جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

Physiology and Pharmacology, 13 (2), 130 - 138
Summer 2009 [Article in Persian]

Physiology and Pharmacology

Effect of paraoxon on the synaptosomal GABA uptake in rat hippocampus and cerebral cortex

Moslem Mohammadi [1*], Asghar Ghasemi [2], Esmaeel Ghani [3], Ali Khoshbaten [4], Alireza Asgari [4]

1. Dept. Physiology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
2. Endocrinology and Metabolism Rsearch Center, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept. Physiology, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
4. Dept. Physiology and Biophysics, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 25 Nov 2008 **Revised: 12 April 2009** **Accepted: 15 April 2009**

Abstract

Introduction: Paraoxon is the neurotoxic metabolite of organophosphorus (OP) insecticide parathion and causes acute toxicity by inhibition of acetylcholinesterase (AChE). AChE inhibition leads to the accumulation of acetylcholine in cholinergic synapses and hence results in an overstimulation of the cholinergic system. Reports on changes in the level of γ- amino butyric acid (GABA) during OP-induced convulsion have been controversial. In the present study we used cortical and hippocampal synaptosomes from rats after paraoxon poisoning to study the alterations of GABA uptake.

Methods: Male Wistar rats (200-270 g) were used in this study. Animals were given a single intraperitoneal injection of corn oil (control group) or paraoxon (0.1, 0.3, or 0.7 mg/kg). [^{3}H] GABA uptake by cortical and hippocampal synaptosomes was measured 30 min, 4 h, and 18 h after exposure (n = 7 rats/group). Type of transporter involved in the uptake was also determined by using β-alnine and L-diaminobutyric acid (L-DABA), which are glial and neuronal GABA uptake inhibitors, respectively.

Results: GABA uptake was significantly ($p<0.001$) reduced by both cortical (18-32%) and hippocampal (16-21%) synaptosomes compared with their respective control groups at all 3 time points after administration of the convulsive dose (0.7 mg/kg) of paraoxon. β-alnine had no inhibitory effect on the uptake, whereas L-DABA abolished most of the transporter mediated GABA uptake.

Conclusion: Our results showed that GABA uptake did not change in groups treated with 2 lower doses of paraoxon, which may indicate that the decrease of GABA uptake is convulsion-related. The decrease in GABA uptake, which is probably due to a change in the function of GABA transporters, may represent a compensatory response modulating neuronal overexcitation. Most of synaptosomal GABA uptake was blocked by L-DABA, indicating that the uptake was primarily carried out by a neuronal GABA transporter (GAT), GAT-1.

Keywords: Paraoxon, Synaptosome, Cerebral cortex, Hippocampus, GABA uptake.

* Corresponding author e- mail: mohammadimo@yahoo. com
Available online @: www.phypha.ir/ppj

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

فیزیولوژی و فارماکولوژی ۱۳ (۲)، ۱۳۰ – ۱۳۸
تابستان ۱۳۸۸

اثر پاراکسان بر برداشت سیناپتوزومی گابا در هیپوکامپ و قشر مغز موش صحرایی

مسلم محمدی[۱*]، اصغر قاسمی[۲]، اسماعیل غنی[۳]، علی خوش‌باطن[۴]، علی‌رضا عسگری[۴]
۱. گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مازندران، ایران
۲. مرکز تحقیقات غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳. گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
۴. گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران

دریافت: ۴ آذر ۱۳۸۸ بازبینی: ۲۳ فروردین ۱۳۸۸ پذیرش: ۲۶ فروردین ۱۳۸۸

چکیده

مقدمه: پاراکسان (متابولیت نروتوکسیک حشره کش ارگانوفسفره پاراتیون) اثرات خود را از طریق مهار استیل کولین استراز، تجمع استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک و تحریک بیش از حد سیستم کولینرژیک اعمال می‌کند. از آنجایی‌که گزارشات موجود در مورد تغییرات سطح گابا حین القاء تشنج به وسیله عوامل ارگانوفسفره مبهم است، در مطالعه حاضر از سیناپتوزوم‌های قشر مغز و هیپوکامپ موش‌های صحرایی مسموم شده با پاراکسان برای تعیین تغییرات ایجاد شده در برداشت گابا استفاده شد.

روش‌ها: موش‌هایی صحرایی نر نژاد ویستار (۲۷۰–۲۰۰ گرم) در این مطالعه استفاده شدند. حیوانات با تزریق داخل صفاقی، روغن ذرت (گروه کنترل) یا یکی از دوزهای پاراکسان (۰/۷ mg/kg و ۰/۳، ۰/۱) را دریافت کردند و ۳۰ دقیقه، ۴ و ۱۸ ساعت بعد از مواجهه برداشت سیناپتوزومی گابای نشاندار در قشر مغز و هیپوکامپ اندازه‌گیری شد (۷ سر موش در هر گروه). با استفاده از بتاآلانین و ال– دی آمینو بوتیریک اسید (ال دابا)، به ترتیب مهار کننده‌های برداشت گلیال و نرونی گابا، نوع ترانسپورتر دخیل در برداشت تعیین شد.

یافته‌ها: در حیوانات دریافت کننده دوز ۰/۷ پاراکسان (دوز تشنج زا) برداشت سیناپتوزومی گابا به طور معنی دار ($p<0/001$) در قشر مغز (۳۲– ۱۸ درصد) و هیپوکامپ (۲۱– ۱۶ درصد) در مقایسه با گروه‌های کنترل مربوطه در تمامی زمان‌های مورد مطالعه کاهش یافت. بتاآلانین اثر مهاری بر برداشت نداشت، در حالی که ال– دابا اکثر برداشت وابسته بر ترانسپورتر را از بین برد.

نتیجه‌گیری: از آنجایی که دوزهای دیگر پاراکسان برداشت گابا را مهار نکردند ممکن است کاهش برداشت وابسته به تشنج باشد. کاهش برداشت گابا، احتمالاً به علت تغییر در عملکرد ترانسپورترهای گابا، ممکن است بیانگر پاسخی جبرانی باشد که تحریک بیش از حد عصبی را تعدیل می‌کند. از آنجا که بیشتر برداشت گابا به وسیله ال– دابا بلوک شد، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که برداشت به طور عمده از طریق ترانسپورتر عصبی گابا (GAT-1)، صورت می‌گرفته است.

واژه‌های کلیدی: پاراکسان، سیناپتوزوم، قشر مغز، هیپوکامپ، برداشت گابا.

مقدمه

پاراکسان (متابولیت نروتوکسیک حشره‌کش ارگانوفسفره پاراتیون) اثرات خود را از طریق مهار استیل کولین استراز، تجمع استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک و تحریک بیش از حد سیستم کولینرژیک اعمال می‌کند [۲۴]. فعالیت تشنجی که به علت بالا رفتن سطح استیل کولین در نواحی مستعد مغز ایجاد می‌شود، تقریباً بلافاصله بعد از مواجه شدن با عوامل ارگانوفسفره آغاز می‌شود و سریعاً به صرع پایدار پیشرفت می‌کند که منجر به

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات: mohammadimo@yahoo.com
وبگاه مجله: www.phypha.ir/ppj

جهت تهیه فایل ورد این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آسیب‌های مغزی جبران ناپذیر می‌شود [۲۹،۳۲]. در حالی که به نظر می‌رسد مکانیسم‌های موسکارینی مرکزی مسئول شروع تشنج ناشی از ترکیبات ارگانوفسفره می‌باشند، سیستم‌های نروترانسمیتری دیگر نیز ممکن است در ایجاد تشنج دخالت داشته باشند [۲۸].

از آنجایی که آگونیست‌های گابا و بنزودیازپین‌ها قادر به مهار فعالیت تشنجی ناشی از این عوامل هستند، به نظر می‌رسد گابا (گاماآمینو بوتیریک اسید) در ایجاد تشنج ناشی از عوامل ارگانوفسفره نقش داشته باشد [۲۵،۲۸]. تغییرات ایجاد شده در عملکرد سیستم گاباارژیک حین مسمومیت با عوامل ارگانوفسفره مبهم است. Kar و Matin (۱۹۷۲) به دنبال ایجاد مسمومیت با پاراکسان به بررسی تغییرات ایجاد شده در سطح گابای مغز حین تشنج پرداختند، نتایج از کاهش سطح گابای مغز حکایت داشت [۱۴]. مطالعات دیگر عدم تغییر [۶، ۱۵] و حتی از افزایش [۹] سطح گابای مغز به دنبال مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفره را گزارش کردند.

در مطالعات انجام شده سطح گابا در هموژن بافت مغز [۶، ۹، ۱۶]، برش‌های مغزی [۲۶]، نرون‌های کشت یافته [۲۴] و نمونه میکرودیالیز [۱۵] اندازه‌گیری شد. به هر حال این مطالعات نتوانستند نقش گابا در ایجاد تشنج ناشی از عوامل ارگانوفسفره را به طور شفاف مشخص کنند. از آنجایی که تغییر در میزان برداشت یک ترانسمیتر به وسیله نرون‌های پیش سیناپسی و سلول‌های گلیال می‌تواند غلظت خارج سلولی آن را تغییر دهد [۲۳]، بررسی میزان برداشت گابا در قسمت‌های مختلف مغز می‌تواند در شناسایی نقش دقیق سیستم گاباارژیک در ایجاد تشنج ناشی از عوامل ارگانوفسفره مفید باشد. نتایج دو مطالعه أخیر، از اثر مهاری پاراکسان بر برداشت گابای نشاندار به وسیله پایانه‌های عصبی جداسازی شده (سیناپتوزوم) در مخچه [۲۷] و قشر مغز [۱۰] موش‌های صحرایی حکایت دارند. در مطالعات فوق اثرات مستقیم پاراکسان بر میزان برداشت گابا توسط سیناپتوزوم‌ها به صورت in vitro مورد بررسی قرار گرفت. ضروری به نظر می‌رسید به منظور تایید نتایج حاصل از مطالعات فوق، اثرات پاراکسان بر میزان برداشت گابا به صورت in vivo نیز مورد بررسی قرار گیرد. بنابراین در این مطالعه بر آن شدیم ابتدا موش‌های صحرایی را با تزریق داخل صفاقی پاراکسان مسموم نماییم و در ادامه تغییرات زودرس و تاخیری حاصله در میزان برداشت سیناپتوزومی گابا در هیپوکامپ و قشر مغز را مورد مطالعه قرار دهیم.

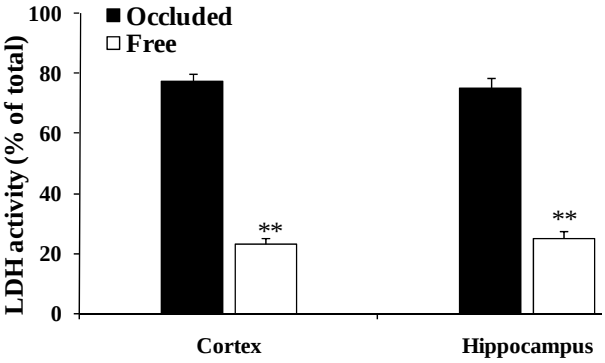
مواد و روش‌ها

گابای نشاندار شده با تریتیوم (۸۶ Ci/mmol) از شرکت آمرشام انگلستان؛ نیپکوتیک اسید، آمینو اکسی استیک اسید، پاراکسان (O,O'-diethyl-p–nitrophenyl phosphate; 90% pure)، گابا، بتا آلانین و اسید دی آمینو بوتیریک اسید از شرکت سیگمای آلمان؛ و سایر مواد از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

در این مطالعه از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی ۲۷۰–۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری می‌شدند و تا زمان انجام آزمایش آزادانه به آب و غذا دسترسی داشتند. هنگام مطالعه موازین اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

تعداد ۷ سر موش به ازای هر گروه برای بررسی میزان برداشت گابا مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تهیه محلول پاراکسان از روغن ذرت به عنوان حلال استفاده شد و محلول‌ها به گونه‌ای ساخته شدند که به ازای هر کیلوگرم وزن بدن یک میلی‌لیتر محلول تزریق گردد. از یک دوز پایین (۰/۱ mg/kg) و یک دوز بالای تشنج‌زا و نزدیک به LD_{50} (۰/۷ mg/kg) پاراکسان به منظور ایجاد مسمومیت در حیوانات استفاده شد. به علاوه، یک دوز حد واسط (۰/۳ mg/kg) نیز جهت ایجاد مسمومیت مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات با تزریق داخل صفاقی (i.p.)، روغن ذرت (گروه حلال به عنوان گروه کنترل) و یا یکی از دوزهای پاراکسان را دریافت کردند. حیوانات ۳۰ دقیقه (زمان شروع علائم)، ۴ یا ۱۸ ساعت، به ترتیب برای بررسی اثرات اولیه و تاخیری ناشی از تزریق داخل صفاقی تک دوز پاراکسان [۶،۲۱]، بعد از تزریق کشته شدند و پارامترهای مورد نظر مورد مطالعه قرار گرفت.

برای تهیه سیناپتوزوم از روش Raiteri و همکاران استفاده شد [۲۲]. نمونه‌های هیپوکامپ و قشر مغز بعد از جداسازی، در بافر سوکروز ۰/۳۲ مولار (تهیه شده در بافر فسفات ۰/۱ مولار، pH =۷/۴) به نسبت وزنی حجمی ۱ به ۱۰ هموژن شدند. سوسپانسیون حاصله برای حذف بقایای تخریب شده سلولی به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰× g سانتریفیوژ شد (۴°C). با سانتریفیوژ



نمودار ۱- مقایسه میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز داخل (Occluded) و خارج (Free) سیناپتوزوم‌های قشر مغز و هیپوکامپ به صورت درصد فعالیت کل. مقادیر به صورت mean ± SEM نشان داده شده‌اند. p<۰/۰۰۱ ** در مقایسه با فعالیت آنزیم داخل سیناپتوزوم.

محلول رویی در g ×۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه رسوب حاوی سیناپتوزوم بدست آمد. سپس این رسوب در بافر استاندارد حاوی ترکیبات (برحسب میلی مولار) NaCl ۱۲۵، KCl ۳، $MgSO_4$ ۱/۲، $CaCl_2$ ۱/۲، $NaHCO_3$ ۲۲، NaH_2PO_4 ۱و گلوکز ۱۰ که با گاز کربوژن (۹۵٪ اکسیژن و ۵٪ دی اکسید کربن) هوادهی شده بود، وارد شد. پس از اندازه‌گیری پروتئین موجود در فراورده‌های سیناپتوزومی به روش برادفورد [۲]، با استفاده از بافر استاندارد غلظت پروتئین در mg/ml ۱ تنظیم گردید.

با توجه به این که لاکتات دهیدروژناز (LDH) یک شاخص داخل سلولی است در این مطالعه به منظور بررسی میزان سلامت غشاء سیناپتوزوم فعالیت این آنزیم در نمونه‌ها قبل و بعد از مواجهه با یک دترجنت (تریتون X-100) سنجش و مورد مقایسه قرار گرفت [۱۹]. میزان فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز در حضور تریتون بیانگر مقدار فعالیت کل LDH نمونه، فعالیت در نمونه فاقد تریتون بیانگر LDH آزاد (Free LDH) و اختلاف بین این دو بیانگر LDH محصور (Occluded LDH) بود. نتایج به دست آمده بر اساس مقدار پروتئین موجود در نمونه سیناپتوزومنی نرمالیزه و بیان شدند.

سیناپتوزوم‌ها در حجم‌های ۰/۵ میلی لیتری داخل میکروتیوب قرار داده شدند. برداشت با اضافه کردن مخلوط حاوی گابای نشاندار ([^{3}H]GABA) و گابای سرد (۴۰۰ نانومولار که ۱/۵ درصد آن نشاندار بود) آغاز شد. سیناپتوزوم‌ها پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷°C، به مدت ۱۰ دقیقه در g × ۱۲۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند و رسوب حاصل در بافر استاندارد سرد مخلوط گردید. مجدداً سیناپتوزوم‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در g × ۱۲۰۰۰ در دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند و این بار رسوب حاصله در سولفات دودسیل سدیم (SDS) ۱ درصد در NaOH ۰/۲ نرمال حل گردید. سپس با اضافه کردن ۴ میلی لیتر سنتیلاتور، شمارش گابای نشاندار به وسیله دستگاه بتا کانتر (مدل Betamatic، ساخت فرانسه) انجام شد.

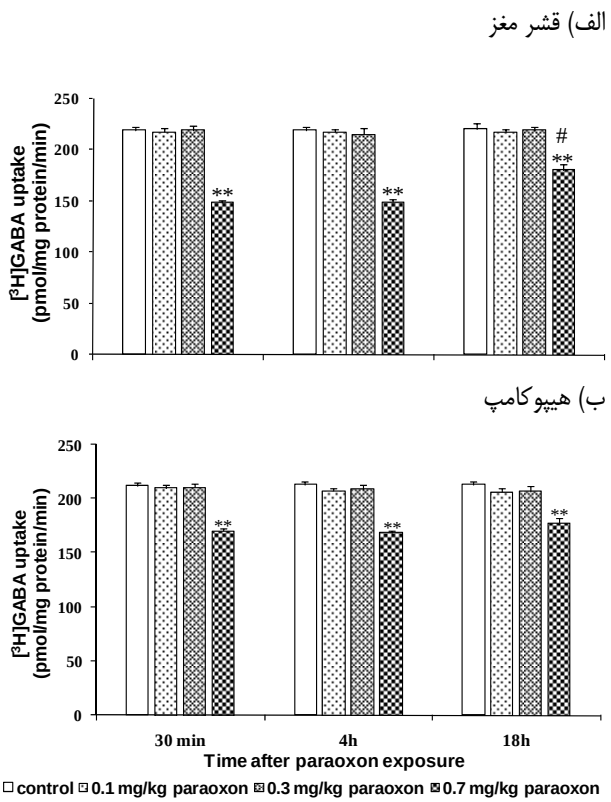
تجزیه متابولیک گابای نشاندار به میزان زیادی تفسیر نتایج را مشکل می‌ساخت. به منظور جلوگیری از تخریب گابا همواره به محیط حاوی سیناپتوزوم آمینو اکسی استیک اسید ۱۰ میکرومولار اضافه می‌شد [۳۰].

زمانی که داروهای نیپکوتیک اسید (۵۰ میلی مولار)، ال- دی آمینو بوتیریک اسید (L-DABA, ۵۰۰ میکرومولار) و بتاآلانین (۱۰۰ میکرومولار) مورد استفاده قرار می‌گرفتند، به مدت ۱۵ دقیقه قبل از شروع برداشت گابا با سیناپتوزوم‌ها پری انکوبه می‌شدند. نیپکوتیک اسید یک مهار کننده قوی سیستم ترانسپورتر مسئول برداشت اختصاصی گابا است. بنابراین درحضور آن برداشت اختصاصی مهار شده و تنها مختصری برداشت غیر اختصاصی باقی می‌ماند [۳۰]. ال- دابا [۳۳] و بتاآلانین [۱۳،۳۰] به ترتیب مهارکننده‌های ترانسپورترهای عمدتاً نرونی (GAT-1) و گلیال (GAT-3) گابا بوده و از آنها به منظور تعیین نوع ترانسپورتر دخیل در برداشت گابا استفاده شد.

نتایج به صورت mean ± SEM نشان داده شدند. برای بررسی اثرات ال- دابا و بتاآلانین بر میزان برداشت گابا و نیز مقایسه میزان فعالیت LDHداخل و خارج سیناپتوزوم‌ها از آزمون Paired t-test استفاده شد. به منظور مقایسه برداشت گابا بین قشر مغز و هیپوکامپ از آزمون Independent t-test استفاده شد. برداشت گابا داخل هر گروه و بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری One-way analysis of variance (ANOVA) مورد مقایسه قرار گرفتند، در صورت معنی دار بودن از آزمون Tukey برای مقایسه بعدی استفاده شد. p<۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

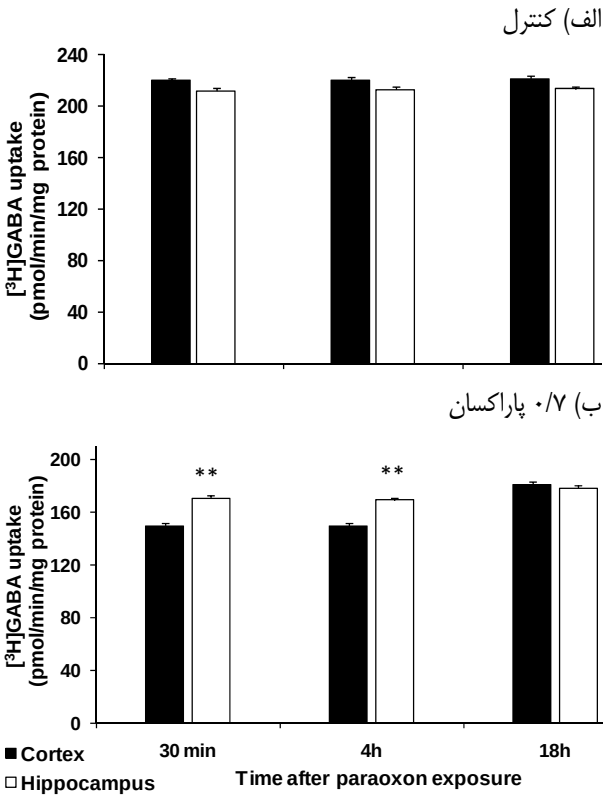
به منظور تایید سلامت غشاء سیناپتوزوم‌ها فعالیت آنزیم لاکتات دهیدروژناز (یک مارکر سیتوزولی) اندازه‌گیری شد. آسیب غشای سیناپتوزومی با بررسی نشت این آنزیم از طریق میزان



نمودار۲- اثر پاراکسان بر برداشت گابا به وسیله سیناپتوزوم‌های قشر مغز (الف) و هیپوکامپ (ب). ۳۰ دقیقه، ۴ و ۱۸ ساعت بعد از تزریق پاراکسان و روغن ذرت (گروه کنترل) برداشت سیناپتوزومی گابا در قشر مغز و هیپوکامپ اندازه‌گیری شد. مقادیر به صورت mean ± SEM نشان داده شده‌اند. $p<۰/۰۰۱$** در مقایسه با گروه کنترل، $p<۰/۰۰۱$ # اثر زمان.

اکسیداسیون NADH به NAD^+ ارزیابی شد. میزان فعالیت لاکتات دهیدروژناز داخل سیناپتوزوم (Occluded) در قشر مغز و هیپوکامپ به ترتیب ۲/۸ ± ۷۷ و ۲/۵ ± ۷۵ درصد و در محیط خارج سیناپتوزوم (Free) به ترتیب ۲/۱ ± ۲۳ و ۲/۵ ± ۲۵ درصد در مقایسه با فعالیت کل LDH بود. اختلاف معنی‌دار آماری ($p<۰/۰۰۱$) بین فعالیت داخل و خارج سیناپتوزومی آنزیم لاکتات دهیدروژناز از سلامت غشاء سیناپتوزوم‌های تهیه شده از قشر مغز و هیپوکامپ حکایت دارد. فعالیت کل LDH در قشر مغز و هیپوکامپ به ترتیب ۸۲ ± ۸۴۰ و ۹۵ ± ۷۸۰ نانومول در دقیقه به ازای هر میلی گرم پروتئین بود (نمودار۱).

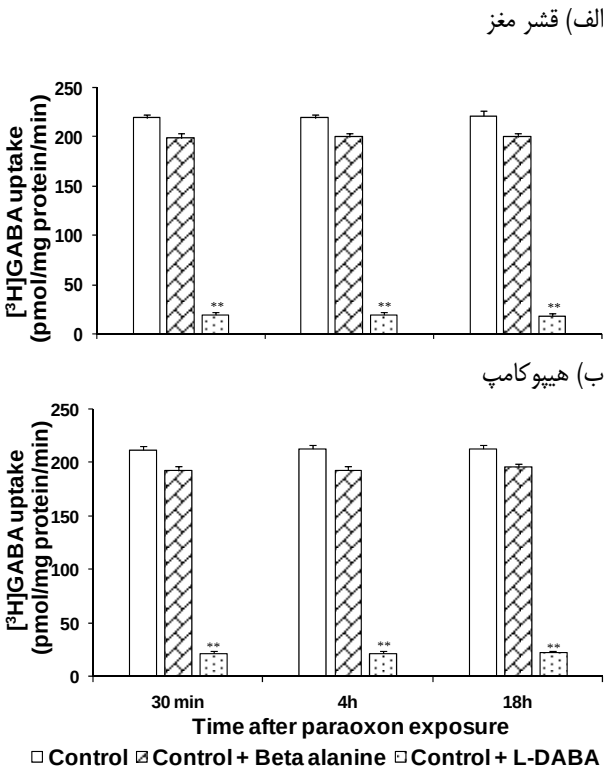
برداشت اختصاصی از طریق کم کردن برداشت غیراختصاصی (برداشت در حضور نیپکوتیک اسید) از برداشت کل (برداشت در عدم حضور نیپکوتیک اسید) به دست آمد. تقریباً ۹۸ درصد از برداشت گابا به وسیله سیناپتوزوم‌های قشر مغز و هیپوکامپ به وسیله نیپکوتیک اسید مهار شد.



نمودار۳- مقایسه میزان برداشت سیناپتوزومی گابا در قشر مغز با هیپوکامپ در گروه‌های کنترل (الف) و ۰/۷ پاراکسان (ب). مقادیر به صورت mean ± SEM نشان داده شده‌اند $p<۰/۰۰۱$**.

تنها دوز ۰/۷ پاراکسان توانست منجر به کاهش معنی‌دار در میزان برداشت گابا در قشر مغز و هیپوکامپ گردد. این کاهش در زمان‌های مورد مطالعه به ترتیب در قشر مغز ۳۲/۲، ۳۲ و ۱۸/۳ درصد و در هیپوکامپ ۱۹/۴، ۲۰/۷ و ۱۶/۵ درصد بود. به هر حال ۱۸ ساعت بعد از تزریق این دوز برداشت گابا در قشر مغز در مقایسه با زمان‌های قبلی افزایش معنی‌دار ($p<۰/۰۰۱$) نشان داد (تقریباً ۱۴ درصد)، اما همچنان میزان برداشت در این زمان در قشر مغز و نیز هیپوکامپ در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۰۱$) (نمودار ۲ الف و ب).

در هیچکدام از زمان‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری بین میزان برداشت گابا در هیپوکامپ و قشر مغز گروه کنترل و حیوانات دریافت کننده دوزهای ۰/۱ و ۰/۳ پاراکسان مشاهده نشد. اما در حیوانات دریافت کننده دوز ۰/۷ پاراکسان در زمان‌های ۳۰ دقیقه و ۴ ساعت میزان برداشت گابا در هیپوکامپ بیشتر از میزان برداشت گابا در قشر مغز بود. نتایج مربوط به مقایسه برداشت گابا در هیپوکامپ و قشر مغز گروه‌های کنترل و ۰/۷ پاراکسان در نمودار ۳ الف و ب نشان داده شده است.



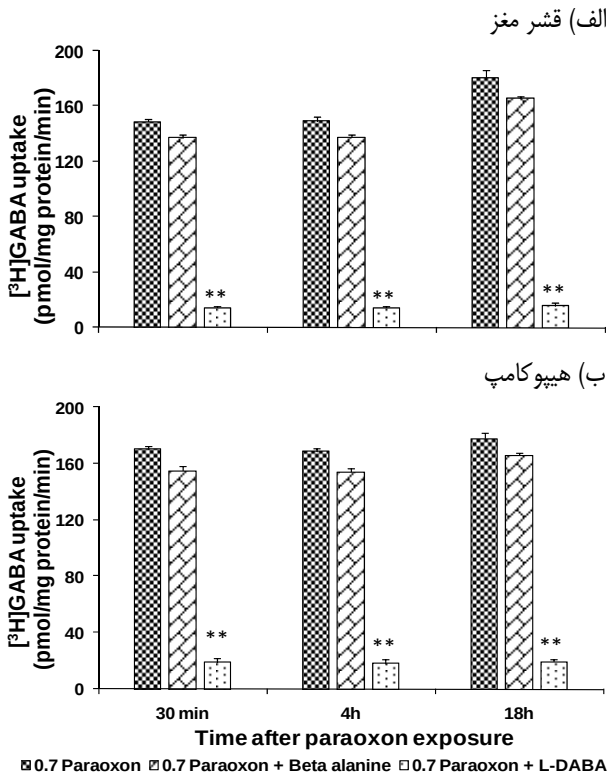
نمودار۴- اثرات بتاآلانین (۱۰۰ میکرومولار) و ال- دابا (۵۰۰ میکرومولار) بر برداشت گابا به وسیله سیناپتوزوم‌های قشر مغز (الف) و هیپوکامپ (ب) در گروه کنترل. مقادیر به صورت mean ± SEM نشان داده شده‌اند. **p<۰/۰۰۱.

بتاآلانین در هیچ یک از موارد نتوانست موجب کاهش معنی‌دار برداشت گابا در قشر مغز و هیپوکامپ (۹-۶ درصد) شود. برعکس، ال- دابا توانست حدود ۹۰ درصد برداشت گابا در قشر مغز و هیپوکامپ را در همه گروه‌ها مهار کند. نتایج مربوط به اثر بتاآلانین و ال- دابا بر برداشت گابا در گروه‌های کنترل و ۰/۷ پاراکسان به ترتیب در نمودارهای ۴ و ۵ نشان داده شده اند.

بحث

بر اساس نتایج مطالعه حاضر دوز ۰/۷ پاراکسان، دوزی که برای ایجاد تشنج کافی بود، توانست برداشت سیناپتوزومی گابا در هیپوکامپ و قشر مغز را کاهش دهد. برداشت گابا عمدتاً از طریق ترانسپورترهای نرونی گابا صورت می‌گرفت.

نواحی دقیق مغزی دخیل در شروع و حفظ تشنج‌های ناشی از ترکیبات ارگانوفسفره نامشخص هستند [۱۱]. به هر حال، در مطالعه حاضر هیپوکامپ و قشر مغز به دلایل زیر به منظور بررسی انتخاب شدند: ۱- هیپوکامپ در شروع و حفظ تشنج‌های



نمودار۵- اثرات بتاآلانین (۱۰۰ میکرومولار) و ال- دابا (۵۰۰ میکرومولار) بر برداشت گابا به وسیله سیناپتوزوم‌های قشر مغز (الف) و هیپوکامپ (ب) در گروه دریافت کننده دوز ۰/۷ پاراکسان. مقادیر به صورت mean ± SEM نشان داده شده‌اند. **p<۰/۰۰۱.

صرعی نقش مهمی دارد [۸،۱۲]؛ ۲- تحریک‌پذیری دراز مدت به قشر مغز انتشار می‌یابد [۵]؛ ۳- قشر مغز و هیپوکامپ عصب دهی کولینرژیک زیادی دارند و به دنبال تشنج‌های ایجاد شده به وسیله ترکیبات ارگانوفسفره آسیب می‌بینند [۱۱،۱۵]؛ ۴- قشر مغز نه تنها حاوی مقادیر قابل ملاحظه‌ای گابا می‌باشد، بلکه آنزیم‌های اصلی مسئول سنتز و تجزیه آن نیز در قشر وجود دارند [۱۷]؛ ۵- سطوح بالای GAT-1-mRNA در قشر مغز و هیپوکامپ وجود دارند [۳،۷].

همانطوری که ذکر شد مکانیسم‌های کولینرژیک موسکارینی در ایجاد تشنج‌های ناشی از ترکیبات ارگانوفسفره نقش دارند، به علاوه ممکن است چندین سیستم نروترانسمیتری در انتشار و حفظ سیژرهای القاء شده به وسیله این عوامل نقش داشته باشند (۱۸). گابا مهمترین نروترانسمیتر مهاری سیستم عصبی مرکزی بوده و در تنظیم فعالیت عصبی نقش دارد [۱]. گابا با مسمومیت القاء شده به وسیله عوامل ارگانوفسفره، به خصوص تشنج‌های ناشی از این عوامل، ارتباط دارد [۱۶].

گزارشات متناقضی در مورد تغییر غلظت گابا بعد از مواجهه و

القاء تشنج با عوامل ارگانوفسفره وجود دارد. بر خلاف گزارش‌هایی که کاهش سطح گابای مغز را علت القاء تشنج ناشی از عوامل ارگانوفسفره می‌دانند [۱۴،۲۸]، مطالعات دیگر از افزایش گابای مغز خوکچه هندی و موش صحرایی به دنبال القاء تشنج به وسیله سومان خبر داده‌اند [۹،۱۸]. این محققین معتقدند افزایش حاصله در سطح گابای مغز ثانویه و تا حدودی پاسخ جبرانی در مقابل القاء تشنج می‌باشد.

براساس فرضیه McDonough وShih [۱۸]، ۴۰– ۵ دقیقه بعد از شروع تشنج ناشی از عوامل ارگانوفسفره فرایندهای غیرکولینرژیکی عصبی فراخوانده می‌شوند. تغییرات عصبی شیمیایی ثانویه در حیوانات تیمار شده با دوزهای ناکافی عوامل ارگانوفسفره برای ایجاد تشنج و یا در حیواناتی که به کمک داروهای آنتی کولینرژیک یا ضد تشنج در برابر تشنج محافظت شده‌اند اتفاق نمی‌افتد. در توافق با این فرضیه در مطالعه حاضر به دنبال تزریق دوزهای پایین پاراکسان (۰/۱ و ۰/۳)، که برای القاء تشنج ناکافی بودند، برداشت گابا در هیپوکامپ و قشر مغز تغییر نکرد. در حالی که ۳۰ دقیقه بعد از تزریق دوز تشنج‌زای پاراکسان (۰/۷ mg/kg)، برداشت گابا در قشر مغز (۳۲– ۱۸ درصد) و هیپوکامپ (۲۱– ۱۶ درصد) مهار شد (p<۰/۰۰۱). علی رغم از بین رفتن کلیه علائم ناشی از تحریک بیش از حد سیستم کولینرژیک بعد از ۱۸ ساعت، کاهش برداشت گابا همچنان وجود داشت (نمودار ۲).

در تناقض با نتایج مطالعه حاضر، Coudray-Lucas و همکاران [۶] گزارش کردند پاراکسان (۱ mg/kg)، ۴ و ۱۸ ساعت پس از تزریق داخل صفاقی سطح گابای مغز موش صحرایی را تغییر نمی‌دهد. اختلاف گزارش شده تا حدودی به تکنیک مورد استفاده مربوط می‌شود، زیرا آنها در مطالعه خود از هموژن بافت مغز استفاده و سطوح داخل و خارج سلولی گابا را اندازه‌گیری کردند.

در مطالعات متعدد تأثیر مواجهه مستقیم عامل ارگانوفسفره بر سیستم گاباارژیک مورد بررسی قرار گرفت. مطالعاتی که با استفاده از مدل سیناپتوزومی به بررسی این تغییرات پرداختند از کاهش برداشت سیناپتوزومی گابای نشاندار در مخچه [۲۷] و قشر مغز [۱۰] موش صحرایی به وسیله پاراکسان، و کاهش برداشت سیناپتوزومی گابای نشاندار در مغز خوکچه هندی توسط تابون [۳۱] خبر داده اند.

کاهش در برداشت گابا، احتمالاً به دلیل تغییر در سیستم ترانسپورتر گابا (GAT)، ممکن است پاسخی جبرانی در تعدیل تحریک بیش از حد عصبی باشد [۴]. در سیناپس‌های گاباارژیک مهار ترانسپورترهای گابا جریان‌های مهاری پس سیناپسی را طولانی می‌کند، به علاوه افزایش غلظت گابا آزادسازی گلوتامات از پایانه‌های عصبی تحریکی مجاور را کاهش می‌دهد. ترانسپورترهای گابا ناقلین وابسته به سدیم و کلر گابا هستند و در جهت گرادیان غلظتی یون‌های سدیم و کلر، گابا را به داخل پایانه‌های عصبی و سلول گلیال انتقال می‌دهند [۳۳]. به هرحال به دنبال افزایش غلظت پتاسیم خارج سلولی حین تشنج، عمل ترانسپورتر گابا معکوس شده و افزایش آزادسازی غیر وزیکولی گابا از طریق ترانسپورتر غلظت خارج سلولی آن را افزایش می‌دهد [۲۰]. بنابراین ممکن است القاء تشنج در حیوانات دریافت کننده دوز ۰/۷ پاراکسان در مطالعه حاضر از طریق معکوس نمودن عمل ترانسپورتر علاوه بر کاهش برداشت گابا، از طریق آزادسازی آن و متعاقباً افزایش غلظت خارج سلولی گابا نقش محافظتی داشته باشد.

غلظت ۱۰۰ میکرومولار بتاآلانین می‌تواند به میزان ۹۰–۶۰ درصد پروتئین‌های GAT-2 و GAT-3 را در موش صحرایی مهار کند [۳۰]. در این غلظت بتاآلانین نتوانست برداشت گابای نشاندار به وسیله سیناپتوزوم‌های قشر مغز و هیپوکامپ را مهار کند. از طرف دیگر ال– دابا در غلظت ۵۰۰ میکرومولار مهار قابل ملاحظه‌ای در برداشت گابا در هر دو ناحیه مغز ایجاد کرد (نمودارهای ۴ و ۵). شاید مهار قوی برداشت گابا به وسیله ال– دابا و مهار ضعیف آن به وسیله بتاآلانین در توافق با مطالعات دیگر [۱۰،۳۰،۳۳] از دخالت ترانسپورترهای نرونی گابا (GAT-1) در برداشت سیناپتوزومی گابا در این مطالعه حکایت داشته باشد.

در کل نتایج این مطالعه از کاهش برداشت گابا و درگیری ثانویه سیستم گاباارژیک به دنبال القاء فعالیت تشنجی حکایت داشت.

سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) انجام شد.

References

[1] Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M, Molecular structure and physiological functions of $GABA_B$ receptors. ***Physiol Rev*** 84 (2004) 835-67.

[2] Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ***Anal Biochem*** 72 (1976) 248-254.

[3] Cecchini AL, Soares AM, Giglio JR, Amara S, Arantes EC, Inhibition of L-glutamate and GABA synaptosome uptake by crotoxin, the major neurotoxin from crotalus durissus terrificus venum. ***J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*** 10 (2004) 260-79.

[4] Conti F, Minelli A, Melone M, GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications. ***Brain Res Rev*** 45 (2004) 196-212.

[5] Costa MS, Rocha JBT, Perosa SR, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG, Pilocarpine-induced status epilepticus increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. ***Neurosci Lett*** 356 (2004) 41-41.

[6] Coudray-Lucas C, Prioux-Guyonneau M, Sentenac H, Cohen Y, Wepierre J, Effects of physostigmine, paraoxon and soman on brain GABA level and metabolism. ***Acta Pharmacol et Toxicol*** 55 (1984) 153-57.

[7] Dalby NO, Inhibition of γ-aminobutyric acid uptake: anatomy, physiology and effects against epileptic seizures. ***Eur J Pharmacol*** 479 (2003) 127-37.

[8] Endres W, Spuler A, Bruggencate G, Acetylcholinesterase reactivators antagonize epileptiform bursting induced by paraoxon in guinea pig hippocampal slices. ***J Pharmacol Exp Ther*** 251(1989) 1181-86.

[9] Fosbraey P, Wetherell JR, French MC, Neurotransmitter changes in guinea pig brain regions following soman intoxication. ***J Neurochem*** 54 (1990) 72-79.

[10] Ghasemi A, Sadidi A, Mohammadi M, Khoshbaten A, Asgari A, Paraoxon inhibits GABA uptake in brain synaptosomes. ***Toxicol In Vitro*** 21 (2007) 1499-504.

[11] Harrison PK, Sheridan RD, Green AC, Scott IR, Tattersall JEH, A guinea pig hippocampal slice model of organophosphate-induced seizure activity. ***J Pharmacol Exp Ther*** 310 (2004) 678-86.

[12] Hoogland G, Blomenröhr M, Dijselbloem H, Wit M, Spierenburg HA, Veelen CWM, Rijen PC, Huffelen AC, Gispen WH, Graan PNE, Charactrization of neocortical and hippocampal synaptosomes from temporal lobe epilepsy patients. ***Brain Res*** 837 (1999) 55-66.

[13] Kanner B, Bendahan A, Two pharmacologically distinct sodium - and chloride – coupled high-affinity γ-aminobutyric acid and transporters are present in plasma membrane vesicles and reconstituted preparations from rat brain. ***Proc Natl Acad Sci*** 87 (1990) 2550-54.

[14] Karr PP, Matin MA, Possible role of γ-aminobutyric acid in paraoxon induced convulsions. ***J Pharm Pharmacol*** 24 (1972) 996-97.

[15] Lallement G, Carpentier P, Collet A, Pernot-Marino I, Baubichon D, Blanchet G, Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus. ***Brain Res*** 563 (1991) 234-40.

[16] Liu DD, Ueno E, Ho IK, Hoskins B, Evidence that alterations in γ-aminobutyric acid and acetylcholine in rat striata and cerebella are not related to soman-induced convulsions. ***J Neurochem*** 51 (1988) 181-87.

[17] McCormick DA, GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. ***J Neurophysiol*** 62 (1989) 1018-27.

[18] McDonough JH, Shih TM, Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. ***Neurosci Bio behave Rev*** 21(1997) 559-79.

[19] Moss DW, Henderson AR, Clinical enzymology. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. ***Tietz textbook of clinical chemistry.*** 2end ed. USA: W. B. Saunders Company, 1994, p. 812-18.

[20] Patrylo PR, Spencer DD, Williamson A, GABA uptake and heterotransport are impaired in the dentate gyrus of epileptic rats and humans with temporal lobe sclerosis. ***J Neurophysiol*** 85 (2001) 1533-42.

[21] Prioux-Guyonneau M, Coudray-Lucas C, Coq HM, Cohen Y, Wepierre J, Modification of rat brain 5-hydroxytryptamine metabolism by sublethal doses of organophosphate agents. ***Acta Pharmacol et Toxicol*** 51 (1982) 278-84.

[22] Raiteri L, Giovedi S, Benfenati F, Raiteri M, Bonanno G, Cellular mechanisms of the acute increase of glutamate release induced by nerve growth factor in rat cerebral cortex. ***Neuropharmacology*** 44 (2003) 390-402.

[23] Raiteri L, Raiteri M, Synaptosomes still viable after 25

years of superfusion. ***Neurochem Res*** 25 (2000) 1265-74.

[24] Rocha ES, Swanson KL, Aracava Y, Goolsby JE, Maelicke A, Albuquerque EX, Paraoxon: cholinesterase-independent stimulation of transmitter release and selective block of ligand-gated ion channels in cultured hippocampal neurons. ***J Pharmacol Exp Ther*** 278 (1996) 1175-87.

[25] Rump S, Kowalczyk M, Management of convulsions in nerve agent acute poisoning: a polish perspective. ***J Med Chem Def*** 1 (2004) 1-14.

[26] Santos HR, Cintra WM, Aracava Y, Maciel CM, Castro NG, Albuquerque EX, Spine density and dendritic branching pattern of hippocampal CA_1 pyramidal neurons in neonatal rats chronically exposed to the organophosphate paraoxon. ***Neurotoxicology*** 25 (2004) 481-94.

[27] Shahroukhi A, Ghasemi A, Poorabdolhossein F, Asgari A, Khoshbaten A, The effect of paraoxon on GABA uptake in rat cerebellar synaptosomes. ***Med Sci Monit*** 13 (2007) 194-99.

[28] Shih TM, Koviak TA, and Capacio BR, Anticonvulsants for poisoning by the organophosphorus compound soman: Pharmacological mechanisms. ***Neurosci Biohav Rev*** 15 (1991) 349-62.

[29] Shih TM, McDonough JH, Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. ***J Appl Toxicol*** 17(1997) 255-64.

[30] Sutch RJ, Davies CC, Bowery NG, GABA release and uptake measured in crude synaptosomes from Gentic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg (GAERS). ***Neurochem Int*** 34 (1999) 415-25.

[31] Szilagyi M, Gray PJ, Dawson RM, Effects of the nerve agents soman and tabun on the uptake and release of GABA and glutamate in synaptosomes of guinea pig cerebral cortex. ***Gen Pharmacol*** 24 (1993) 663-68.

[32] Van Halden HPM, Bueters TJH, Protective activity of adenosine receptor agonists in the treatment of organophosphate poisoning***. Tips*** 20 (1999) 438-40.

[33] Wonnemann M, Singer A, Müller WE, Inhibition of synaptosomal uptake of ^{3}H-L-glutamate and ^{3}H-GABA by hyperforin, a major constituent of St. John's Wort: the role of amiloride sensitive sodium conductive pathways. ***Neuropsychopharmacol*** 23 (2000) 188-97.