

## SIÇANLARDA BENZODİAZEPİN ANTAGONİSTİ FLUMAZENİLİN ÖĞRENME VE HAFIZAYA ETKİSİ VE MUSKARİNİK KOLİNERJİK RESEPTÖRLERLE MUHTEMEL ETKİLEŞİMİ

Sülün Ayhan\*

Banu Ocakçoğlu\*\*

Metin Baştuğ\*\*

Yüksek vertebralıların santral sinir sisteminde spesifik benzodiazepin reseptörlerinin keşfedilmesi bu reseptörler için muhtemel endojene efektörlerin (benzodiazepin endokoidleri) bulunması ihtimaline dikkatleri çekmiştir. Benzodiazepin bağlanma yerlerine yüksek affinite gösterebilen ve intrensek aktiviteye sahip bazı endojen maddelerin, endojen benzodiazepinler (BDZ) olarak önerilmelerine rağmen halen fizyolojik rolleri tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Benzodiazepinlerin (örneğin diazepam) anksiyolitik etkileri çok iyi bilindiği için diazepam benzeri endokoidlerin de uyanıklık (arousal) veya anksiyete gibi durumlarda modülatör olarak fonksiyon yapmaları muhtemeldir. Ayrıca öğrenme ve/veya hafıza olaylarında da modüle edici bir role sahip olabilirler. Çünkü diazepam ve çeşitli diğer benzodiazepinler hayvan ve insanlarda öğrenme ve hafızayı bozarlar (3,7,9). Eğer benzodiazepin endokoidleri de benzer şekilde etki ediyorlar, rol oynuyorsa ve kognitif fonksiyonlar üzerine tonik inhibe edici etkinlik gösteriyorlarsa, bunların bir antagonistinin verilmesinden sonra öğrenme ve hafızayı kolaylaştırması gerekir. Bu hipotezin doğruluğunu incelemek için, benzodiazepin reseptör antagonisti flumazenil (Ro 15-1788) kullanarak endojen BDZ sisteminin sıçanın öğrenme ve hafıza üzerindeki etkisini inceledik.

Ayrıca öğrenme ve hafıza olaylarında kolinerjik sistemin çok önemli rolü olduğu da iyi bilinmektedir. Santral muskarinik kolinerjik reseptörleri bloke eden ilaçların da öğrenme ve hafızayı etkilediği, bozduğu da bilinmektedir. Bu nedenle muskarinik asetilkolin reseptör blokleri olan skopolamini, hem deneysel amnezi oluşturmak için hem

\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Prof. Dr.

\*\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Uz. Dr.

Geliş Tarihi : 28 Aralık 1992

Kabul Tarihi : 22 Aralık 1993

de kolinerjik sistemle benzodiazepin endokoidleri - reseptörleri ile muhtemel etkileşimlerini araştırmak için kullandık (2,5,7,10).

### MATERYAL ve METODLAR

— Deneylerimizde 150-225 gr ağırlığında erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar deney gününden bir gün önce her kafeste bir tane olacak şekilde yerleştirildiler. Gıda ve su ihtiyaçları kısıntısız olarak verildi. Her sıçan sadece bir deney grubunda kullanıldı.

— Sıçanları şartlandırmak için T.K.K. otomatik «escape avoidan-ce» cihazı kullanıldı.

#### Kullanılan deney yöntemi :

Sıçanlar, gerekli enjeksiyonlar yapıldıktan sonra yeni ortama alılabilmeleri için test kutusu içine yerleştirilip 5 dakika kadar bekletildiler ve bu süre sonunda deney başlatıldı. Deneyde önce sıçanlara 6 sn süreli şartlandırıcı uyaran (CS) olarak ışık (15-20 Watt) kullanıldı. Bu süre sonunda test kafesinin sıçanın bulunduğu bölümüne 4 saniye süreli 0,8 mA şiddetinde elektrik akımı (US) verildi. Bu akım (elektrik şoku), hayvanın bulunduğu bölmeden diğer bölmeye geçmesi halinde (escape cevap) hemen, bulunduğu bölmeyi terketmemesi halinde ise 4 saniye sürenin bitiminde kesilecek şekilde programlandı. Şok kesildikten sonra hayvana 30 saniyelik bir dinlenme periyodu verildi ve bunun sonunda hemen yeni bir deneme (CS + şok) başlatıldı. Bu şekilde her sıçana peşpeşe 25 deneme uygulandı. Deney sonunda her bir hayvanın 25 denemelik bir dönem içinde şartlı cevap kazanma durumu yani hayvanın bulunduğu bölmeyi elektrik akımının verildiği dönemde değil şartlandırıcı uyaran (ışık)ın uygulanışı sırasında terkedişi değerlendirildi. Bu cevap şartlı kaçış cevabı (conditioned avoidance response) olarak tanımlanmakta ve hayvanın şoktan önce, CS sırasında «Şokun geleceğini» öğrendiğini göstermektedir.

#### Deney Planı :

Tanımlanan şartlandırma yöntemini her birinde 6 hayvan bulunan gruplara uyguladık. Çalışmalarımız esas olarak öğrenme (acquisition) ve hafıza (retansiyon) şeklinde 2 deney grubunda toplandı. Her ana grup 3 subgruba ayrıldı. Şöyle ki;

#### A) Öğrenme (Acquisition) deneyi :

Bu gruptaki intakt hayvanlar hem şartlandırılma deneyine tabi tutuldular hem de aşağıda belirtilen enjeksiyonlar yapıldı.

|         |         | 1. enjeksiyon | 2. enjeksiyon    |
|---------|---------|---------------|------------------|
| 1. grup | KONTROL | Tween 80      | Serum fizyolojik |
| 2. grup | DENEY   | Tween 80      | Skopolamin       |
| 3. grup | DENEY   | Flumazenil    | Skopolamin       |

B) Hafıza (Retensiyon) deneyi :

Kullandığımız şartlandırma yöntemine göre daha önce eğitilmiş olan hayvanlar ise 1 hafta bekletildikten sonra tekrar deneye alınıp, aynı yöntem birbiri peşine 3 gün uygulandı. Aynı zamanda da aşağıda belirtilen enjeksiyonlar yapıldı.

|         |         | 1. enjeksiyon | 2. enjeksiyon    |
|---------|---------|---------------|------------------|
| 1. grup | KONTROL | Tween 80      | Serum fizyolojik |
| 2. grup | DENEY   | Tween 80      | Skopolamin       |
| 3. grup | DENEY   | Flumazenil    | Skopolamin       |

— Birinci ilaçlar deneyden 20 dakika, 2. enjeksiyonlar 10 dakika önce yapıldı.

— Enjeksiyonlar eşit hacimde (1 ml/kg) ve i.p. olarak uygulandı.

— Flumazenil (Ro 15-1788) 20 mg/kg, skopolamin ise 0.1 mg/kg dozda kullanıldı. Flumazenil Tween 80 (plasebo) skopolamin ise serum fizyolojik (SF) de hazırlandı.

**Değerlendirilmesi :**

Deneyler aynı şekil ve şartlarda birbiri peşine 3 gün tekrar edildi ve 25 denemelik dönemlerde hergün gösterdikleri şartlı kaçış cevapları arasındaki farklar istatistiksel olarak «student t» testi yardımı ile değerlendirildi.

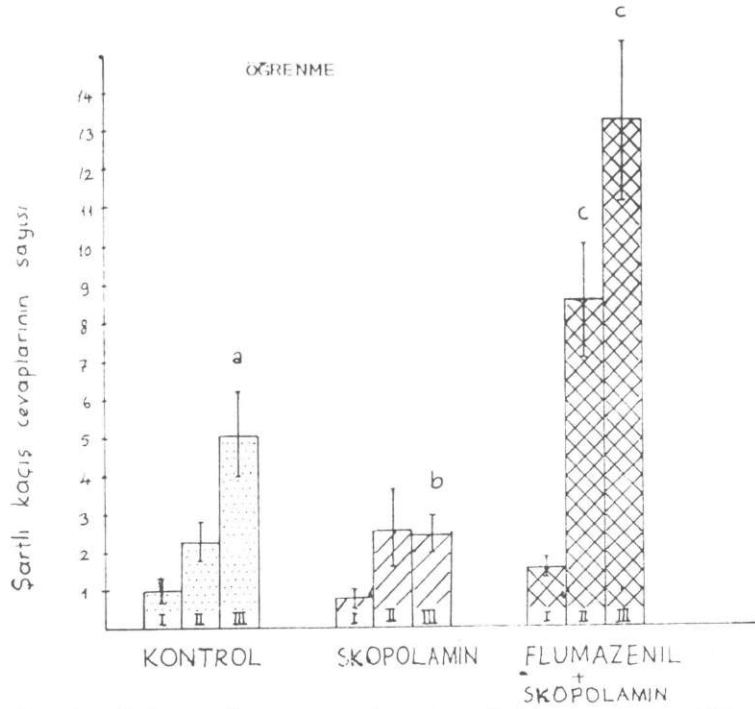
## SONUÇLAR

**Öğrenme (Acquisition) deney sonuçları :**

Kontrol grubundan elde edilen cevaplar incelendiğinde, hayvanların birbirini izleyen 3 gün boyunca gösterdikleri performansı arttırdıkları yani şartlı kaçış cevabında artış olduğu ve şoktan önce ışık esnasında yer değiştirmeyi öğrendikleri görüldü. Kontrol grubunun birinci günü ile üçüncü gününde elde edilen cevapları kıyasladığımızda anlamlı (a) bir artış olduğu bulundu (Şekil 1).

Skopolamin verilen grupta ise, şartlı kaçış cevapları özellikle 3. günde kontrole göre düşüktü ve kontrolün üçüncü günü ile skopolaminin üçüncü günü karşılaştırıldığında anlamlı olarak (b) cevaplarda azalma tespit edildi (Şekil 1).

Flumazenil ve skopolamin verilen grupta ise cevaplarda anlamlı (c) bir artış elde edildi. Flumazenil skopolaminin, acquisition olayındaki bloke edici etkisini önlediği gibi kaçış cevaplarının kazanılmasını da diğer bir deyişle öğrenmeyi kolaylaştırdığı tespit edildi (Şekil 1).



Şekil 1 : Siçanların birbirini izleyen üç gün (I, II, III. günler) boyunca gösterdikleri avoidance (şartlı kaçış) cevaplarına skopolaminin ve flumazenil + skopolaminin etkisi.

(a) Kontrol grubunun I. gününe göre anlamlı artış ( $p < 0.05$ )

(b) Kontrol grubunun III. gününe göre anlamlı azalma ( $p < 0.05$ )

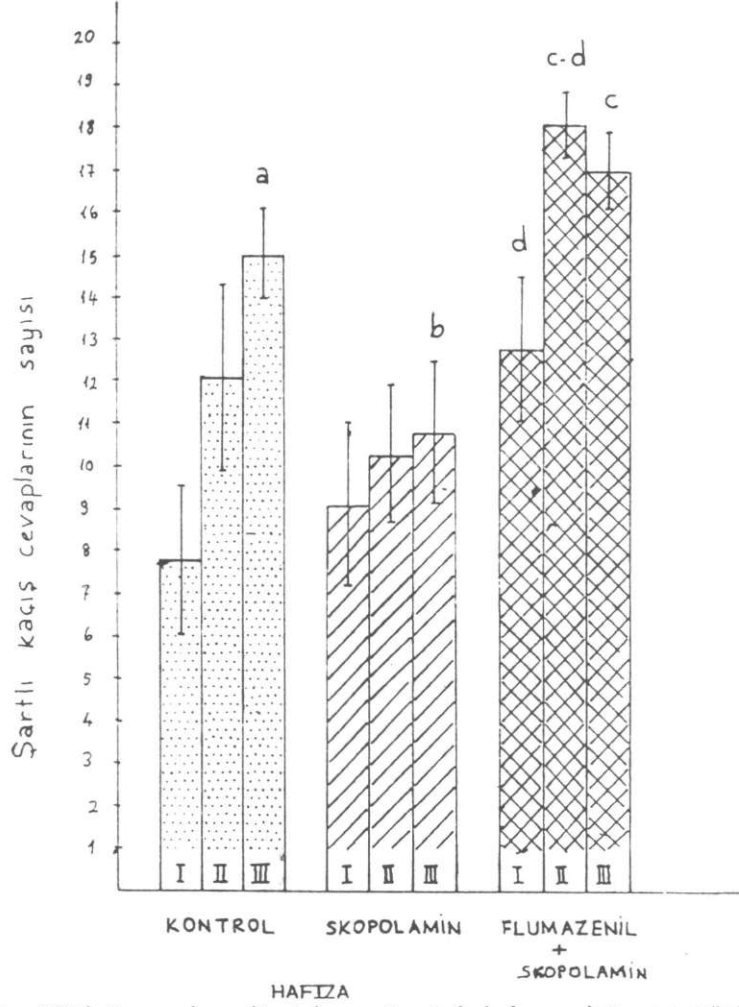
(c) Skopolamin uygulanan gruba göre anlamlı artış ( $p < 0.05$ )

#### Hafıza (retensiyon) deney sonuçları :

Kontrol grubundan elde edilen cevaplar incelendiğinde, hayvanların daha önceki eğitim döneminde kazandıkları cevapları korudukları (hatırladıkları) görüldü. Bu yeni deney sürecinde de cevapların birbirini izleyen 3 gün içinde giderek arttığı tespit edildi. Şekil 2'de de görüldüğü gibi, üçüncü günde elde edilen şartlı kaçış cevapları birinci güne göre anlamlı (a) bulundu.

Skopolamin verdiğimiz grupta ise, önceki kazanılan cevapların korunduğu, ancak kontrolün üçüncü günü ile skopolaminin üçüncü günü

karşılaştırıldığında cevapların anlamlı olarak (b) düşük olduğu görüldü. Bu da skopolaminin, hafızayı negatif yönde etkilediğini göstermektedir (Şekil 2).



Şekil 2 : Eğitilmiş sıçanların ikinci deney sürecinde hafıza ve hafızanın çağrılması) birbirini izleyen üç gün (I, II, III. günler) boyunca gösterdikleri avoidance (şartlı kaçış) cevaplarına skopolaminin ve flumazenil + skopolaminin etkisi.

- (a) Kontrol grubunun I. gününe göre anlamlı artış ( $p < 0.05$ )
- (b) Kontrol grubunun III. gününe göre anlamlı azalma ( $p < 0.05$ )
- (c) Skopolamin uygulanan gruba göre anlamlı artış ( $p < 0.05$ )
- (d) Kontrol grubuna göre anlamlı artış ( $p < 0.05$ )

Flumazenil ve skopolamini beraber kullandığımız son grupta elde edilen şartlı kaçış cevapları incelendiğinde; bu cevapların sadece skopolamin kullanılan gruptan daha yüksek olduğu görüldü. Hem birinci gün, hem de ikinci güne ait cevaplar sadece skopolamin uygulanan gruba göre istatistiksel olarak çok anlamlıydı (d). Bu sonuçlar flumazenilin hem skopolaminin hafızadaki bloke edici etkisini önlediğini (c), hem de hatırlamayı (retrieval) kolaylaştırdığını (d), güçlendirdiğini gösterir niteliktedir (Şekil 2).

### TARTIŞMA

Benzodiazepinler (BDZ), genel olarak anksiyolitik ve antikonvülsan olarak kullanılan ilaçlardır. İlaveten hayvanlarda, insanlarda etkin bir şekilde anterograd amnezi oluşturdukları da görülmektedir. BDZ'lerin ilaç olarak kullanılması sonucu bireyde öğrenme ve hafıza ile ilgili bozukluklar ortaya çıkmaktadır.

Araştırmaların, santral sinir sisteminde spesifik benzodiazepin reseptörlerinin bulunduğunu göstermesi, bunlara özgü endojen BZ reseptör ligandlarının bulunma ihtimalini akla getirmesi sonucu memelilerin beyinde BDZ ligandları bulunduğu hakkındaki deliller giderek artmaktadır. Hatta son çalışmalarla BDZ benzeri endokoidlerin normal olarak beyinde bulunduğu ve beyinde BDZ benzeri immunoreaktivitenin en büyük komponentinin diazepam ve onun metabolitleri desmetildiazepam ve oxacepam olduğu ileri sürülmektedir. Hipokampustan, septumdan, amigdaladan ve serebral korteksten hem öğrenme (avoidance eğitimi) sırasında hem de özellikle eğitim sonrası, BDZ reseptör ligandlarından birinin ya da daha fazlasının salındığını gösteren bulgular varsa da bu durum açıklamayı daha zorlaştırmaktadır. Hafıza prosesinde GABA/BDZ reseptör kompleksinin modüle edici rolü üzerinde de bir çok deliller elde edilmiştir (4,5,7,14).

1981 de çeşitli biyokimyasal, elektrofizyolojik ve davranışsal (behavioral) testler sonucunda BDZ'lerin etkilerini spesifik olarak antagone eden Ro 15-1788 (Flumazenil) adı verilen madde elde edilmiştir (6, 13). Flumazenilin BDZ antagonistleri gibi santral BDZ reseptörleriyle etkileştiği ve reseptör içinde potent bir ligand olduğu belirtilmektedir (3). Bazı çalışmalarda Flumazenilin kendisinin kullanılan doza ve test koşullarına bağlı olarak parsiyel agonist olduğu bildirilmişse de pek çok çalışma bu maddenin normal dozlarda BDZ reseptörleri için spesifik bir antagonist olduğunu göstermiştir (3,7,8,12,13). Kendi bulgularımız ve literatürlerden elde edilen bilgiler, beyin BDZ reseptörlerinin

Flumazenille antagonize edilmesiyle, hem öğrenmenin hem de hafıza oluşumunun pozitif yönde etkilenebileceğini desteklemektedir (7,11). Acquisitiondan önce enjekte edilen flumazenilin öğrenme modellerinde öğrenmeyi arttırdığı ve skopolamine bağlı amneziyi önlediği literatürde belirtilmektedir (2,5,7,10,13,14). Flumazenilin skopolaminle oluşturulan amneziyi önleyebilmesi BDZ'lerin hafızayı module edici etkilerinde, beyin kolinerjik sistemlerin muhtemel katılımlarıyla uygunluk göstermektedir. Skopolamin ve BDZ'lerle oluşturulan öğrenme bozuklukları hayvanlarda ve insanlarda benzerlik göstermektedir. Ayrıca BDZ'lerin hafıza olayında önemli yeri olan hipokampusun da dahil olduğu çeşitli beyin bölgelerinde kolinerjik aktiviteyi indirekt olarak azalttığı belirtilmekte ve diazepamın kolinerjik aktivite üzerine olan etkilerinin, Flumazenille tersine çevrilebildiğine değinilmektedir. Eğer BDZ endokodleri, diazepam benzer etkilere sahipse Flumazenilin kolinerjik aktiviteyi indirekt yolla disinhibe ederek, hafızayı kuvvetlendirebileceği varsayımı literatürce de desteklenmektedir (1,2,5,7,10).

Flumazenille ön tedavi yapıldığında muhtemelen endojen BDZ'lerin agonist etkisini önlemesi, uyanıklık ve/veya anksiojenik faktörleri arttırarak sonuçta öğrenme ve hafızayı pozitif yönden etkilemesi muhtemeldir. Buradaki anksiojenik faktörleri negatif güçlendirici olarak kullandığımız elektrik şoku ile eşleştirebiliriz (11).

Flumazenilin öğrenme/hafızanın kolaylaştırılmasındaki spesifik rolünün ne şekilde olduğunu —örneğin öğrenme (acquisition), depolama (memory) ve hatırlama (retrieval) gibi safhalarda— araştırmak için daha detaylı çalışmalara gereksinim vardır. Son literatür bilgileri, Flumazenilin etki mekanizmasında hafızanın modüle edilmesinde BDZ-GABA A sistemlerinin rolü olduğu, Flumazenilin bu mekanizmaları etkileyerek hafızayı kolaylaştırdığı hipotezini desteklemektedir (5).

Gerek araştırmamızın sonuçları, gerekse literatürdeki bulgular, BDZ reseptör antagonisti flumazenil ile öğrenilen bilgilerin saklanması arttığını, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan amnezinin engellendiğini göstermektedir.

### ÖZET

Çeşitli benzodiazepinlerin ve santral muskarinik kolinerjik reseptör blokerlerinin öğrenme ve hafızayı etkilediği, bozduğu bilinmektedir. Sunulan çalışmada, sıçanlara benzodiazepin reseptör antagonisti flumazenil (Ro 15-1788) vererek öğrenme ve hafızanın oluşumuna,

tekrar çağrılmasına etkisini incelemek, muskarinik asetilkolin reseptör blokleri olan skopolamini ise hem deneysel amnezi oluşturmak hem de kolinerjik sistem ile endojen benzodiazepin reseptörleri arasındaki muhtemel etkileşimleri araştırmak amaçlanmıştır. Araştırmamızın sonuçları, benzodiazepin reseptör antagonisti flumazenil'in öğrenmeyi hızlandığını, skopolamin ile sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan amneziyi engellediğini ve hatırlamayı kolaylaştırdığını göstermekte ve elde ettiğimiz bulgular literatürce de desteklenmektedir.

Anahtar Kelimeler : Amnezi, benzodiazepin, flumazenil, hafıza, öğrenme, skopolamin.

### SUMMARY

#### The Effects of Benzodiazepine Antagonist Flumazenil on Learning and Memory and Possible Interactions With Muscarinic Cholinergic Receptors in Rats

It has been known that different benzodiazepines and central muscarinic cholinergic blockers effect, disturb learning and memory. In this study, benzodiazepine receptor antagonist flumazenil (Ro 15-1788) was given to rats in order to test its effects on learning and memory processing and retrieval Scopolamine, a blocker of acetylcholine receptor was given with the intensions of both producing experimental amnesia and investigating possible interactions between cholinergic system and endogenous benzodiazepine receptors. The results of our study showed that benzodiazepine receptor antagonist flumazenil enhances learning and prevents amnesia which has been produced experimentally in rats by scopolamine and facilitates retrieval and the findings that we achieved were supported by literature also.

Key Words : Acquisition, amnesia, benzodiazepine, flumazenil, retention, scopolamine.

### KAYNAKLAR

1. Curran HV Schifano F Lader M : Models of memory dysfunction? A comparison of the effects of scopolamine and lorazepam on memory, psychomotor performance and mood. *Psychopharmacology* (Berlin), 103 (1) : 83-90, 1991.
2. Decker MW Tran T Mc Gaugh JL : A Comparison of The Effects of Scopolamine and Diazepam on Acquisition and Retention of Inhibitory Avoidance in Mice. *Psychopharmacology*, 100 (4) : 515-521, 1990.



3. File S Pellow S : Intrinsic Actions of Benzodiazepine Receptor Antagonist Ro 15-1788. *Psychopharmacology*, 88 : 1-11, 1986.
4. Izquierdo I Cunha C Medina JH : Endogenous benzodiazepine modulation of memory processes. *Neuroscience Biobehavior Review*. 14 (4) : 419-424, 1990.
5. Izquierdo I Medina JH : GABA A Receptor Modulation of Memory : The Role of Endogenous Benzodiazepines. *Trends in Pharmacological Sciences*, 12 (7) : 260-265, 1991.
7. Karavokiros KA Tsipis GB : Flumazenil : A benzodiazepine antagonist. *DICP*, 24 (10) : 976-981, 1990.
7. Lal H Kumar B Forster MJ : Enhancement of Learning and Memory in Mice by a Benzodiazepine Antagonist. *The FASEB Journal*, 2 (11) : 2707-2711, 1988.
8. McKay AC McKinney MS Clarke RSJ : Effect of Flumazenil on Midazolam-Induced Amnesia. *British Journal of Anaesthesia*, 65 : 190-196, 1990.
9. Preston GC Ward CE Broks P Traub M Stahl SM : Effects of Lorazepam on Memory, Attention and Sedation in Man : Antagonism by Ro 15-1788. *Psychopharmacology*, 97 (2) : 222-227, 1989.
10. Preston GC Ward C Lines CR Poppleton P Haigh JRM Traub M : Scopolamine and Benzodiazepine Models of Dementia : Cross-reversals by Ro 15-1788 and Physostigmine. *Psychopharmacology*, 98 (4) : 487-494, 1989.
11. Raffalli MJ Chapouthier S and G : Similar Effects of a Betacarboline and of Flumazenil in negatively and Positively Reinforced Learning Task in Mice. *Life Sciences*, 48 (7) : 685-692, 1991.
12. Raffalli MJ Chapouthier G Venault P Dodd RH : Methyl  $\beta$ -Carboline-3-Carboxylate Enhances Performance in a Multiple-Trial Learning Task in Mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 35 : 281-284, 1990.
13. Urbancic M Gadek MA Marczyński TJ : Chronic Exposure to Flumazenil : Anxiolytic Effect and Increased exploratory Behavior. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 35 : 503-509, 1990.
14. Wolfman C Da Cunha C Jerusalinsky D Stein LM Viola H Izquierdo I Medina JH : Habituation and Inhibitory Avoidance Training Alter Brain Regional Levels of Benzodiazepine-like Molecules and are Affected by Intracerebral Flumazenil Microinjection. *Brain Research*, 548 : 74-80, 1991.