beta-estradiol. *Environ Health Perspect* 2009; 117(5): 778-83.
23. Suzuki T, Mizuo K, Nakazawa H, Funae Y, Fushiki S, Fukushima S, Shirai T, Narita M. Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience* 2003; 117(3): 639-44.
24. Mersha MD, Patel BM, Patel D, Richardson BN, Dhillon HS. Effects of BPA and BPS exposure limited to early embryogenesis persist to impair non-associative learning in adults. *Behavioral and brain functions* : *BBF* 2015; 11: 27.

# Interaction of Bisphenol A and Passive Avoidance Learning on Dopamine D1 Receptor Distribution in Accumbens and Caudate Putamen Nuclei in Male Rats

Broomand S, Taherianfard M

Department of Physiology, Shiraz University, Shiraz, Iran

Received: 26 Sep 2015 Accepted: 26 Mar 2016

## Abstract

**Background & aim:** exposure to Bisphenol A (BPA) produces a significant increase in levels of the dopamine D1 receptor mRNA throughout the brain. Accordingly, the aim of present study was to investigate the effect of BPA on dopamine D1 receptor distribution in accumbens (aca) and caudate putamen (cpu) nuclei in with and without learning of male rats.

**Methods:** In the present experimental study, thirty male rats weighting 220- 300 g were used. Animals were divided into 6 groups, that each with 5 male rats. BPA in doses 5 and 50 mg/kg/day were used by oral intake for 15 days. Learning and memory were performed by a passive avoidance shuttle-box. Distribution of dopamine D1 receptor was investigated by immune-histochemical procedure. For determination of color difference the software of Image Analyzer were used. For data analysis, One-way ANOVA test and Tukey test as post-hoc were used ( $P<0.05$ ).

**Results:** Data in the present study showed that BPA in two dose significantly ( $P<0.05$ ) decrease distribution of dopamine D1 receptor in aca nucleus relative to sham2 of male rats with learning. BPA in two dose significantly ( $P<0.05$ ) decrease distribution of dopamine D1 receptor in cpu nucleus relative to sham1 and 2 of male rats with and without learning. Distribution of dopamine D1 receptor in aca and cpu nuclei significantly ( $P<0.05$ ) higher in sham 2 compared to sham1group.

**Conclusion:** According to present results, BPA impair dopamine D1 receptor distribution in aca and cpu nuclei of male rats, while the BPA in learned animal has not significant effects on dopamine D1 receptor distribution.

**Key words:** BPA; passive avoidance learning; shuttle-box; dopamine D1 receptor; male rat

---

**Corresponding author:** Taherianfard M, Department of Physiology, Shiraz University, Shiraz, Iran  
**Email:** taherian2001@yahoo.com

## Please cite this article as follows:

Broomand S, Taherianfard M. Avoidance Learning on Dopamine D1 Receptor Distribution in Accumbens and Caudate Putamen Nuclei in Male Rats. Armaghane-danesh 2016; 21 (1): 14-26.