

بررسی اثرات به‌کارگیری باکلوفن (آگونست رسپتور GABA-B) به تنهایی و همراه با LRH-A و متاکلوپرامید بر آزادسازی GTH-I در ماهی کپور (*Cyprinus carpio L.*)

دکتر شهر بانو عریان* دکتر کاظم پریور^۱ خلیل راسخی^۱

دریافت مقاله: ۱۶ مردادماه ۱۳۷۹
پذیرش نهایی: ۴ آذرماه ۱۳۸۲

The effects of baclofen (GABA-B receptor agonist) administration alone and accompanied with LRH-A and metoclopramid on GTH-I release in carp (*Cyprinus caipio L.*)

Oryan, S.,¹ Parivar, K.,¹ Rasekhi, K.¹

¹Department of Biology, Faculty of Science, Teacher Training University, Tehran -Iran.

Objective: Investigation of possibility and the role of ?-aminobutyric acid (GABA) in the fish pituitary functional regulation, by measuring the changes in blood serum GTH-I levels.

Design: Experimental study.

Animals: Fifty sexually regressing female carps.

Procedure: Seven experimental conditions were tested. Injection with just normal saline (control or basal) and intraperitoneal injection of Bac. (9 mg/kg), LRH-A (50 µg/kg), Met. (15 mg/kg), Bac.+LRH-A, Met.+LRH-A, Bac.+ Met.+LRH-A were done. In this study fishes were bled immediately before injection and 5 hours after then.

Statistical analysis: Pre and post-treatment GTH-I values were compared by t-test and Mann-Whitney U test.

Results: Experiments indicated that only the injection of baclofen alone could produce a significant decrease in the serum GTH-I levels. Other factors, whether alone or in combination with each other did not produce acceptable changes in GTH-I secretion at least in this stage of sexual cycle.

Conclusion: The results of the present study suggest that GABA may be one modulator for serum GTH-I levels in the sexually regressing female carps.

J.Fac.Vet.Med.Univ.Tehran. 60,3:265-271,2005.

Keywords: GABA, LHRH, gonadotropin, carp.

Corresponding author's email: sh_oryan@yahoo.com

هدف: بررسی نقش احتمالی نورو ترانس‌میتور گاما آمینوبوتیریک اسید (گابا) و چگونگی تأثیر آن در تنظیم فعالیت هیپوفیزی ماهیان، با تأکید بر اندازه‌گیری تغییرات GTH-I سرم خون.

حیوانات: تعداد ۵۰ عدد کپور ماده مولد که در مرحله پس روی جنسی (Sexual regression) قرار داشتند.

روش: تعداد هفت گروه تجربی و یک گروه کنترل بترتیب جهت تزریق (IP) داروهای Bac (۹ میلی‌گرم در کیلوگرم)، LRH-A (50 µg/kg) و Met (۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) و Bac+Met، Bac+Met+LRH-A و Met+LRH-A، و Bac+LRH در حلال مشترک سالیین در نظر گرفته شد. در این پروژه دو مرحله خونگیری وجود داشت که مرحله اول قبل از تزریقات و مرحله دوم ۵ ساعت پس از تزریقات صورت می‌گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری: آزمون t-test یا Mann-whitney U-test جهت مقایسه مقادیر GTH-I سرم قبل از تیمار و بعد از تیمار.

نتایج: تجربیات نشان دادند که فقط تزریق باکلوفن به تنهایی می‌تواند کاهش معنی‌داری را در میزان GTH-I سرم ایجاد نماید. سایر فاکتورهای تزریقی، چه به تنهایی، چه در ترکیب باهم، و یا به همراه Bac قادر به ایجاد تغییرات قابل قبولی (حداقل در این مرحله از سیکل جنسی) در میزان ترشح GTH-I هیپوفیزی نیستند. نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج فوق، گابا ممکن است یکی از فاکتورهای تعدیل‌کننده میزان GTH-I خون باشد که عمدتاً از طریق تأثیر مستقیم برگنادو تروف‌های هیپوفیزی عمل می‌نماید. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۴، دوره ۶۰، شماره ۳، ۲۶۵-۲۷۱.

واژه‌های کلیدی: گابا، LHRH، گنادوتروپین، کپور.

تحقیقات و بررسی‌ها در سال‌های اخیر ثابت کرده‌اند که گابا در تنظیم ترشح هورمون‌های هیپوتالاموسی و تعدادی از هورمون‌های هیپوفیزی پستانداران شامل هورمون‌های گنادوتروپیک شرکت دارد (۹). اما نظرات و عقاید در مورد اثر مهارکنندگی یا تحریک‌کنندگی گابا در این اعمال، بحث برانگیز بوده و روشن و واضح نیستند. بر طبق نظر Scott و Glarke در سال ۱۹۹۳ گابا آزادسازی LH را به‌وسیله رسپتورهای نوع A مهار می‌نماید، در حالی که مطالعات Wilson و همکاران در سال ۱۹۹۰، ثابت نمود که گابا ترشح هورمون مزبور را با دخالت رسپتورهای نوع B مهار می‌کند. از طرف دیگر Moguilevsky و همکارانش در سال ۱۹۹۱ نقش تحریکی گابا را در ترشح گنادوتروپین پستانداران گزارش دادند، هرچند که این اثر را وابسته به بلوغ جنسی جانوران دانسته‌اند. به‌علاوه

در پستانداران نشان داده شده که گابا با چند نورو ترانس‌میتور مرکزی دیگر که در ترشح GTH-I مؤثرند (از قبیل LHRH، NE، DA، 5HT و پپتیدهای اپیوئید) در تعامل است. در ارتباط با ماهیان، گرچه اطلاعاتی مبنی بر وجود نورو نهی گابا اثریک در مغزو هیپوفیز goldfish به‌دست آمده است، اما دخالت گابا در کنترل فرآیندهای تولید مثلی، کمتر مورد مطالعه گرفته است.

تجرباتی چند نشان داده‌اند که گابا با تراکم بالایی در کمپلکس هیپوتالاموس - هیپوفیزی وجود داشته و همچنین اینکه فیبرهای گابا در ارتباط نزدیک با سلول‌های گنادوتروفی هیپوفیزی قرار دارند (۶، ۷، ۱۵).

(۱) گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران، تهران - ایران.

* نویسنده مسؤول: sh_oryan@yahoo.com



جدول ۱- گروه‌های تیماری به همراه تعداد نمونه‌ها و میانگین وزنی آنها.

گروه‌های تیماری	مواد تزریقی (IP)	تعداد نمونه	وزن بدن (kg, BW)
(۱)	Bac.(9mg/kg B.W.)	۶	۳/۳±۲
(۲)	LRH-A(50mg/kg B.W.)	۶	۳/۲±۱/۵
(۳)	Bac.+LRH-A	۶	۴/۶±۱/۵
(۴)	Met.(15mg/kg B.W.)	۸	۳/۸±۱/۵
(۵)	Bac.+Met.	۶	۲/۶±۱/۶
(۶)	Met.+LRH-A	۶	۲/۶±۱/۸
(۷)	Bac.+Met.+LRH-A	۶	۲/۴±۱/۷
(۸)	Salin	۶	۳/۷±۱/۴

زمان آزمایش: اواسط مرداد ماه؛ دمای هوا و آب در در حین آزمایش به ترتیب: ۲۶°C، ۲۱°C.

به‌طور تصادفی صید شده و توسط کامیون به محل حوضچه‌های بتنی حمل گردید. ماهیها پس از انتقال به‌طور تصادفی و با نسبت مساوی بین ۷ حوضچه تقسیم شدند.

مرحله آداپتاسیون: قبل از اجرا عملیات، ماهیها برای مدت ۳ روز بدون تغذیه و در شرایط حوضچه، با دما و فتوپریود طبیعی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) به حال خود گذاشته شدند تا کاملاً نسبت به شرایط جدید آداپته شده و استرس ناشی از حمل و نقل و تعویض مکان به حداقل برسد. در طول این مدت، با استفاده از تنظیم جریان ورود و خروج آب به حوضچه‌ها، میزان اکسیژن آنها، تقریباً در یک سطح ثابتی نگاه داشته می شدند.

داروها: داروهای مورد استفاده در تجربیات عبارت‌اند از: باکلوفن (Bac)، Baclofen) به‌عنوان آگونیست اختصاصی رسپتور گابا - B محصول شرکت Heuman pharma آلمان، متاکلوپرامید و کلراید (Met, Hcl, Metoclopramid) به‌عنوان آنتاگونیست رسپتور D2 دوپامین محصول شرکت Ledichem اسپانیا، LRH-A (Luteotropin Releasing hormone D-Ala Analog) ساخت کشور چین؛ حلال همه موارد فوق سالیین ۰/۶ درصد (Nacl) می باشد، با این تفاوت که LRH-A و Met. براحتی در سالیین حل می شوند اما برای حل نمودن باکلوفن، نیاز به تغییر موقتی PH محلول می باشد. بدین منظور ابتدا PH محلول سالیین را به وسیله مقدار کمی Na2CO3 قلیایی نموده، و پس از حل کردن پودر Bac در آن، مجدداً با اضافه نمودن قطرات اسید کلریدریک، PH محلول به حالت اولیه باز گردانده می شود. محلولهای تزریقی، بلافاصله بعد از انجام عملیات تزریق به‌طور تازه تهیه می گردید. روش تزریق در همه موارد به‌صورت داخل صفاقی (IP) بود و تقسیم بندی ماهیها به گروه‌های تیماری ۸ گانه بر اساس جدول ۱ صورت گرفت.

تحقیقات (در شرایط in vivo) نشان داده‌اند که گابا در تنظیم آزاد سازی گنادوتروپین (GTH-II) در goldfish (۶، ۱۵، ۱۸) و carp (۱۱، ۱۳) شرکت دارد، اما تاکنون تأثیر گابا بر ترشح GTH-I ماهیان مورد تجربه قرار نگرفته و تنها در پستانداران با استفاده از روش تزریق داخل بطنی مشاهده شده است که گابا قادر به القای تغییرات در میزان پلاسمایی FSH (معادل GTH-I ماهیها) نمی باشد (۱۲) گرچه همه محققین فوق الذکر بر این اصل که گابا فاکتور تعدیل کننده ترشح GTH-II می باشد، متفق القول اند، اما نظرات آنها در مورد ویژگی اثر این نوروترانسمیتر بر روی ترشح گنادوتروپین، به‌طور چشمگیر، باهم متفاوت است، به‌طوری که Kah و همکاران در سال ۱۹۹۱ و Trudeau و سایرین در سال ۱۹۹۳ اظهار کردند که گابا اثر تحریک کننده در goldfish نابالغ دارد، در حالی که Roelants و همکارانش در سال ۱۹۹۰ و Popek و دیگران در سال ۱۹۹۴ بر اثرات مهاری گابا بر روی ترشح GTH-II در کپور بالغ طی پر یود نزدیک به تخم‌ریزی تأکید داشتند. از طرف دیگر، Kah و همکارانش در سال ۱۹۹۲ در بخشی از گزارش خود با استفاده از سلولهای پراکنده هیپوفیزی در شرایط in vitro، عدم تأثیر گابا را بر تحریک آزاد سازی GTH از این سلولها اعلام نموده‌اند، اما همین محققین اثر تحریکی گابا را بر آزاد سازی GnRH از قطعات هیپوفیزی به اثبات رسانده‌اند. مطالعاتی که در این زمینه هم در محیط in vivo و هم در شرایط in vitro انجام گرفته، مربوط به Sokolowska-Mikolajczyk و همکارانش در سال ۱۹۹۷ می باشد که طی آن تأثیر تعدادی از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های رسپتورهای A و B گابا بر ترشح GTH-II القای شده با GnRH-A در طول فصل تخم‌ریزی کپور، مورد آزمایش قرار داده‌اند. این محققین از آزمایشهای خود چنین نتیجه گرفتند که گابا می تواند از طریق هر دو نوع رسپتور خود بر ترشح GTH-II از هیپوفیز کپور اثر بگذارد، اما عمدتاً اثرات خود را از طریق رسپتورهای نوع A اعمال می نماید. همچنین آنها دریافتند که رسپتورهای نوع A از طریق مهار آزاد سازی GnRH، باعث توقف ترشح GTH2 می شوند، در حالی که رسپتورهای نوع B، این عمل را به دو طریق انجام می دهند: در سطح هیپوتالاموس با مهار آزاد سازی دوپامین و در سطح هیپوفیز با مهار ترشح GnRH از پایانه‌های نورونی مربوطه. از آنجایی که تعداد انگشت شماری از تحقیقات در این زمینه آن هم عمدتاً در مراحل قبل از اوولاسیون تخم‌ریزی با هدف سنجش GTH-II انجام گرفته، لذا بر آن شدید تا در ادامه کار این محققین، نقش این نوروترانسمیتر را در مرحله پس از تخم‌ریزی (مرحله Sexual regression)، با تأکید بر سنجش GTH-I در ماهیان کپور ماده مورد بررسی و مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش کار

ماهیها: جهت انجام این پروژه حداقل به ۵۰ عدد کپور ماده مولد که در مرحله برگشت جنسی قرار داشتند نیاز بود. این تعداد ماهی در اواسط مرداد ماه (یک ماه نیم پس از اتمام فصل تخم‌ریزی)، با همکاری معاونت تکثیر و پرورش شیلات و در محل مرکز تکثیر و پرورش شهید انصاری رشت مهیا شد. بدین ترتیب که حدود ۶۰ عدد ماهی، با سن بین ۳-۸ سال و میانگین وزنی ۳/۴±۱/۷ کیلوگرم (kg, Mean±SD) از یکی از استخرهای خاکی (مترمکعب ۳۰۰) واقع در آن مرکز



ضعیفی را از نظر کاهش میزان GTH-I خون نشان دادند، که البته این اختلاف در محدوده احتمالات بیولوژیکی قابل قبول نیست ($P > 0.05$ ، نمودار ۲).

تجربه ۴ (Met): نمودار ۱ مقادیر GTH-I مربوط به قبل و بعد از تزریق متاکلوپرامید و سالیین را نمایش می دهد. در این شکل همچنین عدم اختلاف معنی دار بین مقادیر Post گروه ۴ (0.39 ± 0.07) و گروه کنترل قابل تشخیص است ($P > 0.05$).

تجربه ۵ (Met.+Bac.): تزریق این دو ماده چه در مقایسه با گروه Met و چه گروه کنترل، اثر معنی داری را حداقل در سطح $P < 0.05$ بر میزان ترشح I-GTH نشان ندادند. در اینجا به علت تفاوت معنی دار بین مقادیر پایه I-GTH این گروه (0.74 ± 0.02) با گروه ۴، از درصد تغییرات I-GTH نسبت به زمان صفر استفاده شد (نمودار ۲). که باز هم بر عدم وجود یک اختلاف معنی دار بین آنها تأکید دارد ($P > 0.05$).

تجربه ۶ (Met+LRH-A): آنالیز آماری داده ها نشان دادند که هیچ گونه تفاوت معنی داری بین سطوح I-GTH بعد از تزریق (0.34 ± 0.02) و قبل از تزریق (0.41 ± 0.08) و همچنین در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد. به همین ترتیب بین این گروه با گروه تیماری LRH-A نیز تفاوت قابل قبولی وجود نداشت ($P > 0.05$ ، نمودار ۱).

تجربه ۷ (Met.+LRH-A+Bac.): در این تجربه نیز نتایج حاصل از مقایسه میانگین های مقادیر I-GTH قبل از تزریق (0.18 ± 0.027) و بعد از تزریق (0.3 ± 0.12)، و همچنین نسبت به گروه ۶ و گروه کنترل، حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار بین آنها می باشد (نمودار ۱). در یک آنالیز دیگر برای سنجش همبستگی بین سن ماه میان هر گروه با درصد تغییرات I-GTH سرم، از شاخص وزن (به علت شرایط زیستی یکسان آنها) استفاده شد، که نتایج حاصل از آزمونهای همبستگی ارتباط زیادی را بین این دو مشخصه در گروههای تیماری فوق نشان ندادند.

بحث

بحث های ضد و نقیضی که تاکنون در مورد نقش مهاری یا تحر یکی گابا در آزاد سازی هورمون گنادوتروپین پستانداران و ماهیها صورت گرفته، ممکن است ناشی از ناهمگنی رسپتورهای گابا آرژیک باشد. در این رابطه مشخص شده است که حداقل دو نوع از سه نوع رسپتور در کنترل ترشح گنادوتروپین دخالت دارند (۱۷). گزارشهایی، وجود دارد مبنی بر اینکه هر دوی رسپتورهای گابا - A و گابا - B در تنظیم ترشح LH پستانداران (۲۱، ۱۴، ۱۰) یا ترشح I-GTH در ماهیها (۱۸، ۱۵، ۱۳، ۱۱، ۸) مشارکت دارند. اما همان گونه که ذکر شد، هیچ نوع گزارشی مبنی بر اثر تنظیمی این رسپتورها بر I-GTH ماهیها وجود ندارد. مشاهدات تجربه (۱) حاکی از آن است که گابا می تواند به عنوان یک عامل مهاری بر ترشح پایه I-GTH اثر بگذارد. برای چنین اثری دو راه مختلف برای عمل گابا (در ارتباط با I-GTH) گزارش شده است: یکی با تأثیر مستقیم بر سلولهای غده ای هیپوفیز (به عنوان نوروهورمون)، و دیگری، به طور غیرمستقیم و با واسطه سایر فاکتورهای مغزی (از جمله DA و GnRH) این

خونگیری: در این عملیات دو مرحله خونگیری و بدنبال خونگیری اول نیز یک مرحله تزریق و جود داشت. اولین مرحله خونگیری در ساعت مشخصی از روز انجام می شد و دومین مرحله آن نیز ۵ ساعت بعد صورت می گرفت، و در هر مرحله ماهیها ابتدا به وسیله پودر گل میخک (قرنفول) (aromaticum Myrtaceae (Syzgium)) بیهوش شده و پس از علامت گذاری به وسیله تگهای شماره دار، با استفاده از سرنگ هیپارینه ۵cc و سر سوزن (Gauge) ۲۲G، از طریق قوس خونی (Hemal arc) در ناحیه انتهایی دم، خونگیری می شدند و به بدنبال آن نیز تزریقات مربوطه هر گروه، برای ماهیهای خونگیری شده به عمل می آید. پس از جداسازی سرم از نمونه خونی، میزان گنادوتروپین (I-GTH) آنها با استفاده از روش RIA (Radioimmunoassay) مورد سنجش قرار می گرفت.

روشهای آماری

برای مقایسه بین مقادیر I-GTH سرم قبل از تیمار "Pre" (Pretreatment) و بعد از تیمار "Post" (Posttreatment) آزمون t-test یا Mann-whitney U-test مورد استفاده قرار می گرفت. برای مقایسه مقادیر Post بین گروهها، ابتدا با استفاده از آزمون U-test، تشابه یا اختلاف مقادیر Pre هر دو گروه مورد آزمایش قرار می گرفتند، در صورتیکه Pre های آنها تفاوت معنی داری را نشان می دادند، به جای مقادیر post، از درصد تغییرات I-GTH نسبت به مقادیر pre، برای مقایسه دو گروه استفاده می شد (U-test). جهت تشخیص وجود یا عدم وجود ارتباط بین وزن نمونه های هر گروه و تغییرات I-GTH سرم آنها، از آزمون همبستگی استفاده می گردید.

نتایج

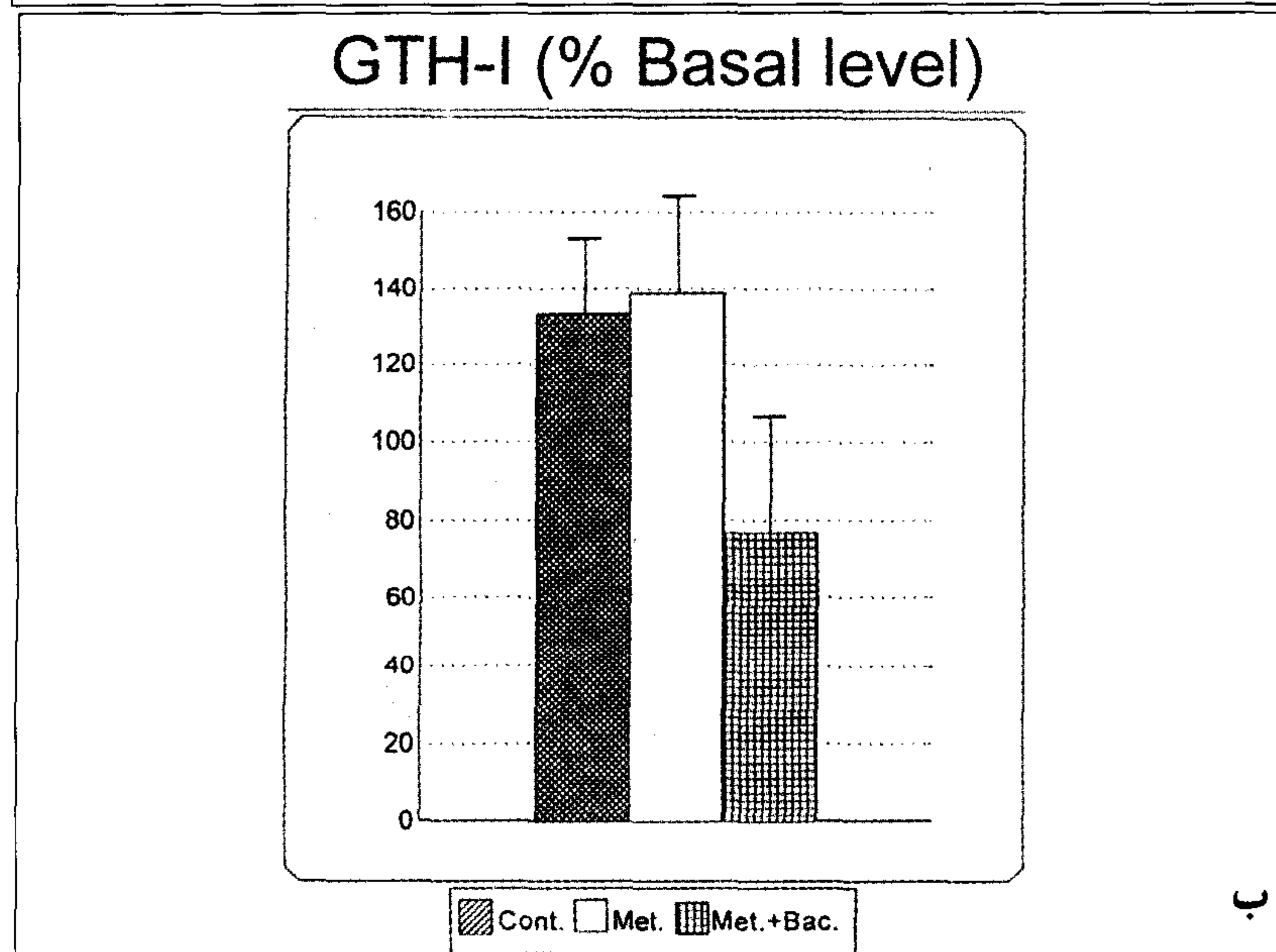
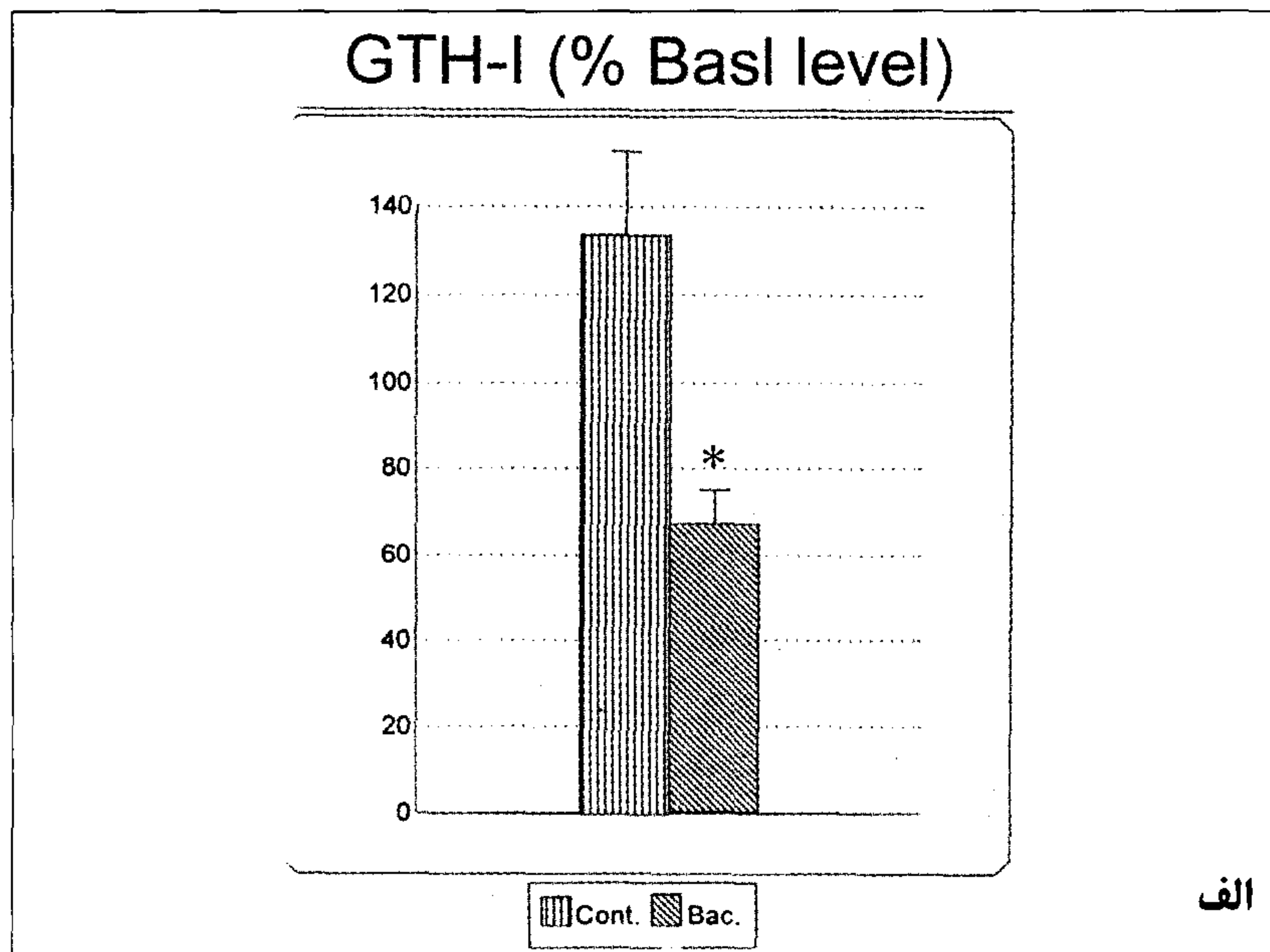
بر طبق جدول (۱)، در این تحقیق، ۷ گروه تجربی با اضافه یک گروه کنترل در نظر گرفته شده که در گره اخیر هیچ گونه تفاوت معنی داری از نظر مقادیر I-GTH، بین مراحل pre. و post مشاهده نگردید.

تجربه ۱ (Bac): نتایج حاصله از مطالعات آماری بیانگر وجود اختلاف معنی دار بین مقادیر I-GTH سرم قبل از تیمار (0.528 ± 0.08 mIU/ml) و بعد از تیمار (0.33 ± 0.02) می باشد ($p < 0.05$)، از طرف دیگر با توجه به تفاوت معنی دار بین مقادیر pre گروه (۱) و کنترل، برای تشخیص اثر تیمار با کلوفن، از مقایسه بین گروهی درصد تغییرات I-GTH نسبت به زمان صفر استفاده شد ($0.8/0.73 \pm 0.067 \pm 0.08/0.133/0.3$)، که نتایج حاصله نشان دهنده وجود تفاوت نسبتاً معنی داری ($p < 0.05$) بین این دو گروه می باشد (نمودار ۱ و ۲-الف).

تجربه ۲ (LRH-A): آنالیز آماری داده ها، تفاوت معنی داری را بین مقادیر I-GTH سرم این گروه (0.28 ± 0.03) با گروه کنترل (0.43 ± 0.08) در مرحله پس از تیمار، نمی دهد (نمودار ۱).

تجربه ۳ (LRH-A+Bac.): در این تجربه نیز هیچ گونه تفاوت معنی داری از نظر میزان I-GTH، بین دو مرحله خونگیری، و همچنین بین مراحل دوم خونگیری این گروه و گروه ۲ (LRH-A) وجود نداشت. اما زمانی که این مقادیر (0.25 ± 0.04) با گروه کنترل (0.43 ± 0.08) مقایسه شدند، اختلاف بسیار



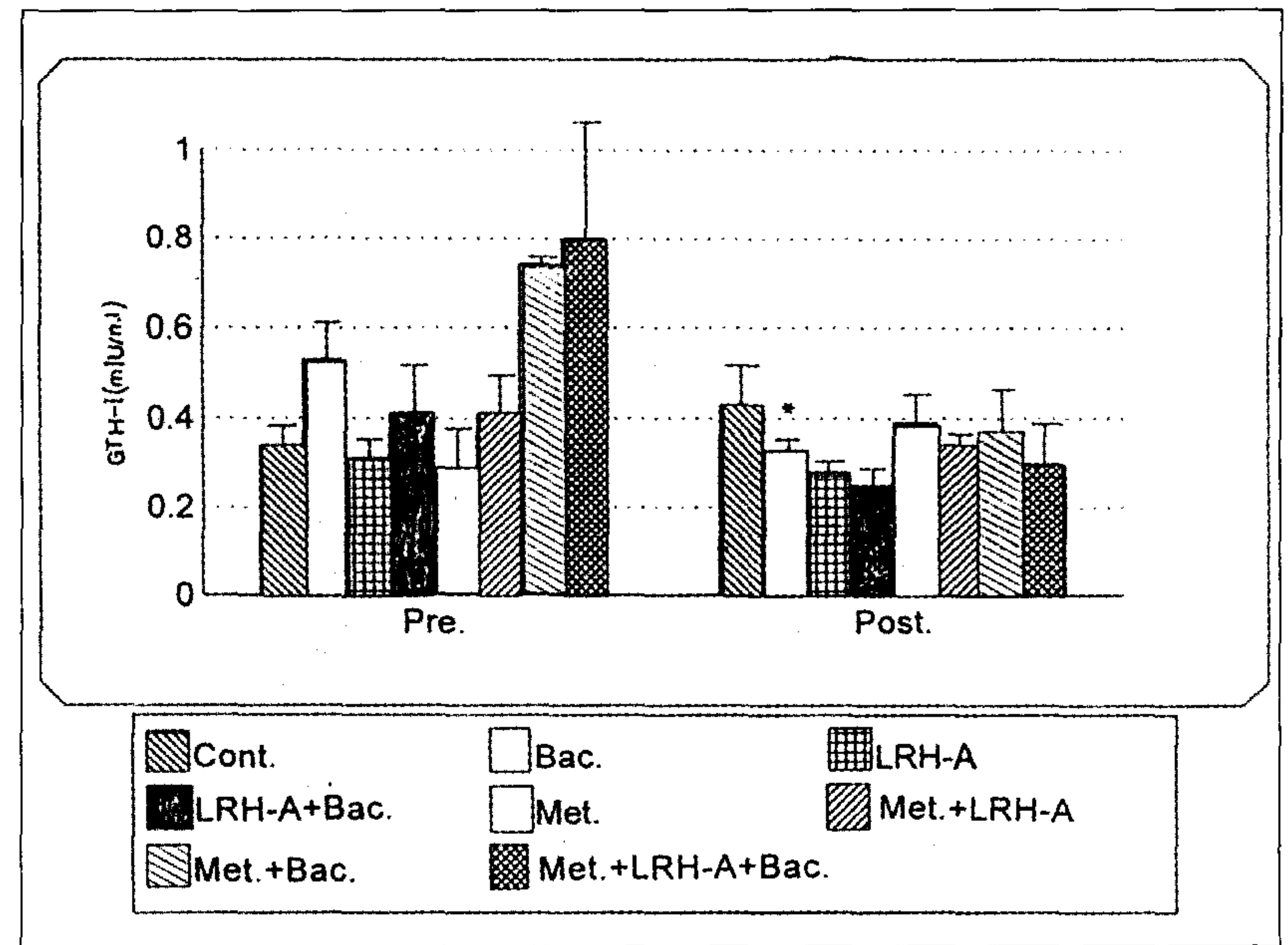


نمودار ۲- درصد تغییرات GTH-I سرم پس از تزریق نسبت به قبل از تزریق. مقایسه گروههای Bac.(الف) و Met+Bac (ب) با گروه کنترل.

در محیطهای invitro و invivo انجام گرفته، این موضوع را تأیید می نمایند. محققین مزبور، اثر غیر مستقیم گابا را بر ترشح GTH-II، از طریق اثر بر نورونهای دوپامینرژیک و یا GnRH مورد تأکید قرار داده اند.

برای آزمون دو فرض فوق چند تجربه دیگر انجام گرفت، به این ترتیب که با کلوفن را توأم با آگونیست GnRH (LRH-A) و یک آنتاگونیست دوپامین (متاکلوپرامید) مورد استفاده قرار دادیم، چرا که این دو فاکتور همانگونه که قبلاً نیز اشاره شد، به عنوان عمده ترین فاکتورهای RF و IF برای آزاد سازی گنادوتروفین از هیپوفیز شناخته شده اند.

بر اساس فرض دوم، دوروش برای اثر گابا با میانجی گیری فاکتورهای مزبور وجود دارد، یکی تأثیر بر آزاد سازی دوپامین و GnRH از نورونهای مرکزی و روش دیگر با تحریک یا مهار پایانه های نورونی مربوط به آنها در سطح هیپوفیز می باشد. از طرف دیگر همانگونه که قبلاً نیز بدان اشاره شد، نوروترانسمیتر دوپامین به عنوان عامل IF با GnRH برهم کنش داشته و این عمل را از دو طریق انجام می دهد، یکی با تأثیر بر رسپتورهای D2 در سطح سلولهای گنادوتروف و به دنبال آن مهار سیگنال ترانسداکشن GnRH و روش دیگر با مهار آزاد سازی GnRH از پایه های نورونی آن در سطح هیپوفیز و همچنین در سطح هیپوتالاموس جلویی - پره اپتیک بر این اساس گابا برای



نمودار ۱- اثرات ناشی از تزریق -A+Bac.,LRH-A,Bac -A+Bac.,LRH-A,Bac.,Met.,LRH -A+Bac.,Met.,LRH-A+Bac.,Met.+LRH-A, Met+Bac, Met.,LRH بر سطح GTH-I سرم خون ($p < 0.05$).

عمل را به انجام می رساند (به عنوان نوروترانسمیتر):

الف - دوروش اول، مسلماً وجود گیرنده های گابا بر روی سلولهای گنادوتروفی هیپوفیز ضرورت دارد. حضور این گیرنده ها در پستانداران تا حدودی به اثبات رسیده است (۱،۱۹) در تلفوستانها نیز بعلت و وجود عصب رسانی هیپوفیزی مستقیم و منحصر به فرد در بین مهر داران، در نگاه اول، وجود این رسپتورها را در سطح سلولهای ترشحی هیپوفیزی آنها محتمل می نماید؛ به علاوه اینکه شرکت فیبرهای گابا آرژیک نیز در این عصب رسانی با استفاده از روش ایمنوسیتوشیمیایی، در سطح میکروسکوپ نوری و الکترونی مشاهده شده است (۵). اما برخی از تجارب انجام گرفته بر روی سلولهای مجزای هیپوفیزی (in vitro) حاکی از عدم تأثیر مستقیم گابا یا آگونیست های آن بر روی سلولهای گنادوتروفیکی goldfish می باشد (۷)، ضمن اینکه مواردی از تأیید حضور این رسپتورها نیز وجود دارد. به عنوان مثال طی آزمایشاتی مشخص شده است که گابا باعث افزایشی در سطوح کلسیم داخل سلولی در سلولهای گنادوتروفی goldfish می شود، که نشان می دهد گابا می تواند آزاد سازی GTH را مستقیماً در سطح سلولهای گنادوتروفی تحریک نماید.

ب- در ارتباط با روش دوم نیز به نوبه خود دوراه را می توان برای عمل تنظیمی گابا پیشنهاد نمود، یک راه از طریق تأثیر مرکزی بر سایر نورونهای نوروسکرتری در هیپوتالاموس و روش دیگر که با تأثیر بر گیرنده های خود در پایانه های عصبی منتهی به هیپوفیز صورت می گیرد، که در هر دو صورت باعث تنظیم ترشح عوامل: RF (Releasing Factor) یا IF (Inhibiting Factor) موثر بر هیپوفیز می گردد.

از آنجایی که در پستانداران، گابا می تواند با سایر نوروترانسمیترهای مؤثر بر ترشح گنادوتروفین (مانند GnRH، نوراپی نفرین یا دوپامین) برهم کنش داشته باشد، احتمال می رود که در ماهیان نیز بتوان اعمال مشابهی را برای آن در نظر گرفت. تجربیاتی که به وسیله Kah و همکارانش در سال ۱۹۹۲، Sloley و دیگران در سال ۱۹۹۲ و Sokolowska-Mikolajczk و سایرین در سال ۱۹۹۷،

به دست آمده است که بر طبق آن استفاده از دوز بالای LHRH-A در مرحله مجدد فعالیت جنسی منجر به کاهش در GSI شاخص رشد گنادی (Index Gonadosomatic) می شود (۴).

با این تفاسیر، جهت بررسی درستی یا نادرستی برخی از دلایل فوق، تجربه دیگری را با استفاده از تزریق توأم با LRH-A و Met انجام دادیم که باز هم نتایج آن حاکی از عدم تاثیر گذاری تلفیق این دو فاکتور بر آزادسازی GTH-I هیپوفیزی می باشد. بنابراین فرض مربوط به اثر مهاری دو پامین بر عملکرد GnRH درونزا، در سطح گنادوتروفهای GTH-I رد می شود.

در نهایت برای تکمیل آزمون فرضیات مربوط به اثر گابا، گروههای آزمایشی ۳، ۵، ۷ را با ترکیبهای Bac+LRH-A، Bac+Met، و A-Bac+Met+LRH ترتیب دادیم.

هنگامی که با کلوفن را توأم با Met تزریق نمودیم، بعد از گذشت ۵ ساعت مشاهده شد که هیچ گونه اثر معنی داری را بر ترشح GTH-I، چه در مقایسه با گروه کنترل و یا با مقایسه گروه، Met ایجاد نمی کند. تقریباً همین نتیجه، در تلفیق با کلوفن با LRH-A، مشاهده نمودیم، با این تفاوت که در مقایسه با گروه کنترل، در یک حد ضعیفی تاثیر منفی بر آزادسازی GTH-I گذاشته بود. برای اینکه تاثیر مهاری اخیر را بیشتر مورد بررسی قرار دهیم در آزمایش بعدی ترکیب هر سه مورد LRH-A و Met و Bac را مورد مطالعه قرار دادیم، که در اینجا نیز همانند گروه قبلی تنها یک نتیجه مهاری ضعیفی را از اجزای این آزمایش به دست آوردیم. در توجیه نتایج فوق می توان چنین استدلال کرد که در تجربه شماره ۵ (Met+Bac)، اگر فرض نماییم با کلوفن عمل تحریکی خود را از طریق مهار ترشح دو پامین به انجام می رساند، بنابراین انتظار می رود که در این آزمایش اثر با کلوفن تشدید یابد، چرا که خود متاکلوپرامید نیز بلوکه کننده دو پامین به شمار می رود، اما عملاً چنین نتیجه ای به دست نیامد.

حال اگر عمل مهاری با کلوفن را به گونه ای در نظر بگیریم که آن را از طریق تحریک سنتز و آزاد سازی دو پامین به ثمر برساند (۱۳)، بنا بر این با توجه به اعمال مخالف Bac و Met نسبت به هم، چنین نتیجه ای (تاثیر ضعیف) قابل انتظار خواهد بود، چرا که این دو تقریباً همدیگر را خنثی می نمایند. در تجربه سوم نیز، که طی آن تزریق با کلوفن را با LRH-A توأم نموده ایم، عدم دستیابی به تغییرات معنی دار از GTH-I سرم، نشان از عدم تقویت عمل A-LRH به وسیله با کلوفن دارد. اینکه چرا با کلوفن در این تجربه حداقل اثراتی همانند تجربه شماره (۱)، یعنی تزریق با کلوفن به تنهایی را نشان نمی دهد، موضوعی است که باید طی تحقیقات دیگری به آن پرداخته شود، و ما با توجه به شواهد محدود موجود، توضیح قابل قبولی را برای آن نمی توانیم در نظر بگیریم. در اینجا باید یاد آور شد که احتمال دارد گابا از طریق هیچ کدام از دو فاکتور فوق عمل نکرده و اثر خود را از طریق سایر فاکتورهای هیپوتالاموسی اعمال می نماید. در آخرین تجربه و با استفاده از تلفیق هر سه فاکتور، Bac، Met و LRH-A، این هدف دنبال شده است که احتمال دارد با کلوفن در آزادسازی GTH-I تحریک شده، با LRH-A+Met تاثیر داشته باشد (شبهه به آن چیزی که در مورد GTH-II به اثبات رسیده است)، به عبارت دیگر

ایجاد اثرات مهاری غیر مستقیم خود بر GTH یا باید رسپتورهای مهاری خود را که بر روی نورونهای GnRH قرار دارند فعال نماید، یا اینکه نورون ها دو پامینرژیک را جهت آزاد سازی دپامین تحریک کند، که در هر دو صورت منجر به کاهش آزادسازی GTH از سلولهای هیپوفیزی می شوند.

در ارتباط با گروههای تجربی (۲) و (۴) یعنی بترتیب گروههای تیماری A-LRH و Met، مشاهده شد که تزریق عوامل مزبور به تنهایی هیچ گونه تغییر معنی داری را نسبت به گروه کنترل در میزان GTH-I سرم ایجاد نمی کند. دلایل احتمالی این نتایج را می توان به سه دسته تقسیم نمود:

الف - ممکن است همانند بیشتر تجربیات مربوط به GTH-II، به طور کلی به کار بردن آنالوگ GTH-I به صورت مجزا، و یا مهار دو پامین به تنهایی، قادر به فعال کردن سلولهای گنادوتروپینی در هیپوفیز نبوده و برای تحریک آزادسازی گنادوتروپین ها (در اینجانوع I) بایستی هر دو این فاکتورها را توأم به کار برد.

ب- ممکن است هیچ کدام از فاکتورهای تیماری جزء عوامل کنترل کننده ترشح GTH-I نبوده و یا لاق از اهمیت کمتری برخوردار باشند. نظیر همین فرضیه، اخیراً در مورد ماهی قزل آلی رنگین کمان به اثبات رسیده است، به طوری که مشخص شده، GnRH قادر به تحریک معنی دار GTH-I در هیچ کدام از مراحل گامتوژنز نبوده و آنتاگونیست دو پامین (Pimozide) نیز در القای عمل تحریکی GnRH بر ترشح GTH-I ناتوان است (۲، ۳).

ج- گروه سوم دلایل را می توان در ارتباط با تغییرات فصلی رشد و نمو گنادی و فعالیت جنسی بیان نمود. تحقیقات انجام شده بر روی تعدادی از گونه های ماهیان، بخصوص goldfish، بیانگر وجود اختلافات فصلی در پاسخ دهی نسبت به تزریق آنتاگونیست دو پامین، LRH-A و یا ترکیبی از این دو می باشد به عنوان مثال goldfish بیشترین پاسخ را به ترکیب pimozide و در مرحله آخر فعالیت مجدد جنسی (Late recrudescence) و کمترین پاسخ را در مرحله پس روی جنسی نشان می دهد. تقریباً همین نتیجه نیز در مورد کپور حاصل شده است به طوری که Weil و همکاران در سال ۱۹۷۵ گزارش نموده اند که ماهیهای کپوری که پس روی جنسی داشته اند، پاسخ کم و یا هیچ پاسخی را نسبت به GnRH نشان نمی دهند. این تغییرات در پاسخ دهی ممکن است ناشی از تفاوت در محتوای هیپوفیزی GTH، توانایی هیپوفیز برای سنتز GTH، یا تغییر در تعداد و میل ترکیبی رسپتورهای GnRH و دو پامین موجود بر روی سلولها GTH و یا ترکیبی از این عوامل به علاوه عوامل ناشناخته دیگر باشد (۱۶).

از طرف دیگر اگر به نتایج گروه ۲ کمی دقت کنیم نکته جالبتری را در می یابیم و آن اینکه مشاهده می شود مقادیر GIH-I سرم در دومین خونگیری، تغییرات کاهشی کمی نسبت به زمان صفر خود نشان می دهند. با توجه به کمی اطلاعات موجود در این زمینه، در حال حاضر، توضیح زیادی برای این تاثیر مهاری نمی توانیم ارائه دهیم، اما شاید بتوان این نتیجه را ناشی از دوز بالای LRH-A دانست، که در این صورت تأثیرات محیطی آن مستقیماً بر روی گنادها اعمال گشته، و بر اثرات مرکزی آن غالب می شود؛ درست شبیه به وضعیتی که در پستانداران (Rat) وجود دارد. در این رابطه تجربه ای نیز بر روی ماهی goldfish



References

1. Andreson, R. A., Mitchell R.(1986): Effects of GABA receptor agonist on the secretion of growth hormone, Luteinizing hormone, adrenocorticotropin hormone and thyroid hormone from the rat pituitary gland in vitro, *J Endocrinol* 108:1-8.
2. Breton, B., Govoroun, M., Mikolajczyk, T.(1998): GTHII secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout: relationship with pituitary responsiveness to GnRH. A Stimulation. *Gen.Comp.Endocrinol.*, III, 38-50.
3. Govoroun, m., Chb, j., and Breton B. (1998): Immunological cross - reactivity between rainbow trout GTH-I and GTH-II and their a and B subunits: application to the development of specific radioimmunoassays. *Gen.comp . Endocrinol .*, 111, 28-37.
4. Hoar, w. s., Randall, D. J. and Donaldson, E. M. (1983): *Fish physiology* (Academic press, London) vol. ix, part b, pp.469.
5. Kah, o., Breton, B., Dulka, J. G, Nunez Rodriguez, J, Peter, RE, Corigan, A, Rivier, J. J., and Vale, W. W. (1986): An investigation of the Gn-Rh (gonadotropin-releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn- RH . *Cell Tiss. Res.*, 244, 327-337.
6. Kah o., Dubourg, P., Martinoli, G., Gonnet, F. and Calas, A.(1987): Central GABAergic innervation of the pituitary of the goldfish: A radioautographic and immunohistochemical study at the electron microscope level. *Gen.compo Endocrinol.*: 67:324-337.
7. Kah, o., Trudeau, V. L., Sloley, B. D., Chang, J. P., Dubourg, P., Yuk, L. and Peter, RE.(1992): Influence of GABA on gonadotropin release in the goldfish. *Neuroendocrinology*, 55, 396-404.
8. Kah, o., Trudeau, V. L., Sloley, B. D., Martinoli, m, G., Chang, J. P., Yuk. L. and Peter, R. E. (1991): Implication of GABA in the neuroendocrine regulation of gonadotropin release in the goldfish, *carassius auratus*, in: proceedings of the fourth international symposium on productive physiology of fish (AP. scott, J. Psumpter, D. E, Kime, and M. S,

مجموعه اثرات Met و Bac بر عملکرد LRH-A، ممکن است بتواند منجر به تغییر معنی داری در ترشح GTH-I از سلولهای هیپوفیزی گردد. با مراجعه به تجارب قبل ملاحظه می شود، که Met هیچ گونه تاثیری بر عملکرد LRH-A ندارد اما با کلوفن به همراه هر کدام از Met و LRH-A تاثیر زیادی را بر میزان GTH-I سرم داشته و در هر دو حالت نیز اثرات آنها مهاری می باشد. در حالت Met+Bac ثابت شد که علت عدم تاثیر معنی دار آنها ناشی از خنثی شدن اثرات متقابل این دو فاکتور است و در حالت Bac+LRH-A نیز دلیل مشخص و قابل ارائه ای وجود ندارد، بنابراین اگر مجموعه دلایل فوق را با هم در نظر بگیریم، علت عدم تاثیر معنی دار این سه ماده فوق الذکر را در تلفیق با یکدیگر متوجه خواهیم شد.

نتیجه گیری

نتایج کلی حاصله از اجرای پژوهش به این ترتیب می باشند: ۱- سیستم گابا از یک در تنظیم ترشح GTH-I از هیپوفیز کپور معمولی نقش دارد. ۲- تزریق با کلوفن به تنهایی، قادر است ترشح GTH-I را از طریق رسپتورهای نوع B گابا و در طول مرحله پس روی جنسی (regression) مهار نماید. ۳- هیچ کدام از فاکتورهای تزریقی LRH-A (آنالوگ بسیار قوی GnRH) و متاکلوپرامید هیدروکلراید (آنتاگونیست اختصاصی D2 دوپامین) چه به تنهایی و یا در ترکیب با هم، قادر به ایجاد تغییر در میزان ترشح GTH-I، حداقل در این مرحله از سیکل جنسی نیستند. ۴- تزریق توام با کلوفن و دو فاکتور فوق (LRH-A و Met) نیز، چه به صورت دو تایی و یا ترکیبی از هر سه دارو، تاثیر چندانی بر فعالیت ترشحی گنادوتروفهای GTH-I ندارد. ۵- با کلوفن تزریقی، احتمالاً برای عمل مهاری خود بر GTH-I، رسپتورهای مربوطه را در سطح سلولهای گنادوتروفی تحت تاثیر قرار می دهد، و با توجه به شواهد به دست آمده اگر اثرات مرکزی آن را بر نورون های GnRH و دوپامین، کاملاً رد نماییم، حداقل می توان نتیجه گرفت که اثر مستقیم گابا، بر اثرات غیر مستقیم (مرکزی) آن غالب است.

تشکر و قدردانی

در پایان بر خود لازم می دانیم از زحمات بیدریغ مسئولان و کارشناسان محترم معاونت تکثیر و پرورش شیلات و مرکز تکثیر و پرورش شهید انصاری رشت بویژه آقایان مهندس حاجی زاده و مهندس طلوعی سپاسگزاری نماییم.



- Rolfe, eds.). Norwich, U. K. (1991): Fish symp. Sheffield.
9. Mc Cann, S. M., Rettora, L. (1988): The role of GABA in the control of anterior pituitary hormone secretion, In: GABA and Benzodiazepine Receptors, edited by R.F.Squires. Boca Raton, FL: CRC, Vol. I, P.123-134.
10. Moguilevsky, J. A., Carbon, es., Szwarcfarb, B. and Rondina, D.(1991): Sexual maturation modifies the GABAergic control of gonadotropin secretion in female rats, Brain.Res.,56,12-16.
11. Popek, W., Bretol, B., Sokolowska-mikolajczyk, M., Epler, P.(1994): The effects of bicuculline (a GABA-A receptor antagonist) on LHRH-A and pimozone stimulated gonadotropin (GtH2), release in female carp, Comp.Biochem.physiol.,108c: 129-135.
12. Racagni, G., Apud, J. A, Cocchi, D.(1982): GABAergic control of anterior pituitary hormone secretion, Lifesciences, 31,823-838.
13. Roelants, I., Epler, P., Mikolajczyk, T., Breton Bieniarz, k. and Ollevier, F. (1990): A presumptive role for GABA in the stimulatory effects of Des-Gly 10, [D-Ala6] LHRH-ethylamide and pimozone on the gonadotropin release in carp, life sciences,47,1801-1812.
14. Scott, C. J., Clark, I. h. (1993): Inhibition of luteinizing hormone secretion in ovariectomized ewes during the breeding season by GABA is mediated by GABA-A receptors, but not GABA-B receptors, Endocrinology,123,1789-1796.
15. Sloleky, B. D., Kah, O., Trudesau, V. L, DUKa. J. G., and Peter, R. E.(1992): Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: involvement in the regulation of gonadotropin secretion, J. Neurochem., 58,2254-2252.
16. Sokolowska, M., Mpeter, R. E., 'Nahorniak, C. S., and Chang, J. p. (1985): 'Seasonal effects of pimozone and desly 10 [D.ala16]LH.RH ethylamide on gonadotrophin secretion in gold fish, Gen comp.Endocrinol.
17. Sokolowska- mikolajczyk, m ., chyb, J., Mikolajczyk, T., Epler, P., Bicniarz k. Popek, W. (1997): GABAergic modulation of gonadotropin (GTH2) secretion from carp, cyprinus carpio L., hypophysis, Arch. Ryb. pol., 5,137-154.57',472-479
18. Trudeau V. L, Sloley B. Dpeter, R. E. (1993): GABA Stimulation of gonadotropin-II release in goldfish: involvement of GABA(A) receptors, dopamine, and sex steroids, Am.J..Phys.,265,348-355.
19. Virmani, M.A., Stojilkovic, S. S., and Catt, k. J. (1990): Stimulation of luteinizing hormone release by Y-aminobutyric acid (GABA) agonists: mediation by GABA-A type receptors and activation of chloride and voltage -sensitive calcium channels, Endocrinology, 126, 2499-2505.
20. Weir, C., Breton, B., and Reinaud, P.(1975): "fish physiology" by Hoar w.s., Randall D. J., Donaldson E.M., 1983,(Academic press London), Vol.IX, part B, chap.3.
21. Wilson, C. A, James, M. D., Leigh, A. J. (1990): Role of GABA in the zona incerta in the control of luteinizing hormone release and ovulation, Neuroendocrinology.52,354-360.

