Archive of SID

طب نظامی
بهار ۱۳۸٤، شماره ۷ (۱)
صفحات: ۲۰-۱۵

مطالعه اثرات کولینرژیک و غیرکولینرژیک ارگانوفسفات‌ها بر رهایش خود به خود و تحریک شده میانجی‌های عصبی: کارآیی روش سوپرفیوژن

سید مهران حسینی[۱]*M.D.، علیرضا عسگری[۲]*Ph.D.، حسینعلی مهرانی[۳]**Ph.D.،
فرشته پورعبدالحسینی[۴]***B.Sc.، آمنه شاهرخی[۵]*B.Sc. و علی خوش‌باطن[۶]****Ph.D.

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج» - دانشکده پزشکی - گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک - تهران - ایران*

** دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج» - دانشکده پزشکی - گروه بیوشیمی - تهران - ایران**

*** دانشگاه تربیت مدرس - دانشکده علوم پزشکی - گروه فیزیولوژی - تهران - ایران***

****دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج» - پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی - تهران - ایران****

تاریخ اعلام وصول: ۱۳۸۳/۱۱/۱ تاریخ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸٤/۲/۱۷ تاریخ اعلام قبولی مقاله: ۱۳۸٤/۳/۵

خلاصه

مقدمه: مسمومیت ترکیبات ارگانوفسفره با علایم نیکوتینی، موسکارینی و مرکزی مشخص می‌شود. تلاش برای پیشگیری و درمان بهتر عوارض مرکزی این سموم، توجه محققین را به نقش مکانیزم‌های غیرکولینرژیک جلب نموده است. توانایی ترکیبات ارگانوفسفره در تأثیر همزمان بر سه عنصر اصلی ساختمان سیناپس‌های شیمیایی و عملکرد پیچیده سیستم کولینرژیک در رابطه با سایر میانجی‌های عصبی در مغز، تفسیر نتایج چنین مطالعاتی را اغلب با مشکل مواجه نموده است. در این مطالعه استفاده از روش سوپرفیوژن نمونه‌های سیناپتوزومی مخچه، در شناسایی چنین مکانیزم‌هایی مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: این تحقیق در سه مرحله انجام شد. ۱- تهیه نمونه‌های سیناپتوزومی از مخچه، ۲- راه اندازی سیستم سوپرفیوژن و ۳- بررسی رها شدن گاما آمینو بوتیریک اسید نشاندار از نمونه‌های سیناپتوزومی.

نتایج: در روش سوپرفیوژن، آزاد سازی $[^3H]GABA$ از سیناپتوزوم‌ها دارای یک روند خطی بوده و به دنبال تحریک افزایش نشان می‌دهد. رهایش خود به خودی و تحریک شده به تفکیک قابل ارزیابی هستند و امکان انجام مداخله‌های مختلف به‌طور همزمان وجود دارد.

بحث: به نظر می‌رسد جهت بررسی in vitro مکانیزم برخی از عوارض مرکزی سموم ارگانوفسفره که احتمالاً ناشی از اختلال در رهایش میانجی‌های عصبی مهاری یا تحریکی هستند، روش سوپرفیوژن می‌تواند راه‌گشا باشد.

واژه‌های کلیدی: سوپرفیوژن، سیناپتوزوم، ترکیبات ارگانوفسفره، مخچه

۱- پزشک عمومی - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج» - نویسنده مسئول
۲- استاد - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج»
۳- استاد - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج»
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد - دانشگاه تربیت مدرس
۵- دانشجوی کارشناسی ارشد - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج»
۶- استاد - دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا... «عج»

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ترکیبات ارگانوفسفره یکی از شایع‌ترین علل مسمومیت هستند [۱]. تنوع زیاد علایم عصبی و عدم وجود اطلاعات کافی در مورد مکانیزم آنها، موجب شده است که به‌طور کلی نشانه‌های مسمومیت با این ترکیبات به‌صورت نیکوتینی، موسکارینی و مرکزی طبقه‌بندی شود [۲]. جداسازی عوارض مرکزی از مکانیزم‌های نیکوتینی و موسکارینی از دو جنبه قابل تأمل و توجه است. نخست آن‌که بسیاری از این مواد به‌طور مستقیم (مستقل از مهار آنزیم کولین استراز) عملکرد تعدادی از پروتئین‌های بیولوژیک دیگر نظیر کانال‌های یونی و گیرنده‌های عصبی را نیز متأثر می‌سازند. لذا، این احتمال وجود دارد که چنین اثراتی در پاتوژنز عوارض مرکزی این سموم نقش داشته باشند [۳]. جنبه دیگر به ارتباط سیستم کولینرژیک و نقش تنظیمی آن بر سایر سیستم‌های میانجی عصبی در مغز مربوط می‌شود. به عبارت دیگر شروع، تداوم یا خاتمه بسیاری از عوارض مرکزی مسمومیت با این مواد تنها به دلیل افزایش استیل‌کولین مغز نبوده بلکه ناشی از عدم تعادلی است که در سایر سیستم‌های عصبی نظیر سیستم مهاری گاما آمینو بوتیریک اسید (گابا)، یا سیستم تحریکی گلوتامات به‌وقوع می‌پیوندد [۴، ۵]. از جمله شواهدی که در تأیید این نظریه باید به آن اشاره کرد، ماهیت داروهای مؤثر بر عوارض مرکزی سموم ارگانوفسفره است. به‌عنوان نمونه در مورد پاتوژنز تشنج ناشی از این مواد، گرچه ازدیاد استیل کولین نقطه شروع حوادث بعدی است و کاربرد سریع برخی از آنتاگونیست‌های کولینرژیک در رفع تشنج مفید واقع شده است، ولی در فازهای بعدی با وجود تغییر غلظت استیل‌کولین، این داروها فاقد اثر هستند و برای کنترل تشنج از داروهای مؤثر بر سیستم گابا (یا گلوتامات) استفاده می‌شود.

یکی از مشکلات شناسایی مکانیزم عوارض عصبی این سموم تأثیر هم‌زمان آنها بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژی غشای پیش‌سیناپسی، شکاف سیناپسی و غشای پس‌سیناپسی است. به عبارت دیگر تداخل با هر یک از موارد برداشت و رهایش میانجی عصبی، آنزیم استیل‌کولین‌استراز، گیرنده‌های پیش‌سیناپسی و عملکرد تنظیمی آنها در کنترل انتقال پیام‌های عصبی و بالاخره خواص آگونیستی، آنتاگونیستی و حساسیت‌زدایی این ترکیبات بر گیرنده‌های پس‌سیناپسی، به‌کارگیری بسیاری از روش‌های متداول تحقیقاتی را در این مورد با محدودیت‌هایی مواجه نموده است [۶، ۷، ۸، ۹]. یکی از راه‌های بررسی مستقیم رهایش میانجی عصبی از غشای پیش‌سیناپسی روش سوپرفیوژن است که اولین بار در سال ۱۹۷۴ توسط Raiteri معرفی گردید. سوپرفیوژن در واقع نوعی پرفیوژن است که به‌صورت کنترل شده و در جهت نیروی ثقل صورت می‌گیرد [۱۰]. کارآیی این روش در شناسایی مکانیزم‌های پیش‌سیناپسی مؤثر در رهایش میانجی‌های عصبی از جمله واکنش بین پروتئین‌های ناقل یا گیرنده‌های یک نوع میانجی با یکدیگر و یا ارتباط بین این عوامل در سیستم‌های غیر همسان (از نظر نوع میانجی)، موجب گردید محققین دیگر نیز از سوپرفیوژن به‌عنوان روشی انتخابی در بررسی چنین پدیده‌هایی بهره‌مند گردند [۱۱]. از نظر تئوری در روش سوپرفیوژن، نمونه بافتی مورد نظر از جهت بالا به پایین و به‌صورت ممتد با عوامل مورد نظر مواجه شده و خروجی سیستم که منعکس کننده تغییرات ایجاد شده است به‌صورت پیوسته جمع‌آوری شده و به این ترتیب حذف مکانیزم‌های تنظیمی پس‌نورد از سیستم امکان‌پذیر می‌گردد [۱۲]. فعال شدن این مسیرهای تنظیمی پس‌نورد ممکن است در اثر واکنش میانجی رها شده از همان سیناپس یا سیناپس‌های مجاور با گیرنده‌ها یا پروتئین‌های ناقل باشد. توجه به این مطلب که میانجی‌های مختلف می‌توانند از طریق چنین مسیرهایی بر یکدیگر مؤثر باشند، اهمیت حذف مسیرهای پس‌نورد را بیش از پیش معلوم می‌سازد [۱۲، ۱۳]. از سوی دیگر خواص جالب نمونه‌های سیناپتوزومی که در واقع پایانه‌های آکسونی جدا شده از سلول‌های عصبی هستند و از نظر فیزیولوژی به منزله غشای پیش‌سیناپسی عمل می‌نمایند، بررسی مستقیم بسیاری از پدیده‌های مؤثر در انتقال عصبی را فراهم نموده است [۱۴]. این مطالعه قصد دارد با توجه به ویژگی‌های عصبی – شیمیایی مخچه موش بالغ، روش سوپرفیوژن نمونه‌های سیناپتوزومی مخچه را به‌عنوان مدل تجربی مناسب در بررسی برخی از عوارض مرکزی سموم ارگانوفسفره معرفی نماید. از آنجا که در نواحی مختلف مغز موش بالغ، مخچه کم‌ترین مقدار استیل‌کولین را به خود اختصاص داده است، بنابراین به نظر می‌رسد

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دنبال مواجهه با ارگانوفسفات‌ها، امکان تداخل سیستم کولینرژیک بر سایر سیستم‌های نوروترانسمیتری از احتمال کمتری برخوردار باشد [۱۵].

مواد و روش‌ها

مواد

[^{3}H]GABA با فعالیت ویژه ۹۹ کوری در هر میلی‌مول و کوکتل سنتیلاسیون[۱] نوع ASCII از شرکت آمرشام (انگلستان) و آمینواکسی استیک اسید 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 Sprague-Dawely در محدوده وزنی ۲۴۰-۱۸۰ گرم استفاده و برای هر ست آزمایش از مخچه یک موش سیناپتوزوم تهیه 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 اتر، حیوان را بیهوش کرده و پس از جدا نمودن سر به سرعت مخچه را خارج نمودیم. 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، محلول سوکروز ۰/۳۲ مولار که با فسفات ۰/۱ مولار، pH آن در ۷/۴ تنظیم شده بود. سپس با استفاده از دستگاه هموژن‌کننده با سرعت چرخش ۹۰ دور در دقیقه و ۲۵ حرکت بالا و پایین مخچه به‌طور کامل هموژن شد. نمونه هموژن مخچه به مدت ۵ دقیقه و با شتاب ۱۰۰۰g سانتریفیوژ شد و بعد از جدا سازی مایع رویی 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 غلظت ها بر حسب میلی مولار است). ماده اخیر یک مهار کننده آنزیم گابا ترانس آمیناز است و از متابولیزه شدن گابا ممانعت می‌کند. همیشه قبل از استفاده از محلول استاندارد، محلول در حرارت اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه با کربوژن هوا دهی می‌شد. این کار برای تنظیم pH محلول در محدوده ۷/۴ الزامی بود.

برداشت [^{3}H]GABA توسط سیناپتوزوم‌ها

حجم یکسانی از نمونه‌های سیناپتوزومی را جدا نموده و به آن گابای نشان‌دار اضافه کردیم، به‌طوری که غلظت نهایی آن در محیط ۰/۰۴ میکرومول شد. بعد از ۱۵ دقیقه انکوباسیون در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد با رقیق‌سازی و کاهش غلظت ماده نشان‌دار برداشت آن متوقف شد [۱۷].

روش سوپرفیوژن

پرفیوژن یک‌طرفه و از بالا به پایین نمونه‌ها با کمک دستگاه سوپرفیوژن (مدل ۱۴۹۰۰، شرکت UgoBasile ایتالیا) انجام شد. این دستگاه شامل قسمت‌های زیر است:

واحد الکترونیکی، مخازن ذخیره و سوپرفیوژن، پمپ تخلیه، پمپ پریستالتیک و سیستم چرخش آب جهت کنترل دما.

مخازن سوپرفیوژن، شامل ۱۲ محفظه باز هستند که به‌طور موازی کار می‌کنند و هر یک از آنها از قسمت بالا به یک مخزن دیگر که مخزن ذخیره نام دارد، مرتبط می‌گردد. اطراف هر دو گروه مخازن سوپرفیوژن و ذخیره توسط حمام کنترل دما احاطه شده است. محلول‌های گرم و هواگیری شده در مخازن ذخیره به‌طور هم‌زمان به مخازن سوپرفیوژن قابل انتقال هستند. در هر یک از مخازن

۱- Scintillation cocktail

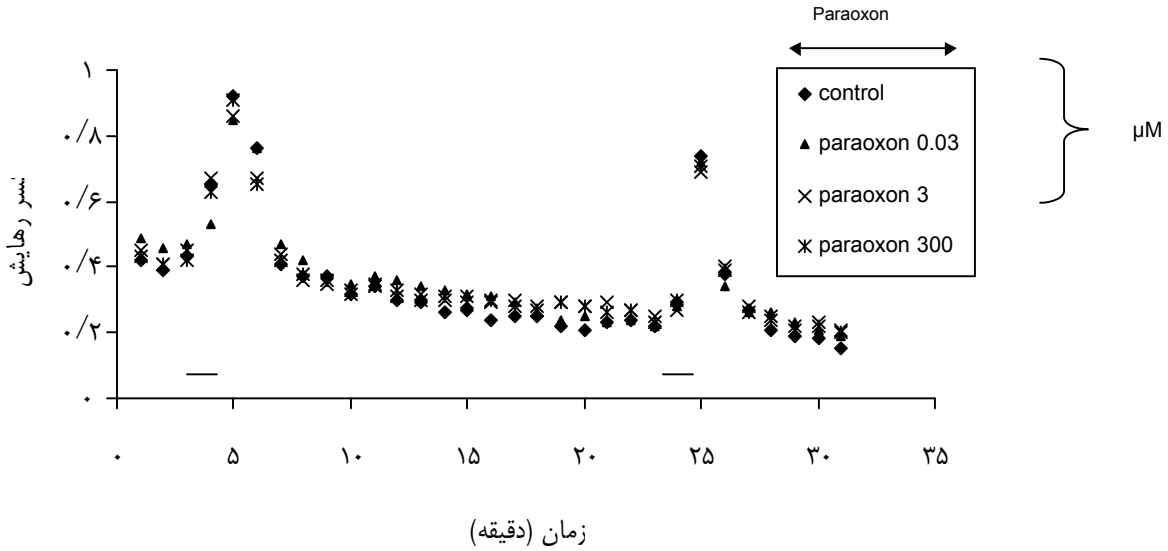
www.SID.ir

Archive of SID

سوپرفیوژن حجم مشخصی از نمونه‌های سیناپتوزومی بر روی فیلترهایی با منافذ ۰/۶۵ میکرون قرار داده می‌شد. این فیلترها از قسمت پایین به کمک لوله‌های رابط با یک پمپ پریستالتیک چند کاناله در ارتباط بودند. این پمپ با جریان ثابت ۰/۵ میلی‌لیتر در دقیقه، هم‌زمان عمل سوپرفیوژن مخازن مختلف دستگاه را بر عهده داشت. به‌منظور تعادل سیستم، خروج مازاد رادیواکتیو برداشت نشده و برقراری یک خروجی پایدار از سیناپتوزوم‌ها، ۴۰ دقیقه پس از شروع سوپرفیوژن و در فواصل زمانی یک دقیقه‌ای نسبت به جمع‌آوری نمونه‌ها اقدام می‌شد. مواد و محلول‌های مورد نظر در مخازن ذخیره قرار داده می‌شدند و بعد از هواگیری و تنظیم حرارت از طریق لوله‌های رابط و دریچه‌های الکتریکی کنترل کننده تخلیه، به مخازن سوپرفیوژن در پایین منتقل می‌شدند. با استفاده از محلول تحریک که حاوی غلظت ۱۵ میلی مولار پتاسیم بود؛ غشای سیناپتوزوم‌ها دپولاریزه می‌شد. بعد از جمع‌آوری تمام نمونه‌ها و پایان سوپرفیوژن، ۴۰۰ میکرولیتر از هر نمونه جدا و با ۴ میلی لیتر کوکتل به‌خوبی مخلوط شد. سپس فعالیت رادیواکتیویته کلیه نمونه‌ها با کمک دستگاه بتاکانتر تعیین گردید. به روش مشابهی فعالیت رادیواکتیویته باقی‌مانده روی فیلترها نیز تعیین می‌شد. سپس این مقادیر به‌صورت درصدی از مقدار کل رادیواکتیویته موجود در بافت به هنگام شروع جمع‌آوری هر نمونه محاسبه می‌شد.

نتایج

روند خروج خودبه‌خود و تحریک شده گابای نشان‌دار از سیناپتوزوم‌ها و اثر پاراکسون بر آن در شکل۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: روند زمانی رهایش خود به خود و تحریک شده گابا از سیناپتوزوم‌های مخچه موش و اثر پاراکسون بر آن.

بعد از ۴۰ دقیقه سوپرفیوژن و برقراری تعادل در سیستم (زمان صفر)، نمونه‌ها در فواصل یک دقیقه‌ای جمع‌آوری شدند. با استفاده از محلول تحریک (K^+ 15mM) سیناپتوزوم‌ها به مدت ۱۲۰ ثانیه دپولاریزه شدند (دقایق ۳ و ۲۳). این دو تحریک با خطوط کوتاه در پایین شکل مشخص شده است. پاراکسون در سه غلظت ۰/۰۳، ۳ و ۳۰۰ میکرومول هم زمان با تحریک دوم به سیستم اضافه شد. هر نقطه میانگین ۵ آزمایش مختلف است. (مقادیر SEM در هیچ موردی از ۱۵ درصد میانگین بیشتر نبود و نشان داده نشده است).

در مدت جمع‌آوری نمونه‌ها خروج خودبه‌خود ماده نشان‌دار دارای یک الگوی ثابت و خطی بود. با افزایش غلظت یون پتاسیم در محیط و ایجاد دپولاریزاسیون در غشای سیناپتوزوم‌ها، ترشح آنها به ۲ تا ۳ برابر مقادیر پایه می‌رسید. اگر چه این افزایش بلافاصله بعد از تحریک آغاز می‌شد ولی با توجه به سرعت سوپرفیوژن و طول مسیر بین فیلترها و خروجی سیستم، بروز آن در خروجی سیستم با یک تأخیر زمانی همراه بود. بنابراین حداکثر پاسخ تحریکی سیناپتوزوم‌ها در نمونه‌ای که مدت کوتاهی پس از شروع

www.SID.ir

Archive of SID

تحـریک جمع‌آوری گـردید، قابل مشاهده بود. با جایگزینی محلول اسـتاندارد و ریپولاریـزه شـدن مجـدد غشـاء، فعالیـت رادیواکتیو در نمونه‌ها به حالت قبل از تحریک بر می‌گشت. حفظ قابلیت پاسخ به تحـریک، حتـی بعـد از گذشـت یـک سـاعت از شـروع لایه‌گذاری سیناپتوزوم‌ها و تشابه زیاد بین پاسخ اول و دوم از نظر کمی و کیفی از فراهم بودن زمان کافی جهت انجام آزمایش دلالت دارد. رهایش خـود بـه خود و تحریک شده گابا از سیناپتوزوم‌ها درگروه پاراکسون نسبت به گروه کنترل تفاوتی نداشت.

بحث

بـر اساس نتایج این بررسی به‌نظر می‌رسد پاراکسون به‌طور مستقیم رهـا شـدن گابـا را تحـت تأثـیر قرار نمی‌دهد. اگر چه گزارش‌های معـدودی در مورد اثر پاراکسون بر سیستم گابا وجود دارد ولی نتایج ایـن تحقـیقات از تـنوع زیادی برخوردار است. گزارش‌های محققین مخـتلف مبنـی بـر عدم تأثیر پاراکسون بر مقدار و متابولیسم گابا در نواحـی مخـتلف مغـز، اثـر آنتاگونیسـتی بـر گیرنده‌های گابا و حتی افـزایش رهـایش خـود بـه خـودی گابـا در اثـر پاراکسـون از ایـن گسـتردگی حکایـت دارد [۳، ۱۸]. گـرچه در ایـن مطالعه پاراکسون به‌عنوان یک ترکیب ارگانوفسفره مورد استفاده قرار گرفته است ولی بـاید توجـه داشـت که این سموم فقط و فقط در دو ویژگی اسکلت سـاختمانی و خاصـیت مهار کولین استراز با یکدیگر اشتراک دارند و در سـایر مـوارد تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای بین انواع گوناگون این مواد وجود دارد و نمی‌توان عدم تأثیر پاراکسون بر رهایش گابا را در مـورد دیگر ترکیبات ارگانوفسفره هم تعمیم داد. از سوی دیگر ناچیز بـودن مقـدار اسـتیل کولین مخچه در مقایسه با سایر نواحی مغز تا حـدود زیـادی تأثـیر کولیـنرژیک پاراکسون بر رهایش گابا را حذف نموده و شناسایی اثرات غیرکولینرژیک را با سهولت بیشتری فراهم مـی‌سـازد. در حالـی‌کـه اکـثر مطالعـات موجـود تـنها مکانیزم‌های کولیـنرژیک را مـورد توجـه قرار داده‌اند؛ به‌عنوان نمونه در حالی‌که افـزایش رهـایش گابـا در اثـر فعالیت گیرنده‌های نیکوتینی گزارش شـده اسـت [۱۹]، مهار رها شدن گابا به‌عنوان یکی از مکانیزم‌های تشـنج‌زایـی سـومان معرفـی شـده اسـت [۲۰]؛ از سـوی دیگـر Shih تشـنج زایـی سومان را به دلیل افزایش استیل‌کولین می‌داند. وی تغیـیرات گابـا را بـه صـورت افـزایش گزارش نموده و آن را به ازدیـاد استیل‌کولین نسبت می‌دهد [۲۱]. Ferraro نشان داد استیل کولیـن از طـریق گیرنده‌های M_2 رهایش گابا را مهار می‌کند [۲۲]. Avignon افـزایش رهایش گابا را به دنبال فعال شدن گیرنده‌های M_1 نشان داده است [۲۳]. Harsing در یک جمع‌بندی کلی به هر دو اثـر تحریکـی و مهـاری استیل‌کولین بر سیستم گابا اشاره کرده اسـت [۲۴]. توجـه بـه شـباهت سـاختمانی بیـن گیرنده‌های گابا و گـیرنده‌هـای نیکوتینـی، مشکلات بررسی امکان تداخل دو سیستم کولینرژیک و گابارژیک (GABAergic) را افزایش می‌دهد. به‌طور نمونـه Wotring نشـان داده اسـت کـه برخـی آنتاگونیسـت‌هـای نیکوتینـی گیرنده‌های گابا را هم مهار می‌کنند [۲۵]. به هر حال در این تحقیق بررسی خواص پاراکسون مد نظر نبوده و تأکید اصلی بر معرفـی ویژگـی‌هـای بالقوه روش سوپرفیوژن است. بررسی رهایش میانجـی عصبی، مکانیزم‌های تنظیم کننده آن و تداخل سیستم‌های نوروترانسـمیتری بـا روش‌هـای مختلفـی قـابل بررسی است. روش سوپرفیوژن امکان ارزیابی مستقیم این پدیده را به صورتی دینامیکی و عـاری از مکانـیزم‌هـای پـس‌نورد فراهم می‌سازد. اگر چه در این روش می‌توان از برش‌های بافتی نیز استفاده نمود، ولی در این حال بـرای حـذف تفـاوت‌های ناشی از یکسان نبودن مساحت نمونه‌ها و امکان وجود تفاوت‌های مختصر در ضخامت نواحی مختلف برش‌ها اغلـب از دو پـالس تحریک با فاصله زمانی مناسب استفاده می‌شود. بـه ایـن ترتیب که برای قابل مقایسه بودن نتایج کانال‌های مختلف دستگاه، پاسخ اول و دوم هر نمونه به صورت یک نسبت محاسبه و بـه‌عـنوان معـیار ارزش‌یابـی مـورد اسـتفاده قـرار می‌گیرد. در مورد اسـتفاده از نمونـه‌هـای سـیناپتوزومی ایـن مشکل مطرح نیست. در ایـنجا خروجـی سیسـتم در مورد هر یک از مخازن دستگاه برحسب درصـد بـیان مـی‌شود و به این ترتیب تنها با یک پالس تحریکی و معمـولاً با جمع‌آوری فقط سه نمونه (قبل از تحریک، تحریک و بعد از تحریک) به راحتی می‌توان آزمایشی کامل را انجام داد.

در بررسی و شناسایی پاتوژنز عوارض مرکزی ترکیبات ارگانوفسفره، وجود طیف وسیعی از اثرات پیش و پس سیناپسی و همین‌طور سایر مکانـیزم‌هـای غـیر وابسته به مهار کولین‌استراز از یک سو و تداخل ناشی از افزایش استیل کولین بر سایر سیناپس‌های عصبی شیمیایی از سـوی دیگـر، ضـرورت تفکیک و بررسی جداگانه هر یک از این مـوارد را به خوبی نمایان می‌سازد. روش سوپرفیوژن تا حدود زیادی دسـتیابی بـه ایـن امـر را امکان‌پذیر می‌سازد. گرچه به‌عنوان اولین تجـربه سـوپرفیوژن، در ایـن مطالعـه از گابای اگزوژن استفاده شده

www.SID.ir

Archive of SID

اسـت ولـی نمـی‌توان در مورد شباهت توزیع داخل سیتوزولی آن با ذخایر اندوژن گابا کاملا مطمئن بود. از طرف دیگر به نظر نمی‌رسد مکانیزم‌های ترشحی در مورد ذخایر مختلف داخل سلولی با یکدیگر مـتفاوت باشـند. به هر حال یکی از راه‌های حل این مسئله سنجش مقـدار مـاده انـدوژن مورد نظر در خروجی سیستم است. این کار به کمـک روش‌های حساس کروماتوگرافی به راحتی قابل انجام است. بـه این ترتیب می‌توان برداشت و رهایش انواع مختلف میانجی‌های عصبی، گیرنده‌ها و پروتئین‌های حامل آنها و تداخل سایر سیستم‌ها بـا ایـن عناصر را بررسی نمود. مزیت دیگر روش سوپرفیوژن امکان تغییر و جایگزینی محلول‌ها و داروهای مورد بررسی در هر لحظه از زمـان اسـت. ایـن کـار از طـریق پمـپ ساکشن و از بالای مخازن سوپرفیوژن امکان‌پذیر است. لوله‌های رابط این پمپ طوری طراحی شـده‌انـد کـه در زمـان تخلـیه مخـازن سـوپرفیوژن آسیبی به لایه سیناپتوزومی روی فیلترها وارد نکنند.

منابع

1- Kwong TC. Organophosphate pesticides: Biochemistry and clinical toxicology. Therapeutic Drug Monitoring 2002;24:144-1.

2- Gunderson CH, Lehmann CR, Sidell FR and Bahman J. Nerve agents: A Review. Neurology 1992;42:946-950.

3- Rocha ES, Swanson KL, Aracava Y, Goolsby JE, Maelicke A and Albuquerque EX. Paraoxon: Cholinestrase-independent stimulation of transmitter release and selective block of ligand-gated ion channels in cultured hippocampal neurons. J Pharmacol Exp Ther 1996;78:1175-1187.

4- McDonough Jh Jr and Shih TM. Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. Neuroscience Biobehavioral Review 1997;21(5):559-579.

5- Tuovinen K. Organophosphate-induced convulsions and prevention of neuropathological damages. Toxicology 2004;196:31-39.

6- Katz EJ, Cortes VI, Eldefrawi ME and Eldefrawi AT. Chlorpyrifos, parathion, and their oxons bind to and desensitize a nicotinic acetylcholine receptor: relevance to their toxicities. Toxicol Appl Pharmacol 1997;146:227-236.

7- Pala I, Vig PJS and Desaiah D. In vitro effects of organophosphorus compounds on calmodulin activity. J Appl Toxicol 1991;11(6):391-395.

8- Sun X, Liu X, Martinez JR and Zhang GH. Effects of low concentrations of paraoxon on Ca^{++} mobilization in a human parotid salivary cell-line HSY. Archive Oral Biology 2000;45:621-638.

9- Videira RA, Antunes-Madeira MC, Lopes VI and Madeira VM. Changes induced by malathion, methylparathion and parathion on membrane lipid physicochemical properties correlate with their toxicity. Biochim Biophys Acta 2001;1511(2);360-368.

10- Raiteri M, Angelini F and Levi G. A simple apparatus for studying the release of neurotransmitter from synaptosomes. Eur J Pharmacol 1974;25:411-414.

11- Raiteri L and Raiteri M. Synaptosomes still viable after 25 years of superfusion. Neurochem Res 2000;25:1265-1274.

12- Garci-Sanz A, Badia A and Clos MW. Superfusion of synaptosomes to study presynaptic mechanisms involved in neurotransmitter release from rat brain. Brain Res Protocols 2001;7:94-102.

13- MacDemott AB, Role LW and Siegelbaum SA. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release. Annu Rev Neurosci 1999;22:443-485.

14- Whittaker VP. Thirty years of synaptosome research. J Neurocytol 1993;22:735-742.

15- Jarssam D, Ruigrok TJH, Caffe R, CozzariC, Levey AI and Mugnaini E etal. Cholinergic innervation and receptors in the cerebellum. Progress in Brain Research 1997;114:67-96.

16- Marcoli M, Rosu C, Bonfanti A, Raiteri M and Maura G. Inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine$_{2A}$ receptors regulate evoked glutamate release from rat cerebellar mossy fibers. J Pharmacol Exp Ther 2001;299(3):1106-1111.

17- Cunha RA, Constantino MD and Ribeiro JA. Inhibition of [^{3}H] GABA release by kinate receptor activeation in rat hippocampal synaptosomes. Eur J Pharmacol 1997;323:167-172.

18- Coudray-Lucas C, Prioux-Guyonneau M, Sentenac H, Cohen Y and Wepierre Y. Effects of physostigmine, paraoxon and soman on brain GABA level and metabolism. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 1984;2:153-157.

19- Kofalvi A, Sperlagh B, Zelles T and Vizi ES. Long-lasting facilitation of 4-amino-n-[2,3-(3)H]butyric acid ([(3)H]GABA) release from rat hippocampal slices by nicotinic receptor activation. J Pharmacol Exp Ther 2000;295(2):453-62.

20- Chebabo SR, Santos MD and Albuquerque EX. The organophosphate sarin, at low concentrations, inhibits the evoked release of GABA in rat hippocampal slices. Neurotoxicol 1999;20(6):871-82.

21- Shih TM and McDonough Jh Jr. Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. J Appl Toxicol 1997;17(4):255-64.

22- Ferraro L, Beani L, Bianchi C and Tanganelli S. Inhibitory cholinergic control of endogenous GABA release from electrically stimulated cortical slices and K^+-depolarized synaptosomes. Neurochem Int 1997;31(6):795-800.

23- Avignone E and Cherubini E. Muscarinic receptor modulation of GABA-mediated giant depolarizing potentials in the neonatal rat hippocampus. J Physiol 1999;518.1:97-107.

24- Harsing Lg Jr and Zigmond M. Postsynaptic integration of cholinergic and dopaminergic signals on medium-sized GABAergic projection neurons in the neostriatum. Brain Res Bull 1998;45(6):607-613.

25- Wotring VE and Yoon KW. The inhibitory effects of nicotinic antagonists on currents elicited by GABA in rat hippocampal neurons. Neuroscience 1995;67(2):293-300.

www.SID.ir