[Article in Persian] Physiology and Pharmacology Vol. 10, Fall 2006, 229-238

The inhibitory effect of Paraoxon on cerebellar synaptosome GABA uptake in rats

Ameneh Shahroukhi[1], Asghar Qassemi[2], Fereshteh Pourabdolhossein[3], Ali Khoshbaten[2], Alireza Asgari[2*]

[1]*District Health Center Shahre Ray, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*
[2]*Dept. Physiology and Biophysics and Research Center for Chemical Injuries, Baqiyatallah (a.s.) University Medical Sciences, Tehran, Iran.*
[3]*Dept. Physiology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran Iran.*

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020

Abstract

Introduction: Compounds which are used to treat organophosphate (OP) poisoning are not able to fully alleviate long lasting effects. They are mainly used to antagonize cholinergic effects of Ops. However, non-cholinergic effects, such as interference with different neurotransmitter systems, especially GABA release and uptake, are recently attracting more attentions. We have tried to investigate any potential interaction between paraoxon and GABA uptake.

Methods: We used cerebellar synaptosomes. Cerebellum of 250-280 g Wistar rats were rapidly dissected out, homogenized, centrifuged, and incubated with 0.01 μM [^{3}H]GABA in the presence of different doses of paraoxon for 10 minutes at 37 ^{o}C. At the end of the incubation period, synaptosomes were layered in chambers of superfusion system. In order to assay the amounts of [^{3}H]GABA taken up, radioactivity was measured using a β-counter.

Results: Our findings reveal that mean GABA uptake was 111.42, 95.37, 71.6, 73.53 and 75 percent of the control values in the presence of different concentrations of paraoxon (0.01, 0.1, 1, 10 and 100 μM) respectively. GABA uptake was significantly reduced at doses 1, 10 and 100 μM ($p<0.05$).

Conclusion: It seems that paraoxon at higher doses may interfere with GABA uptake by cerebellar synaptosomes.

Keywords: Organophosphate, Paraoxon, Superfusion, Synaptosome, GABA

* Corresponding Author Email: asgari@bmsu.ac.ir

فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۵

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020

اثر مهاری پاروکسان در برداشت گابا در سیناپتوزوم مخچه موش

آمنه شاهرخی[۱]، اصغر قاسمی[۲]، فرشته پورعبدالحسین[۳]، علی خوش‌باطن[۲] و علیرضا عسگری[۲*]
۱- شبکه بهداشت و درمان شهرستان ری
۲- گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک و مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...«عج»
۳- گروه فیزیولوژی دانشگاه تربیت مدرس

دریافت: تیر ۸۵ بازبینی: آبان ۸۵ پذیرش: آذر ۸۵

چکیده

مقدمه: ترکیباتی که امروزه برای درمان اثرات طولانی مدت ارگانوفسفات‌ها استفاده می‌شوند، کارآمد نیستند. این داروها برای درمان عوارض کولینرژیکی ارگانوفسفات‌ها به کار می‌روند، حال آنکه ترکیبات ارگانوفسفات علاوه بر اثرات کولینرژیکی واجد اثرات غیر کولینرژیکی نیز می‌باشند که یکی از آنها درگیری سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری، بخصوص مسیرهای گاباارژیک است. مرحله برداشت گابا می‌تواند تحت تاثیر گازهای شیمیایی قرار بگیرد. بمنظور بررسی هر گونه تداخلی بین پاروکسان و برداشت گابا از فضای سیناپسی ما از سیناپتوزوم‌های مخچه موش استفاده کردیم.

روش‌ها: مخچه پس از خارج کردن از جمجمه، هموژنیزه، و سانتریفوژ شد، سپس سیناپتوزوم‌های به دست آمده از این فرایند با گابای نشان‌دار شده با تریتیوم با غلظت ۰/۰۱ میکرومولار، در حضور دوزهای مختلف پاروکسان در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شدند. با استفاده از دستگاه سوپرفیوژن سیناپتوزوم‌ها از مایع اطراف خود جدا شدند. در نهایت گابای نشان‌دار، توسط دستگاه شمارشگر اشعه بتا شمارش شد و از این طریق مقدار برداشت گابا توسط سیناپتوزوم‌ها محاسبه شد.

یافته‌ها: بررسی ما در دوزهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و۱۰۰ میکرومولار پاروکسان صورت گرفت. میانگین مقدار برداشت گابا در این دوزها به ترتیب: ۱۱۱/۴۲، ۹۵/۳۷، ۷۱/۶، ۷۳/۵۳ و ۷۵ درصد مقادیر گروه کنترل بود، که این تغییرات در دوزهای۱، ۱۰ و۱۰۰ میکرومولار از نظر آماری معنی‌دار بودند با$p<0/05$).

نتیجه‌گیری: به این ترتیب به نظر می‌رسد پاروکسان توانسته است در دوزهای بالاتر، برداشت گابا توسط سیناپتوزوم‌های مخچه موش را مهار کند. با توجه به تاثیر برداشت گابا در رهایش مجدد آن مهار برداشت می‌تواند منجر به کاهش تاثیر مهاری سیستم گابا شود، این مسیر می‌تواند یکی از مسیرهای اثر گذاری ارگانوفسفات‌ها در بروز تشنج باشد.

واژه‌های کلیدی: ارگانوفسفات، پاروکسان، سوپرفیوژن، سیناپتوزوم، گابا.

* پست الکترونیک نویسنده مسئول مکاتبات:
asgari@bmsu.ac.ir

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020

مقدمه

مواجهه با مهار کننده‌های کولین استراز علایم توکسیک فراوانی از خود به جا می‌گذارد. شناخته شده‌ترین اثرات این عوامل ناشی از خاصیت آنتی کولین استرازی آن‌هاست. مهار آنزیم کولین استراز موجب تجمع استیل کولین در سیناپس‌های کولینرژیک می‌شود. فعالیت‌های تشنجی تحت القای این ترکیبات سریعا به تشنج پایدار منجر می‌شوند که ضایعات جبران ناپذیری برای مغز به همراه دارد. استفاده از درمان‌های کلاسیک مانند: دیازپام ،اکسایم‌ها و آتروپین در پریمات‌ها نشان می‌دهد که این درمانها حتی در صورتیکه سریعا آغاز شوند، نمی‌توانند مانع آسیب‌های مغزی شوند[۱]. اختلالات در صورتی برطرف می‌شوند که هر گونه عدم تعادل نروشیمیایی که منجر به ایجاد و ابقای تشنج شده است، برطرف شود[۲۰] و از اینجا، این تئوری که سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری در شروع و ابقای این نوع تشنج دخالت دارند، مطرح شد. از آنجایی که سیستم گاباارژیک عمده‌ترین سیستم مهاری در CNS است بررسی‌های زیادی پیرامون آن صورت گرفته است. این سیستم بحث انگیزترین سیستم نوروترانسمیتری می‌باشد چرا که اکثر تحقیقات به نتایج متفاوتی ختم شده است و مطالعات در این زمینه همچنان ادامه دارد.

گابا پس از رهایش توسط سیستم ترانسپورتری سلولهای عصبی و گلیال برداشت می‌شود و برای رها شدن مجدد آماده می‌شود، لذا هر عاملی که بتواند به نحوی بر پروسه برداشت ترانسمیتر مذکور تداخلی ایجاد کند، می‌تواند در تضعیف و یا تقویت سیستم گاباارژیک CNS اعمال نفوذ کند. ترانسپورترهای گابا در شرایط خاص فیزیولوژیک و پاتولوژیک قادرند علاوه بر برداشت گابا بصورت معکوس عمل کرده و حرکتی در خلاف جهت برداشت انجام دهند، یعنی اقدام به پمپ کردن ترانسمیتر به خارج سلول نمایند[۲]. این الگوی رهایش در واقع نوعی رهایش گابا به صورت غیر وزیکولی و مستقل از یون کلسیم است[۵]. اثرات ارگانوفسفره‌هایی ازقبیل سومان و تابون بر برداشت گابا در سیناپتوزوم‌های خوکچه هندی مورد بررسی قرار گرفته است که نشان می‌دهد سموم فوق در غلظت بالا منجر به کاهش برداشت گابا می‌گردد[۲۱]، اما در مورد اثر پاروکسان که متابولیت نوروتوکسیک پاراتیون می‌باشد بر برداشت گابا اطلاعات چندانی در دست نیست. با توجه به اینکه این ترکیبات در صورت بروز مسمومیت عوارض متعددی از قبیل نقایص حرکتی، نقایص قلبی و عروقی، اختلالات رفتاری، تعقلی، روانی و همچنین مسمویت‌های عصبی که به صورت پلی‌نروپاتی دیررس همراه با دژنراسیون اکسونی را به همراه خواهند داشت، ضرورت بررسی بیشتر پیرامون آنها مطرح می‌شود.

مخچه به واسطه‌ی داشتن ویژگی‌های بافت‌شناسی و عملکردی منحصر به فرد محل خوبی برای بررسی این اثر می‌باشد. وجود مقادیر نسبتاً زیاد آنزیم استیل کولین استراز (در مقایسه با سیستم کولینرژیک ناچیز این بافت)[۹] و همچنین وجود گابا به عنوان یکی از میانجی‌های عصبی اصلی در مخچه از جمله دلایلی است که این بافت را جهت ارزیابی اثرات مستقیم و مستقل ترکیبات ارگانوفسفره بر سیستم گاباارژیک متمایز می‌کند، چرا که به دنبال مواجهه با این ترکیبات و مهار آنزیم استیل کولین استراز به دلیل ناچیز بودن مقدار اولیه استیل کولین در محیط احتمال ازدیاد آن و تأثیر بر سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری، بسیار کمتر خواهد بود. ناچیز بودن مقدار استیل کولین در این ناحیه در حدی است که می‌توان آنرا نادیده گرفت[۱۰]. لازم به ذکر است که در این تحقیق از موش نر بالغ استفاده شده است که با توجه به اینکه مخچه‌ی بالغ نسبت به سایر نواحی مغز سیستم کولینرژیک باز هم کمتری دارد[۷] حداقل تداخل سیستم کولینرژیکی صورت می‌گیرد. این مطالعه با استفاده از سیناپتوزوم و متد سوپرفیوژن قصد دارد اثر احتمالی پاروکسان در برداشت گابا را در این نقطه از سیستم اعصاب مرکزی بررسی کند.

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020

مواد و روش‌ها

مواد. [^{3}H]GABA با فعالیت ویژه ۹۹ کوری در هر میلی مول و کوکتل سنتیلاسیون* نوع ASCII از شرکت آمرشام (انگلستان) و آمینواکسی استیک اسید، پاروکسان و سایر مواد آزمایشگاهی لازم جهت تهیه بافرهای مورد نیاز این تحقیق (محلول‌های هموژناسیون، استاندارد و تحریک) از شرکت سیگما خریداری شدند.

حیوانات. در این مطالعه از موش‌های بالغ نر نژاد ویستار با وزن ۲۸۰-۲۲۰ گرم استفاده شد برای هر ست آزمایش از مخچه یک موش استفاده شد. حیوانات تا زمان آزمایش در شرایط حرارت ۱±۲۲ درجه سانتیگراد و سیکل نوری ۱۲ ساعته با دسترسی آزاد به آب و غذا نگهداری می‌شدند. تمامی آزمایش‌ها منطبق با موازین دانشگاه در مورد کار با حیوانات آزمایشگاهی انجام شد.

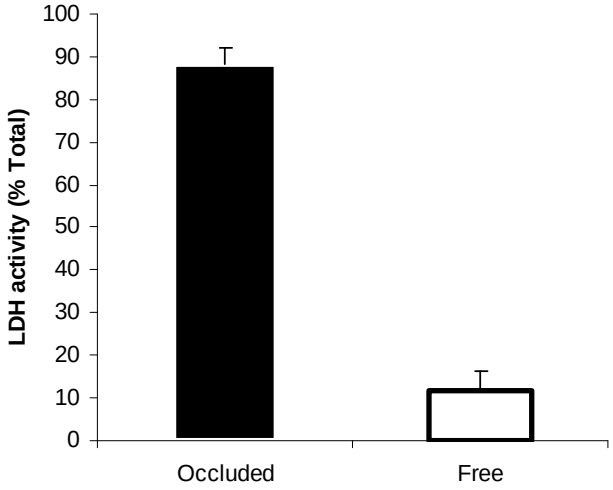
تهیه سیناپتوزوم. با استفاده از پنبه آغشته به دی‌اتیل‌اتر در دسیکاتور، حیوان را بیهوش کرده و پس از جدا نمودن سر با دو برش قیچی (از دو طرف محل سوراخ ماگنوم به سمت برگما) جمجمه جدا و نسبت به جداسازی مخچه از پایکهای آن اقدام شد. تمام مراحل بعدی در حرارت ۴-۰ درجه سانتیگراد انجام شد. سیناپتوزوم‌ها بر اساس روش Maura تهیه شدند [۱۶]، به این صورت که بعد از تمیز کردن و توزین، مخچه در بافر هموژناسیون (با نسبت حجمی ۴۰ برابر) گذاشته شد. این محلول شامل سوکروز ۰/۳۲ مولار می‌باشد که با فسفات ۰/۱ مولار pH آن در ۷/۴ تنظیم شده است. این بافر و کلیه محلول‌هایی که از این مرحله به بعد در تماس با سیناپتوزوم‌ها قرار دارند باید حاوی آمینواکسی استیک اسید با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار باشند. ماده اخیر یک مهار کننده آنزیم گابا ترانس آمیناز است که به منظور ممانعت از تبدیل گابای نشاندار با تریتیوم به متابولیت‌های دیگر و اطمینان از اینکه رادیواکتیویته سنجش شده به طور عمده مربوط به GABA [^{3}H] می‌باشد، استفاده می‌شود.

سپس با استفاده از دستگاه هموژن‌کننده با سرعت چرخش ۹۰ دور در دقیقه و ۲۵ حرکت مخچه به طور کامل هموژن شد. نمونه هموژن مخچه به مدت ۵ دقیقه و با شتاب ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شد و بعد از جدا سازی مایع‌رویی و معلق‌سازی مجدد رسوب در همان حجم از بافر هموژناسیون، به مدت ۵ دقیقه و با شتاب ۱۰۰۰g یک بار دیگر سانتریفیوژ گردید. رسوب این مرحله که حاوی نمونه‌های سیناپتوزومی بود در حجم مناسبی از محلول استاندارد به آرامی حل گردید. مواد و غلظت آنها در این محلول عبارت بودند از:کلرید سدیم، ۱۲۵؛ کلرید پتاسیم، ۳؛ سولفات منیزیوم، ۱/۲؛ کلرید کلسیم، ۱/۲؛ فسفات هیدروژن سدیم، ۱؛ کربنات هیدروژن سدیم، ۲۲؛ گلوکز، ۱۰ و آمینواکسی استیک اسید، ۰/۱؛ (همه غلظت‌ها بر حسب میلی مولار است). همیشه قبل از استفاده از محلول استاندارد، محلول در حرارت اتاق به مدت ۳۰ دقیقه با کربوژن هوادهی می‌شد. این کار برای تنظیم pH محلول در محدوده ۷/۴ الزامی بود.

در این مطالعه تعیین غلظت نهایی پروتئین در سیناپتوزوم به میزان mg/ml ۱ بر اساس روش بردفورد اندازه گیری شد [۳]. صورت گرفت، در مرحله Pre-incubation به منظور درگیر کردن سیستم‌های ترانسپورتری با عامل مداخله گر (دوزهای مختلف پاروکسان) سیناپتوزوم به میزان ۰/۵ میلی لیتر در لوله‌های اپندروف جداگانه قرار داده شد. هر اپندروف معرف یک گروه می‌باشد. سپس به گروه تست پاروکسان اضافه شد. سایر گروهها عبارت بودند از: گروه نیپکوتیک اسید که یک مهارکننده اختصاصی سیستم ترانسپورتری گابا است و به منظور اطمینان از حساسیت متد برای تعیین مقدار مهار برداشت استفاده می‌شود، گروه کنترل که در این مرحله هیچ چیز دریافت نمی‌کند و گروه حلال که فقط حلال پاروکسان یعنی دی متیل سولفوکساید(DMSO) به آن اضافه شد. مرحله Pre-incubation به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق برای تمام گروه‌ها یکسان بود. سپس در مرحله انکوباسیون بافت‌های سیناپتوزومی به مدت ۱۰ دقیقه به بن‌ماری شیکردار در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انتقال داده شده و با گابای نشاندار با غلظت نهایی ۰/۰۴ میکرومول مواجه و به سیستم ترانسپورتری فرصت

[1] Scintillation cocktail

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020



نمودار ۱– درصد فعالیت آنزیم لاکتات دهیدرژنازدر فضای داخل و خارج سیناپتوزومی. مقدار لاکتاتدهیدرژناز درون سیناپتوزوم معادل ۸۸/۳۸٪ لاکتاتدهیدرژناز کل می‌باشد. مقادیر فوق در هر ستون Mean ± S.E.M ۱۸دوره آزمایش است.

داده شد تا آن‌را برداشت کند، این زمان مناسب‌ترین زمان برداشت گابا بود که ما در آزمایشات خود به دست آوردیم. این مرحله با رقیق سازی و کاهش غلظت ماده نشان‌دار متوقف شد[۴]. در مرحله بعدی سیناپتوزوم موجود در هر اپندروف به یک محفظه از محفظه‌های سوپرفیوژن انتقال داده شد. به کمک پمپ پریستالتیک از طریق آسپیراسیون محتوای مخازن از قسمت پایین، سیناپتوزومها روی فیلترها لایه‌گذاری شده و سپس با حجم مناسبی از بافر استاندارد (۳ میلی لیتر) سیناپتوزومهای لایه گذاری شده شسته شدند. پس از تخلیه کامل مایع اطراف توسط پمپ پریستالتیک فیلترهای واجد سیناپتوزوم جدا شده و به دستگاه شمارشگر بتا انتقال داده شدند. به منظور اندازه‌گیری مقدار GABA [3H] از روش سنتیلاسیون مایع استفاده شد[۱۴] و سپس ویالهای واجد فیلتر به ترتیب در محفظه‌های دستگاه بتا کانتر قرار داده‌شد.

بررسی تغییرات فعالیت آنزیم لاکتات دهیدرژناز. چون در این مطالعه مقدار تغییرات LDH در نمونه‌ها به دنبال مواجهه آنها با دترژانت موثر بر غشاهای بیولوژیک مورد نظر بوده است مقدار تغییرات در مدت زمان واکنش در فواصل زمانی کوتاه و ثابت تعیین شد، به این صورت که با پیشرفت واکنش و تبدیل NADH به NAD+ مقدار جذب نوری محلول در طول موج ۳۴۰ نانومتر کاهش می‌یافت. این کاهش جذب، معرف مقدار تغییرات پیروات به لاکتات و بنابراین معیاری از مقدار فعالیت آنزیم مورد نظر یعنی LDH بود. فعالیت آنزیم فوق در حضور و عدم حضور تریتون X-۱۰۰ یک درصد صورت گرفت.

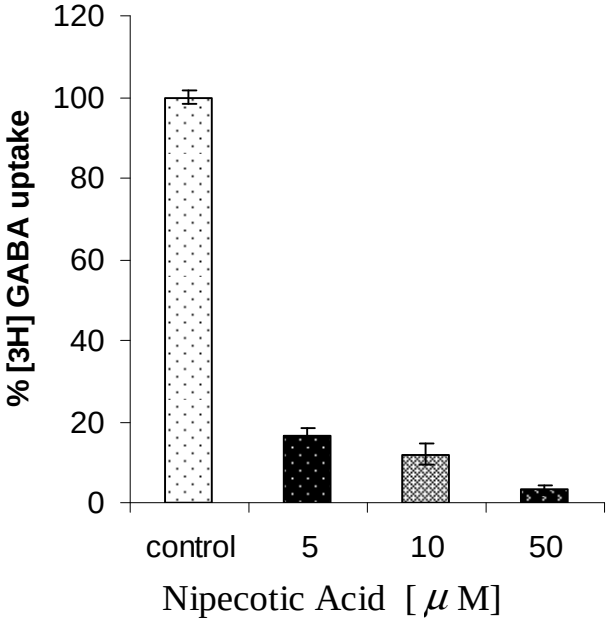
بررسی اثر پاروکسان. در این مطالعه فعالیت رادیواکتیو در نمونه‌های واجد پاروکسان که معرف غلظت گابای برداشت شده است به صورت درصد نسبت به گروه کنترل بیان شده است. به این منظور مقدار شمارش رادیواکتیو در گروه کنترل صد درصد فرض شد و شمارش رادیواکتیو در گروههای دیگر به نسبت گروه کنترل محاسبه شد. در نهایت مقایسه آماری مقادیر متناظر در بین گروههای مختلف (از نظر دوزهای مختلف پاروکسان) نسبت به گروه کنترل صورت گرفت. نتایج به صورت mean ± SEM محاسبه و در رسم منحنی‌ها به کار گرفته شده است. جهت بررسی وجود تفاوت‌های آماری معنی‌دار بین گروه‌ها از unpaired student t test در مقایسه دو گروه، و از ANOVA یک طرفه در مواردی که لازم بود بیش از دو گروه با هم مقایسه شوند، استفاده شد. برای کلیه تستهای آماری سطح معنی‌داری ۹۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

برای بررسی هر گونه تاثیر احتمالی حلال در برداشت گابا، گروه حلال (DMSO) را با غلظت ۰/۰۲٪ (یعنی بیش از غلظتی که برای تهیه بالاترین دوز پاروکسان لازم بود) مورد آزمایش قرار دادیم. در برداشت گابا بین این گروه با گروه کنترل تفاوت معنی داری مشاهده نشد و این نشان داد که این حلال در برداشت گابا نقش ندارد.

به منظور تعیین سلامت غشا از بین مارکرهای سیتوزولی مختلف، آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) به عنوان یکی از بهترین شاخص‌های سیتوزول، قابل بررسی است. به منظور محاسبه مقدار لاکتاتدهیدرژناز Occluded به این ترتیب عمل می‌شود که مقدار فعالیت لاکتاتدهیدرژناز بدون حضور دترژانت که معرف مقدار این آنزیم در خارج سیناپتوزوم است از

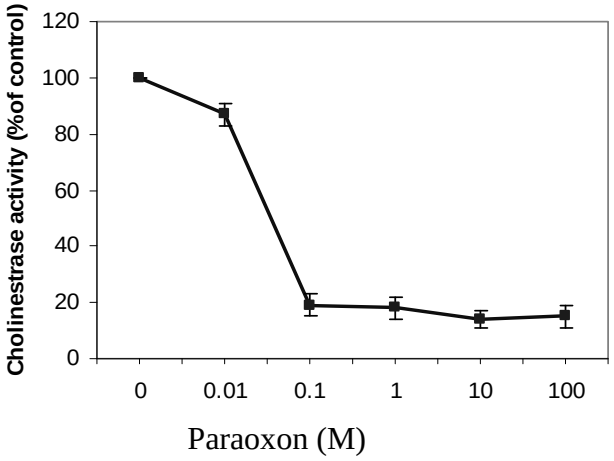
Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020



نمودار۲- بررسی کارآیی متد سوپرفیوژن در تعیین مقدار مهار برداشت میانجی‌های عصبی با استفاده از مهارکننده گابا. در محور عمودی مقدار فعالیت رادیواکتیو در گروه کنترل ۱۰۰درصد فرض شده و فعالیت رادیواکتیو در گروه‌های مختلف نیپکوتیک اسید در مقایسه با گروه کنترل می‌باشد. مقدار برداشت گابا در گروه‌ها نسبت به گروه کنترل به ترتیب دارای مقادیر۳۳/ ۱۶٪، ۱۲٪ و۳/۱۶٪ نسبت به گروه کنترل می‌باشد.
مقادیر فوق در هر ستون mean ± S.E.M شش دوره آزمایش است.

مقدار فعالیت لاکتات‌دهیدرژناز در مواجه با دترژانت که معادل مقدار کل این آنزیم (در خارج و داخل سیناپتوزوم) است کسر می‌گردد، به این ترتیب مقدار لاکتات‌دهیدرژناز موجود در درون سیناپتوزوم به‌دست می‌آید. روش تجزیه تحلیل آماری در این آزمایش Paired t test بود که به واسطه آن میزان فعالیت آنزیم محصور شده داخل سیناپتوزوم نسبت به کل ۲/۳۷±۸۸/۳۸٪ (n=۱۸) به‌دست آمد که کمیت فوق از لحاظ آماری با p <۰/۰۵ معنی دار بود(نمودار ۱)، به این ترتیب با توجه به فراوانی مقدار LDH در داخل سیناپتوزوم نسبت به خارج آن سلامتی سیناپتوزوم‌های مورد تست تایید شد.

از نیپکوتیک اسید (به عنوان شناخته شده‌ترین مهار کننده برداشت گابا)، برای مقایسه‌ی برداشت گابا در حضور پاروکسان استفاده شد، این ترکیب در in vivo برداشت گابا را در یک وضعیت وابسته به غلظت مهار می‌کند[۱۱]. نتیجه آزمایش‌ها با



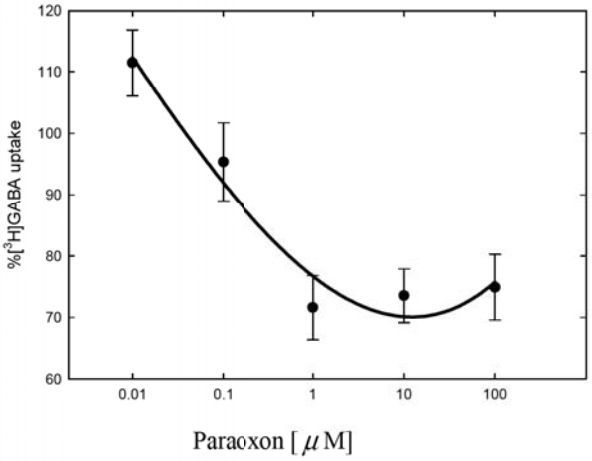
نمودار۳- اثر مهاری دوزهای مختلف پاروکسان بر فعالیت آنزیم کولین استراز در سیناپتوزوم‌های مخچه.
بجز غلظت ۰/۰۱ میکرومولار، سایر دوزها فعالیت آنزیم را به حد ۲۰٪ مقدار اولیه تقلیل دادند. مقادیر فوق در هر ستون mean ± S.E.M ۸ دوره آزمایش است.

استفاده از روش ANOVA یک طرفه مورد آنالیز آماری قرار گرفتند طبق نمودار ۲ مشاهده می‌شود که دوزهای مختلف نیپکوتیک‌اسید در سیناپتوزوم‌های مخچه در یک وضعیت وابسته به دوز قادر به مهار برداشت گابا می‌باشند.

جهت تایید اثر پاروکسان حل شده در حلال، فعالیت آنزیم کولین استراز در محلول سیناپتوزومی در حضور و عدم حضور دوزهای مختلف پاروکسان (۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰و۱۰۰ میکرومول) اندازه‌گیری شد(نمودار ۳). این دوزها به ترتیب باعث ۱۳، ۸۱، ۸۲، ۸۶ و ۸۵ درصد مهار آنزیم استیل کولین استراز شدند که در همه‌ی دوزها بجز ذوز ۰/۰۱، در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار بود (p<۰/۰۱).

به منظور بررسی اثر پاروکسان در برداشت گابا در سیناپتوزوم‌های مخچه فعالیت رادیواکتیویته هر نمونه محاسبه و جهت مقایسه بین گروه کنترل و پاروکسان، مورد استفاده قرار گرفت. این کار در مورد هر یک از غلظت‌های: ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و۱۰۰ میکرومولار پاروکسان انجام شد. آنچه در انتهای هر آزمایش سنجیده می‌شود مقدار فعالیت رادیواکتیویته در فیلترهای هر گروه است (نمودار ۴). مقدار برداشت گابا در این دوزها به ترتیب: ۱۱۱/۴۲، ۹۵/۳۷، ۷۱/۶، ۷۳/۵۳ و ۷۵ درصد نسبت به

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020



نمودار۴- مقدار فعالیت رادیواکتیو هر نمونه به صورت درصدی از مقدار کل رادیواکتیو موجود در گروه کنترل محاسبه شده و به‌صورت[^{3}H]GABA uptake ٪ در محور عمودی تعریف شده است. مقدار فعالیت رادیواکتیو در گروه کنترل ۱۰۰٪ فرض شده و در گروه‌های: ۰/۰۱، ۰/۱، ۱، ۱۰ و۱۰۰ پاروکسان به‌ترتیب: ۱۱۱/۴۲، ۹۵/۳۷، ۷۱/۶، ۷۳/۵۳ و ۷۵ درصد نسبت به گروه کنترل است.
مقادیر فوق در هر نقطه mean ± S.E.M ۸ دوره آزمایش است. نقاط توسط یک معادله درجه سوم $Y = b_0 + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$ و بر اساس روش حداقل فاصله مربعات با استفاده از نرم‌افزار ΣPlot به یکدیگر مرتبط شده است(Line of best fit).

گروه کنترل می‌باشد. در مقایسه‌ی این نمودار با نمودار۳ باید گفت، در نمودار ۳ بیشترین مهار آنزیم استیل کولین استراز در دوزهای۰/۱، ۱، ۱۰ و۱۰۰ میکرومولار صورت گرفته اما در نمودار کاهش برداشت دوز ۰/۱ علیرغم مهار آنزیم استیل کولین استراز در میزان برداشت گابا اختلالی ایجاد نکرده است، لذا به نظر می‌رسد مهار برداشت گابا توسط پاروکسان مستقل از سیستم کولینرژیکی اتفاق می‌افتد، هر چند ما در این مطالعه تداخلات سیستم کولینرژیکی را بررسی نکردیم.

بحث

در تحقیق حاضر پاروکسان توانسته است در دوزهای میکرومولار در برداشت گابا توسط سیناپتوزوم‌های مخچه اختلال ایجاد کند. با توجه به اثر سمیتی پاروکسان به صورت بروز تشنج و استفاده از داروهای محرک سیستم گاباارژیک برای مقابله با این تشنج[۲۴] به نظر می‌رسد یکی از اثرات پاروکسان می‌تواند کاهش گابای موجود در فضای سیناپسی و یا افزایش فعالیت سیستم‌های تحریکی (از جمله سیستم گلوتامرژیک) باشد. علیرغم گزارش‌های معدودی که در مورد اثر پاروکسان بر سیستم گابا وجود دارد نتایج این تحقیقات از تنوع زیادی برخوردار است[۱۲]. در برخی مطالعات مطرح شده که سطح گابا در تشنج ناشی از پاروکسان در مدلهای حیوانی و در مطالعات *in vivo* کاهش یافته و داروهای افزاینده سطح گابا تشنج فوق را از بین می‌برند[۱۳]. این نکته مبین این است که تشنج ناشی از ارگانوفسفاتها می‌تواند در اثر کاهش سطح گابای مغز باشد[۲۳]. گروهی دیگر در مطالعات *in vivo* افزایش سطح گابا را در کورتکس، هیپوکمپ و استریاتوم در رت و خوکچه هندی گزارش کرده‌اند[۸]. در این بین گروه سومی هم هستند که گزارش کرده‌اند در مطالعات *in vitro* سطح گابا در هیچ یک از مناطق مغزی رت‌های مسموم تغییر نمی‌کند[۶]، که برخی مطالعات *in vivo* نیز این نظر را تایید می‌کنند[۱۵]. در مطالعاتی که سالهای اخیر به صورت *in vitro* در بافتهای سیناپتوزومی صورت گرفته افزایش گابا در تشنج ناشی از Nerve agentها گزارش شده‌است[۲۱] هر چند در رابطه با مسیر این افزایش، ذکری به میان نیامده است. نمونه‌هایی که در مطالعه ما مورد استفاده قرار گرفته‌اند از نظر معیارهای بیوشیمیایی و عملکردی واجد ویژگی‌های خاص یک سیناپتوزوم بودند. پیوستگی و سلامت غشای آنها با سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز مورد تأیید قرار گرفت، از نظر عملکردی نیز با قرار دادن یک گروه نیپکوتیک اسید در هر سری آزمایش دقت متد، صحت بافت و عملکرد صحیح سیستم ترانسپورتری مورد تایید قرار گرفت. در مورد محل تهیه سیناپتوزوم به نظر می‌رسد، مخچه موش بالغ نسبت به سایر نواحی مغز از موقعیت مناسب‌تری برخوردار باشد. وجود پایانه‌های گاباارژیک، یک دست بودن آرایش سلولی و تنوع کمتر میانجی‌های عصبی در نقاط مختلف مخچه از نکات مثبت این ناحیه است. مهمتر از همه فعالیت بسیار مختصر سیستم کولینرژیک در مخچه بالغ است که نسبت به سایر نواحی مغز کمترین مقدار را دارد و

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020

احتمال مداخله مکانیسم‌های پیش سیناپسی کولینرژیک را بر برداشت گابا به کمترین حد تقلیل داده‌است. به نظر می‌رسد در این شرایط امکان شناسایی اثرات مستقیم و غیر وابسته به استیل‌کولین با سهولت بیشتری امکان‌پذیر خواهد بود.

همانطور که در بخش یافته‌ها مشاهده شد اثر پاروکسان در دوزهای ۰/۰۱ μM و ۰/۱ μM در برداشت گابا چشمگیر نیست، اما قادر است در دوزهای میکرومولار روند برداشت گابا را متأثر کند. در نگاه اولیه به نظر می‌رسد مهار برداشت گابا منجر به افزایش گابا در فضای سیناپسی شده که می‌تواند در شرایط تشنجی مفید باشد. اما اهمیت عمل برداشت گابا توسط ترانسپورتر در این است که گابای برداشت شده می‌تواند مجددا برای رهایش در اختیار نرون پیش سیناپسی قرار گیرد و به همین دلیل غلظت گابا در فضای سیناپسی تحت تاثیر افزایش فعالیت ترانسپورتر به سرعت زیاد می‌شود[۱۹] در این شرایط پتانسیل‌های پس سیناپسی مهاری گاباارژیک(IPSP) افزایش می‌یابد[۲۴]، در برخی مطالعات گزارش شده که میزان mRNA GAT_1 با مقدار IPSP متناسب است[۱۷]. به نظر می‌رسد هر چقدر فعالیت سیستم ترانسپورتری زیاد شود ایمپالسهای مهاری ناشی از گابا نیز زیاد می‌شود.

با توجه به نظر اکثر محققین، عموم مهارکننده‌های ترانسپورتر گابا از قبیل NNC-711 ، βـ آلانین و نیپکوتیک اسید انتقال میانجی را در هر دو جهت بلاک می‌کند[۲۲] و مهار برداشت گابا توسط این مهار کننده‌ها از یک وضعیت وابسته به غلظت تبعیت می‌کند و اگر غلظت آنها از حدی بیشتر شود نه تنها عمل ترانسپورتر در جهت برداشت را بلاک می‌کند، بلکه عمل آنرا نیز معکوس می‌کند [۱۱]. رهایش معکوس گابا (چه از سلول‌های گلیال و چه نرونی) سهم زیادی در میزان گابای موجود در فضای سیناپسی دارد و زمانی که به هر دلیلی (کاهش فعالیت ترانسپورتر) سطح گابای درون سلولی کم شود، این رهایش غیر وزیکولی متوقف می‌شود[۱۱]. در شرایط فیزیولوژیکی که uptake گابا شدت پیدا می‌کند، به واسطه فرآیند الکتروژنیک بودن پدیده فوق و ایجاد بارهای مثبت در غشا، عمل رهایش غیر وابسته به یون کلسیم گابا یا بعبارتی برداشت معکوس گابا نیز تشدید می‌شود[۱۸]. در موارد پاتولوژیک که به دلایل مختلف در غلظت سدیم درون سلولی یا ولتاژ غشاء تغییراتی حاصل می‌شود (از قبیل، ایسکمی یا تشنج) فرآیند مشابهی به وقوع می‌پیوندد[۱۸]. محققین معتقدند که این معکوس شدن عمل ترانسپورترهای گابا چون باعث رهایش گابا بعنوان یک نوروترانسمیتر مهاری می‌شود واجد اثرات محافظتی در حین تشنج است. بنابراین احتمال دارد این مسیر یکی از مسیرهای درگیر کردن سیستم ترانسمیتری گابا در حین مسمومیت با ترکیبات ارگانوفسفات باشد که می‌تواند در بروز تشنج مقاوم به درمان نقش داشته باشد.

اگر چه تداخل سیستم کولینرژیک با گاباارژیک در مخچه حداقل است[۱۰] اما با توجه به نتایج بررسی فعالیت آنزیم کولین استراز و مهار این آنزیم در دوزهای مورد بررسی، احتمال اثر گذاری پاروکسان بر این سیستم از طریق مهار استیل کولین استراز، احتمالی است که نباید نادیده گرفته شود، لذا استفاده از آنتاگونیست‌های سیستم کولینرژیکی مسیری است که پیشنهاد می‌شود و در صورتیکه اثر مستقیم پاروکسان بر سیستم ترانسپورتری گابا تأیید شود، عملکرد بعدی می‌تواند تعیین نوع ترانسپورتری از گابا باشد که بیشترین تاثیر را از پاروکسان می‌گیرد.

تشکر و قدردانی

از دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله به جهت حمایت مالی این کار قدردانی می‌شود. همچنین از سرکار خانم بهاره سلیمانی به جهت همکاری در کلیه مراحل آزمایشگاهی سپاسگزاریم.

منابع

[1] Allement G, Clarenson D, Masqueliez C, Mestries JS, Nerve agent poisoning in Primate: anti-epileptic and

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020

neuroprotective effects of GK-11. ***Arch Toxicol*** 72 (1998) 84-92.

[2] Attwell D, Nonvesicular release of neurotransmitter, ***Neuron*** 11 (1993) 401-7.

[3] 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) 248-54.

[4] Cunha RA, Constantino MD, Ribeiro JA, Inhiition of [^{3}H] GABA release by kinate receptor activation in rat hippocampal synaptosomes. ***Eur J Pharmacol*** 323 (1997) 167-72.

[5] Cordeiro JM, Sandra M, Meireles M, Graca P, Paula P, Ca^{2+} regulation of the carrier mediated γ-amino butyric acid release from isolated synaptic plasma membrane vesicles. ***Neurosci Res*** (2000) 385-95.

[6] Coudray L, Prioux M, Wepierre J, Effect of physostigmine, paroxon, and soman on brain GABA level and metabolism. ***Acta Pharmacol Toxicol*** 55 (1984) 153-7.

[7] Filippi GD, Baldwinsons T, Sher E, Evidence for nicotinic acetylcholine receptor activation in rat cerebellar slices. ***Phanamacol Biochem Be***70(2001) 447-455.

[8] Fosbracy P, Wetherall J, French M, Neurotransmitter changes in guina-pig brain region following soman into-xication. ***J Neurochem*** 54 (1990) 72-9.

[9] Jarssam D, Ruigrok TJH, Caffe R, et al.. Cholinergic innervations and receptor the cerebellum. ***Prog Brain Res*** 114(1997) 67-96.

[10] Jaarsam D, Dino MR, Cozzari C, et al.. Cerebellar choline acetyltransferase positive mossy fibers and their granule and unipolar brush cell targets: a model for central cholinergic nicotinic neurotransmission. ***J Neurocytol*** 25(1996) 829-842.

[11] Juhasz G, Kekesi K, Nyitrai G, Schousboe A, Different effects of nipecotic acid and 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-c]pyridine-3-ol on extracellular γ- aminobutyrate levels in rat thalamus. ***Eur J Pharmacol*** 331 (1997) 139-44.

[12] John H, McDonough JR, Shih T, Neuropharmacological mechanisms of nerve agent induced seizure and neuropathology. ***Neurosci Biobehav R*** 5 (1997) 559-79.

[13] Kar P and Matin M, Possible role of gamma aminobutyric acid in paraoxon inducd convulsions. ***J Pharm Pharmacol*** 24 (1972) 996-7.

[14] Larsen M, Hegstad E, Berg J, Langmoen I, Isoflurane increases the uptake of glutamate in synaptosomes from rat cerebral cortex. ***Brit J Anaesth*** 78 (1997) 55-9.

[15] Lundy P, Magor G, Shaw R, Gamma aminobutyric acid metabolism in different areas of rat brain at the onset of soman-induced convulsions. ***Arch Internet Pharmacodyn Ther*** 234 (1978) 64-73.

[16] Marcoli M, Rosu C, Bonfanti A, Raiteri M, Maura G, Inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine$_{2A}$ receptors regulate evoked glutamate release from rat cerebellar mossy fibers. ***J Pharmacol Exp Ther*** 299 (2001) 1106-11.

[17] McHugh E, Zhu W, Mailgram Sh, Mager S, The GABA transporter GAT_1 and the MAGUK protein $Pals_1$: interaction, uptake modulation, and coexpression in the brain. ***Mol Cell Neurosci*** 26 (2004) 406-17.

[18] Michael W and Quick A, editors. ***Transmembrane Transporters***. New York: Quick M W, Wiley and L John, 2002, p. 224-300.

[19] 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 Neurophysio*** l85 (2001) 1533-42.

[20] Paterson D and Nordberg A, Neuronal nicotinic receptors in the human brain. ***Prog Neurobiol*** 61 (2000) 75-111.

[21] Szilagyi M, Gray PY, 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) 663-80.

[22] Scholze P, Zwach J, Pifl C, and Sitte H, Transporter mediated release: A superfusion study on human embryonic kidney cells stably expressing the human serotonin transporter. ***J Pharmacol Exp Ther*** 293 (2000) 870-8.

[23] Wu Y, Wang W, Richerson GB, Vigabatrin induces tonic inhibition Via GABA transporter reversal without increasing vesicular GABA release. ***J Neurophysiol*** 89 (2003) 2021-34.

[24] Yee JM, Agulian S, Kocsis JD, Vigabatrin enhances promoted realease of GABA in neonatal rat optic nerve. ***Epilepsy Res*** 29 (1998) 195-200.

Downloaded from ppj.phypha.ir at 13:23 +0430 on Wednesday April 1st 2020