بررسی اثرات به‌کارگیری باکلوفن (آگونیست رسپتور GABA-B) به تنهایی و همراه با LRH-A ومتاکلوپرامیدبرآزادسازی GTH-I درماهی کپور (Cyprinus carpio L.)

دکترشهربانو عریان[1] * دکترکاظم پریور[1] خلیل راسخی[1]

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

هدف: بررسی نقش احتمالی نورو ترانسمیترگاماآمینوبوتیریک اسید (گابا) وچگونگی تاثیرآن در تنظیم فعالیت هیپوفیزی ماهیان، با تاکید 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 هفت‌گروه تجربی ویک‌گروه کنترل بترتیب جهت تزریق (IP) داروهای Bac(۹میلی‌گرم در کیلوگرم)، LRH-A (50µg/kg) و Met (۱۵میلی‌گرم در کیلوگرم) و Bac+Met+LRH-A و Bac+Met و Met+LRH-A و LRH-A، Bac+LRH و حلال مشترک سالین درنظرگرفته شد. در این پروژه دو مرحله خونگیری وجود داشت که مرحله اول قبل از تزریقات و مرحله دوم ۵ساعت پس از تزریقات صورت می‌گرفت.

تجزیه وتحلیل آماری: آزمون t-test یا Mann-whithney U-test جهت مقایسه مقادیر GTH-I سرم قبل از تیمار وبعد 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 ازسیکل جنسی) درمیزان ترشح GTH-I هیپوفیزی نیستند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج فوق، گابا ممکن است یکی از فاکتورهای تعدیل کننده 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.

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]

[1]Department 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 imediately before injection and 5 hours after then.

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

تحقیقات و بررسیها در سالهای اخیر ثابت کرده‌اندکه گابا در تنظیم ترشح هورمونهای هیپوتالاموسی و تعدادی از هورمونهای هیپوفیزی پستانداران شامل هورمونهای گنادتروپیک شرکت دارد (۹). اما نظرات و عقاید در مورد اثر مهارکنندگی یا تحریک کنندگی گابا در این اعمال، بحث برانگیزبوده و روشن و اضح نیستند. برطبق نظر Scott و Glarke درسال ۱۹۹۳ گابا آزادسازی LH را به‌وسیله رسپتورهای نوع A مهار می‌نماید، در حالی‌که مطالعات Wilson و همکاران درسال ۱۹۹۰، ثابت نمود که گابا ترشح هورمون مزبور را با دخالت رسپتورهای نوع B مهار می‌کند. از طرف دیگر Moguilevsky و همکارانش درسال ۱۹۹۱ نقش تحریکی گابا را درترشح گنادوتروپین پستانداران گزارش دادند، هرچندکه این اثرراوابسته به بلوغ جنسی جانوران دانسته‌اند. به‌علاوه درپستانداران نشان داده شده که گابا با چند نورو ترانسمیتر مرکزی دیگر که در ترشح GTH-I مؤثرند (ازقبیل LHRH، NE، DA، 5HT و پپتیدهای اپیوئید) در تعامل است. درارتباط باماهیان، گرچه اطلاعاتی مبنی بروجود نورونهای گابا ارژیک درمغزوهیپوفیز goldfish به‌دست آمده است، اما دخالت گابا در کنترل فرآیندهای تولید مثلی، کمترمورد مطالعه گرفته است.

تجربیاتی 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 زیست شناسی دانشکده علوم، دانشگاه تربیت معلم تهران، تهران - ایران.
*) نویسنده مسؤول: sh_oryan@yahoo.com

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 گاباقادر به القای تغییرات در میزان پلاسمایی FSH (معادل GTH-I ماهیها) نمی‌باشد(۱۲) گرچه همه محققین فوق الذکر بر این اصل که گابا فاکتور تعدیل کننده ترشح GTH-II می باشد، متفق القول‌اند، اما نظرات آنها در مورد ویژگی اثر این نوروترانسمیتر بر روی ترشح گنادوتروپین، به‌طور چشمگیر، باهم متفات است، به‌طوری‌که Kah وهمکاران در سال ۱۹۹۱ و Trudeau وسایرین در سال ۱۹۹۳ اظهار کردند که گابا اثر تحریک کنندگی در goldfish نابالغ دارد، در حالی‌که Roelants و همکارانش در سال ۱۹۹۰ و Popek ودیگران در سال ۱۹۹۴ بر اثرات مهاری گابا بر روی ترشح GTH-II در کپور بالغ طی پریود نزدیک به تخمریزی تأکید داشتند. از طرف دیگر، Kah وهمکارانش 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 هیبوفیزی به اثبات رسانده‌اند.

مطالعاتی که در این زمینه هم در محیط in vivo و هم در شرایط in vitvo انجام گرفته، مربوط به Sokolowska-Mikolajczyk و همکارانش در سال ۱۹۹۷ می‌باشد که طی آن تأثیر تعدادی از آگونیست‌ها و آنتاگونیست‌های رسپتورهای A و B گابا را بر ترشح GTH-II القای شده با GnRH-A در طول فصل تخم ریزی کپور، مورد آزمایش قرار داده‌اند. این محققین از آزمایشهای خود چنین نتیجه گرفتند که گابا می‌تواند 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 می‌نماید. همچنین آنها دریافتند که رسپتورهای نوع A از طریق مهار آزاد سازی GnRH، باعث توقف ترشح GTH2 می‌شوند، در حالی که رسپتورهای نوع B، این عمل را به دو طریق انجام می‌دهند: 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 تخم ریزی با هدف سنجش GTH-II انجام گرفته، لذا بر آن شدیم تا در ادامه کار این محققین، نقش این نورو ترانسمیتر را در مرحله پس از تخم‌ریزی (مرحله Sexual regression)، با تاکید بر سنجش GTH-I در ماهیان کپور ماده مورد بررسی و مطالعه قرار دهیم.

مواد و روش‌کار

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 مردادماه (یک ماه نیم پس از اتمام فصل تخم ریزی)، 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 ۸-۳ سال و میانگین وزنی ۱/۷±۳/۴ کیلوگرم (kg,Mean±SD) از یکی از استخرهای خاکی (مترمکعب ۳۰۰) واقع در آن مرکز

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 مردادماه؛ دمای هوا و آب در در حین آزمایش بترتیب: ۲۱°C، ۲۶°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 می‌شدند.

داروها: داروهای مورد استفاده در تجربیات عبارت‌اند از: باکلوفن (Bac، Baclofen) به‌عنوان آگونیست اختصاصی رسپتور گابا- B محصول شرکت Heuman pharma آلمان، متاکلوپرامیدهیدروکلراید(Hcl,Met. Metoclopramid) به‌عنوان آنتاگونیست رسپتور D2 دوپامین محصول شرکت Ledichem اسپانیا، LRH-A (Releasing hormone D-Ala Analog Luteotropin) ساخت کشور چین؛ حلال همه موارد فوق سالین ۰/۶ درصد (Nacl) می باشد، با این تفاوت که LRH-A و Met. براحتی در سالین حل می‌شوند اما برای حل نمودن باکلوفن، نیاز به تغییر موقتی PH محلول می‌باشد. بدین منظور ابتدا PH محلول سالین را به‌وسیله 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 می‌شود. محلولهای تزریقی، بلافاصله بعد از انجام عملیات تزریق به طور تازه تهیه می‌گردید. 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.

خونگیری: در این عملیات دو مرحله خونگیری و بدنبال خونگیری اول نیز یک مرحله تزریق وجود داشت. اولین مرحله خونگیری در ساعت مشخصی از روز انجام می‌شد و دومین مرحله آن نیز ۵ ساعت بعد صورت می‌گرفت، و در هر مرحله ماهیها ابتداد به وسیله پودر گل میخک (قرنفول) (Syzgium aromaticum) Myrtaceae بیهوش شده و پس از علامت گذاری به‌وسیله تگهای شماره دار، با استفاده از سرنگ هپارینه 5cc و سر سوزن (Gauge) ۲۲G، از طریق قوس خونی (Hemal arc) در ناحیه انتهایی دم، خونگیری می‌شدند و به دنبال آن نیز تزریقات مربوطه هر گروه، برای ماهیهای خونگیری شده به عمل می‌آید. پس از جداسازی سرم از نمونه خونی، میزان گنادوتروپین (GTH-I) آنها با استفاده از روش RIA (Radioimmunoassay) مورد سنجش قرار می‌گرفت.

روشهای آماری

برای مقایسه بین مقادیر GTH-I سرم قبل از تیمار "Pre" (Pretreatment) و بعد از تیمار "Post" (Posttreatmen) آزمون t-test یا Mann-whithney U-test مورد استفاده قرار می‌گرفت. برای مقایسه مقادیر Post بین گروهها، ابتدا با استفاده از آزمون U-test، تشابه یا اختلاف مقادیر Pre هر دو گروه مورد آزمایش قرار می‌گرفتند، در صورتیکه Pre های آنها تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دادند، به جای مقادیر post، از درصد تغییرات GTH-I نسبت به مقادیر pre، برای مقایسه دو گروه استفاده می‌شد (U-test). جهت تشخیص وجود یا عدم وجود ارتباط بین وزن نمونه‌های هر گروه و تغییرات GTH-I سرم آنها، از آزمون همبستگی استفاده می‌گردید.

نتایج

برطبق جدول (۱)، در این تحقیق، ۷ گروه تجربی با اضافه یک گروه کنترل در نظر گرفته شده که در گره اخیر هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری از نظر مقادیر GTH، بین مراحل .pre و .post مشاهده نگردید.

تجربه ۱(Bac): نتایج حاصله از مطالعات آماری بیانگر وجود اختلاف معنی داربین مقادیر GTH-I سرم قبل از تیمار (۰/۵۲۸±۰/۰۸mIU/ml) و بعد از تیمار (۰/۳۳±۰/۰۲) می‌باشد ($p<0/05$)، از طرف دیگر با توجه به تفاوت معنی داربین مقادیر pre گروه (۱) و کنترل، برای تشخیص اثر تیمار با کلوفن، از مقایسه بین گروهی درصد تغییرات GTH-I نسبت به زمان صفر استفاده شد (۸/۷۳ ±۶۷و۲۰/۰۸±۱۳۳/۳)، که نتایج حاصله نشاندهنده وجود تفاوت نسبتاً معنی‌داری ($p<0/05$) بین این دو گروه می‌باشد (نمودار ۱و۲-الف).

تجربه ۲(LRH-A): آنالیز آماری داده‌ها، تفاوت معنی‌داری را بین مقادیر GTH-I سرم این گروه (۰/۲۸±۰/۰۳) با گروه کنترل (۰/۴۳±۰/۸۰) در مرحله پس از تیمار، نمی‌دهد (نمودار ۱).

تجربه ۳(LRH-A+Bac.): در این تجربه نیز هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری از نظر میزان GTH-I، بین دو مرحله خونگیری، و همچنین بین مراحل دوم خونگیری این گروه و گروه ۲ (LRH-A) وجود نداشت. اما زمانی که این مقادیر (۰/۲۵±۰/۰۴) با گروه کنترل (۰/۴۳±۰/۰۸) مقایسه شدند، اختلاف بسیار ضعیفی را از نظر کاهش میزان GTH-I خون نشان دادند، که البته این اختلاف در محدوده احتمالات بیولوژیکی قابل قبول نیست ($0/05<P<0/1$، نمودار ۲).

تجربه ۴(Met): نمودار ۱ مقادیر GTH-I مربوط به قبل و بعد از تزریق متاکلوپرامید و سالین را نمایش می‌دهد. در این شکل همچنین عدم اختلاف معنی‌دار بین مقادیر Post گروه ۴ (۰/۳۹±۰/۰۷) 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 معنی‌داری را حداقل در سطح $P<0/05$ بر میزان ترشح GTH-I نشان ندادند. در اینجا به علت تفاوت معنی‌دار بین مقادیر پایه GTH-I این گروه (۰/۷۴±۰/۲) با گروه ۴، از درصد تغییرات GTH-I نسبت به زمان صفر استفاده شد (نمودار ۲-ب) که بازهم بر عدم وجود یک اختلاف معنی دار بین آنها تأکید دارد ($P>0/05$).

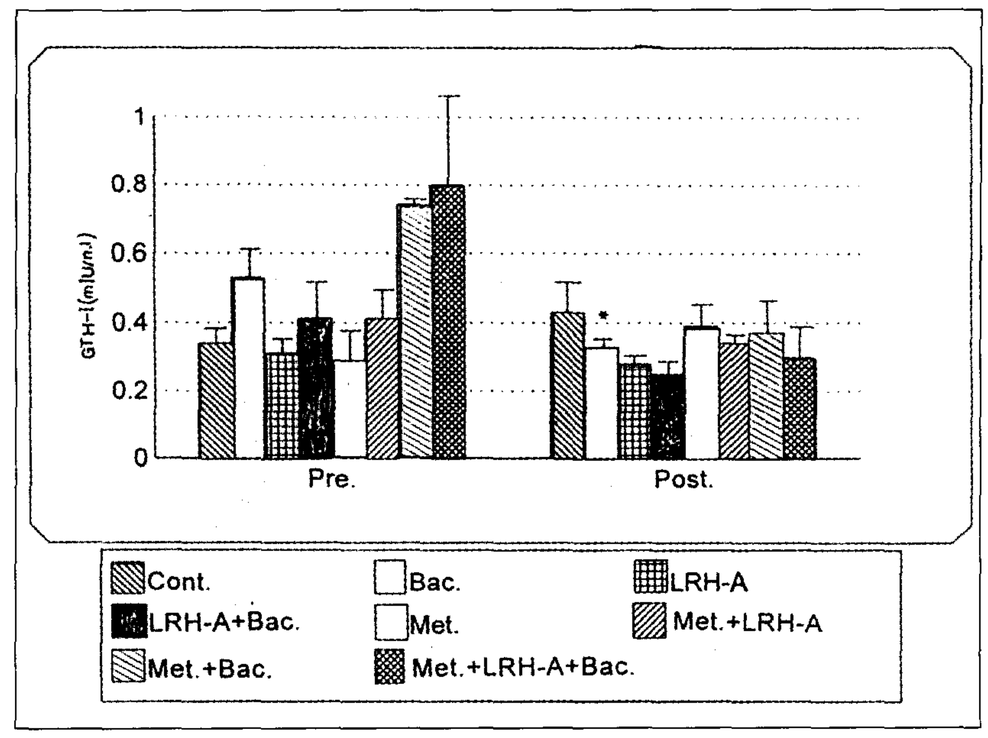
تجربه ۶(Met+LRH-A): آنالیز آماری داده‌ها نشان دادند که هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین سطوح GTH-I بعد از تزریق (۰/۳۴±۰/۰۲) و قبل از تزریق (۰/۴۱±۰/۰۸) و همچنین در مقایسه با گروه کنترل وجود ندارد. به همین ترتیب بین این گروه با گروه تیماری LRH-A نیز تفاوت قابل قبولی وجود نداشت ($P>0/05$، نمودار ۱).

تجربه ۷(Met.+LRH-A+Bac.): در این تجربه نیز نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌های مقادیر GTH-I قبل از تزریق (۰/۸ ±۰/۲۷) و بعد از تزریق (۰/۳±۰/۱۲)، و همچنین نسبت به گروه ۶ و گروه کنترل، حاکی از عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین آنها می‌باشد (نمودار ۱). در یک آنالیز دیگر برای سنجش همبستگی بین سن ماهیان هر گروه با درصد تغییرات GTH-I 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

بحث‌های ضد و نقیضی که تاکنون در مورد نقش مهاری یا تحریکی گابا در آزاد سازی هورمون گنادوتروپین پستانداران و ماهیها صورت گرفته، ممکن است ناشی از ناهمگنی رسپتورهای گابا ارژیک 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 GTH-II در ماهیهان (۱۸، ۱۵، ۱۳، ۱۱، ۸) مشارکت دارند. اما همان‌گونه که ذکر شد، هیچ نوع گزارشی مبنی بر اثر تنظیمی این رسپتورها بر GTH-I ماهیها وجود ندارد.

مشاهدات تجربه (۱) حاکی از آن است که گابا می‌تواند به‌عنوان یک عامل مهاری بر ترشح پایه GTH-I اثر بگذارد. برای چنین اثری دو راه مختلف برای عمل گابا (در ارتباط با GTH-II) گزارش شده است: یکی با تأثیر مستقیم بر سلولهای غده‌ای هیپوفیز (به‌عنوان نوروهورمون)، و دیگری، به‌طور غیرمستقیم و با واسطه سایر فاکتورهای مغزی (ازجمله DA و GnRH) این



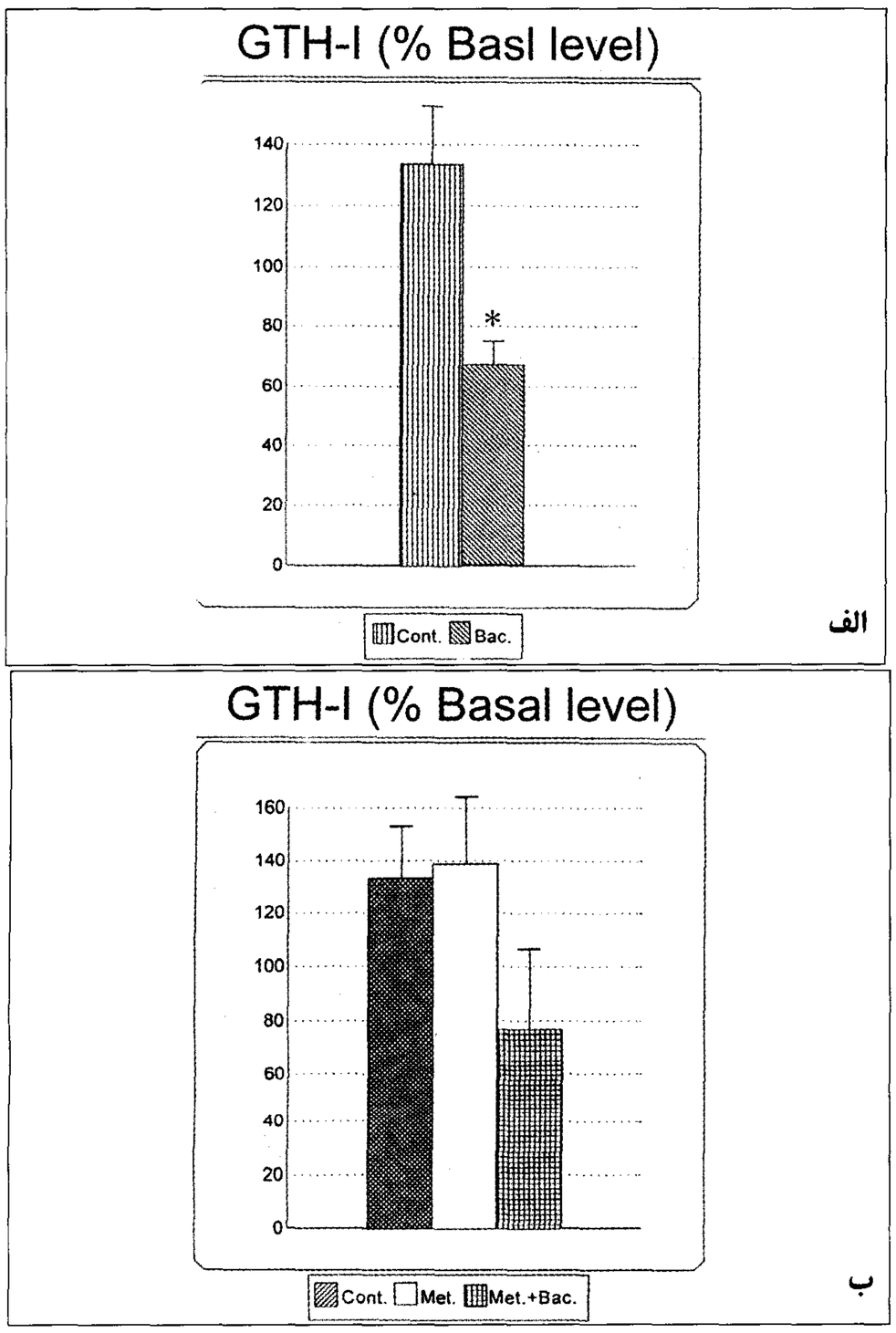
نمودار۱- اثرات ناشی از تزریق LRH-A,Bac.,LRH-A+Bac.,Met.,Met+Bac,Met.+LRH-A,Met.+LRH-A+Bac. برسطوح GTH-I سرم خون (×=p<۰/۰۵).

عمل را به انجام می‌رساند (به‌عنوان نوروترانسمیتر):

الف- در روش اول، مسلماً وجود گیرنده‌های گابا بر روی سلولهای گنادوتروفی هیپوفیز ضرورت دارد. حضور این گیرنده‌ها در پستانداران تا حدودی به اثبات رسیده است (۱،۱۹) در تلئوستها نیز بعلت وجود عصب رسانی هیپوفیزی مستقیم و منحصر به فرد در بین مهرداران، در نگاه اول، وجود این رسپتورها را در سطح سلولهای ترشحی هیپوفیزی آنها محتمل می‌نماید؛ به‌علاوه اینکه شرکت فیبرهای گابا ارژیک 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 آگونیست‌های آن بر روی سلولهای گنادوتروفیکی goldfish می باشد (۷)، ضمن اینکه مواردی از تأیید حضور این رسپتورها نیز وجود دارد. به‌عنوان مثال طی آزمایشاتی مشخص شده است که گابا باعث افزایشی در سطوح کلسیم داخل سلولی در سلولهای گنادوتروفی goldfish می‌شود، که نشان می‌دهد گابا می‌تواند آزادسازی GTH را مستقیماً در سطح سلولهای گنادوتروفی تحریک نماید.

ب- در ارتباط با روش دوم نیز به نوبه خود دو راه را می‌توان برای عمل تنظیمی گابا پیشنهاد نمود، یک راه از طریق تأثیر مرکزی بر سایر نورونهای نوروسکرتری در هیپوتالاموس و روش دیگر که با تأثیر برگیرندههای خود در پایانه‌های عصبی منتهی به هیپوفیز صورت می‌گیرد، که درهر دو صورت باعث تنظیم ترشح عوامل: (Releasing Factor)"RF" یا (Inhibiting Factor)"IF" موثر بر هیپوفیز می‌گردد.

از آنجایی که در پستاندارن، گابا می‌تواند با سایر نوروترانسمیترهای مؤثر بر ترشح گنادوتروپین (مانند GnRH، نوراپی نفرین یا دوپامین) برهم کنش داشته باشد، احتمال می‌رود 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،



نمودار۲- 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 می‌نمایند. محقیقن مزبور، اثر غیر مستقیم گابا را بر ترشح GTH-II، از طریق اثر بر نورونهای دوپامینرژیک و یا GnRH مورد تأکید قرار داده‌اند.

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، به‌عنوان عمده ترین فاکتورهای RF و IF برای آزاد سازی گنادوتروپین از هیپوفیز شناخته شده‌اند.

براساس فرض دوم، دوروش برای اثر گابا با میانجی گیری فاکتورهای مزبور وجود دارد، یکی تأثیر بر آزادسازی دوپامین و GnRH از نورونهای مرکزی و روش دیگر با تحریک یا مهار پایانه‌های نورونی مربوط به آنها در سطح هیپوفیز می‌باشد. از طرف دیگر همان‌گونه که قبلاً نیز بدان اشاره شد، نوروترانسمیتر دوپامین به‌عنوان عامل IF با GnRH برهم کنش داشته و این عمل را از دو طریق انجام می‌دهد، یکی با تأثیر بر رسپتورهاب D2 در سطح سلولهای گنادوتروف و به‌دنبال آن مهار سیگنال ترانسداکشن GnRH و روش دیگر با مهار آزادسازی GnRH از پایه‌های نورونی آن در سطح هیپوفیز و همچنین در سطح هیپوتالاموس جلویی - پره اپتیک بر این اساس گابا برای

ایجاد اثرات مهاری غیرمستقیم خود بر GTH یا باید رسپتورهای مهاری خود را که بر روی نورونهای GnRH قرار دارند فعال نماید، یا اینکه نورون‌ها دوپامینرژیکی را جهت آزاد سازی دپامین تحریک کند، که درهر دو صورت منجر به کاهش آزادسازی GTH از سلولهای هیپوفیزی می‌شوند.

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 نمی‌کند. دلایل احتمالی این نتایج را می‌توان به سه دسته تقسیم نمود:

الف ـ ممکن است همانند بیشتر تجربیات مربوط به GTH-II، به‌طور کلی به‌کاربردن آنالوگ GTH-I به‌صورت مجزا، و یا مهار دوپامین به تنهایی، قادر به فعال کردن سلولهای گنادوتروپینی در هیپوفیز نبوده و برای تحریک آزادسازی گنادوتروپین‌ها (در اینجا نوع I) بایستی هردوی این فاکتورها را توأماً به‌کاربرد.

ب- ممکن است هیچ‌کدام از فاکتورهای تیماری جزء عوامل کنترل کنندهٔ ترشح GTH-I نبوده و یا لااقل از اهمیت کمتری برخوردار باشند. نظیر همین فرضیه، اخیراً در مورد ماهی قزل آلای رنگین کمان به اثبات رسیده است، به‌طوری‌که مشخص شده، GnRH قادر به تحریک معنی دار GTH-I در هیچ‌کدام از مراحل گامتوژنز نبوده و آنتاگونیست دوپامین (Pimozide) نیز در القای عمل تحریکی GnRH بر ترشح GTH-I ناتوان است (۲،۳).

ج- گروه سوم دلایل را می‌توان در ارتباط با تغییرات فصلی رشد و نموگنادی و فعالیت جنسی بیان نمود. تحقیقات انجام شده بر روی تعدادی از گونه‌های ماهیان، بخصوص goldfish، بیانگر وجود اختلافات فصلی در پاسخ دهی نسبت به تزریق آنتاگونیست دوپامین، LRH-A و یا ترکیبی از ایندو می‌باشد به‌عنوان مثال goldfish بیشترین پاسخ را به ترکیب pimozide و در مرحله آخر فعالیت مجدد جنسی (Late recrudescence) و کمترین پاسخ را در مرحلهٔ پس روی جنسی نشان می‌دهد. تقریباً همین نتیجه نیز در مورد کپور حاصل شده است به‌طوری‌که Weil و همکاران در سال ۱۹۷۵ گزارش نموده‌اند که ماهیهای کپوری که پس روی جنسی داشته‌اند، 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 دوپامین موجود بر روی سلولها GTH و یا ترکیبی از این عوامل به‌علاوه عوامل ناشناخته دیگر باشد (۱۶).

از طرف دیگر اگر به نتایج گروه ۲ کمی دقت کنیم نکته جالبتری را درمی‌یابیم و آن اینکه مشاهده می‌شود مقادیر GIH-I سرم در دومین خونگیری، تغییرات کاهشی کمی نسبت به زمان صفر خود نشان می‌دهند. با توجه به کمی اطلاعات موجود در این زمینه، در حال حاضر، توضیح زیادی برای این تأثیر مهاری نمی‌توانیم 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 می‌شود؛ درست شبیه به وضعیتی که در پستانداران (Rat) وجود دارد. در این رابطه تجربه‌ای نیز بر روی ماهی goldfish به‌دست آمده است که بر طبق آن استفاده از دوز بالای LHRH-A در مرحله مجدد فعالیت جنسی منجر به کاهشی در GSI شاخص رشد گنادی (Index Gonadosomatic) می‌شود (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 Mci انجام دادیم که باز هم نتایج آن حاکی از عدم تاثیر گذاری تلفیق این دو فاکتور بر آزاد سازی GTH-I هیپوفیزی می‌باشد. بنابراین فرض مربوط به اثر مهاری دوپامین بر عملکرد GnRH درونزا، در سطح گنادوتروفهای GTH-I رد می‌شود.

در نهایت برای تکمیل آزمون فرضیات مربوط به اثر گابا، گروههای آزمایشی ۳،۵،۷ را با ترکیبهای Bac+Met.,Bac+LRH-A 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 هیچ‌گونه 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 را 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 به‌دست آوردیم. در توجیه نتایج فوق می‌توان چنین استدلال کرد که در تجربه شماره ۵ (Met+Bac)، اگر فرض نماییم با کلوفن عمل تحریکی خود را از طریق مهار ترشح دوپامین به انجام می‌رساند، بنابراین انتظار می‌رود که در این آزمایش اثر با کلوفن تشدید یابد، چرا که خود متاکلوپرامید نیز بلوکه کننده دوپامین به شمار می‌رود، اما عملا چنین نتیجه‌ای به‌دست نیامد.

حال اگر عمل مهاری با کلوفن را به گونه‌ای در نظر بگیریم که آنرا از طریق تحریک سنتز و آزاد سازی دو پامین به ثمر برساند (۱۳)، بنابر این با توجه به اعمال مخالف Bac و Met نسبت به هم، چنین نتیجه‌ای (تاثیر ضعیف) قابل انتظار خواهد بود، چرا که ایندو تقریبا همدیگر را خنثی می‌نمایند. در تجربه سوم نیز، که طی آن تزریق با کلوفن را با LRH-A توأم نموده‌ایم، 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 نمی‌دهد، 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 هیچ‌کدام از دو فاکتور فوق عمل نکرده و اثر خود را از طریق سایر فاکتورهای هیپوتالاموسی اعمال می‌نماید. در آخرین تجربه و با استفاده از تلفیق هر سه فاکتور، Met، Bac 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 (شبیه به آن چیزی که در مورد GTH-II به اثبات رسیده است)، به عبارت دیگر

مجموعه اثرات Met و Bac برعملکرد LRH-A، ممکن است بتواندمنجربه تغییرمعنی داری درترشح GTH-I ازسلولهای هیپوفیزی گردد.

با مراجعه به تجارب قبل ملاحظه می‌شود، که Metهیچ‌گونه تاثیری برعملکرد LRH-A نداردامابا کلوفن به همراه هرکدام از Met و LRH-A تاثیر زیادی رابرمیزان GTH-I سرم داشته ودرهردوحالت نیزاثرات آنها مهاری می‌باشد. درحالتMet+Bac ثابت شدکه علت عدم تاثیر معنی‌دار آنها ناشی ازخنثی شدن اثرات متقابل این دو فاکتور است ودرحالت Bac+LRH-A نیز دلیل مشخص وقابل ارائه‌ای وجود ندارد، بنابراین اگر مجموعه دلایل فوق راباهم درنظر بگیریم، علت عدم تاثیرمعنی‌دار این سه ماده فوق الذکر رادرتلفیق با یکدیگرمتوجه خواهیم شد.

نتیجه‌گیری

نتایج کلی حاصله از اجرای پژوهش به این ترتیب می باشند: ۱- سیستم گابا‌ارژیک درتنظیم ترشح GTH-I ازهیپوفیزکپورمعمولی نقش دارد. ۲- تزریق باکلوفن به تنهایی، قادراست ترشح GTH-I را ازطریق رسپتورهای نوع B گابا و درطول مرحله پس روی جنسی (regression) مهارنماید. ۳- هیچ‌کدام ازفاکتورهای تزریقی LRH-A (آنالوگ بسیارقوی GnRH) و متاکلوپرامیدهیدروکلراید (آنتاگونیست اختصاصی D2 دوپامین) چه به تنهایی ویادرترکیب باهم، قادربه ایجادتغییر درمیزان ترشح GTH-I، حداقل دراین مرحله ازسیکل جنسی نیستند. ۴- تزریق توام باکلوفن ودوفاکتورفوق (LRH-AوMet) نیز، چه به صورت دوتایی ویاترکیبی ازهرسه دارو، تاثیرچندانی برفعالیت ترشحی گنادوتروفهای GTH-I ندارد. ۵- باکلوفن تزریقی، احتمالاًبرای عمل مهاری خود برGTH-I، رسپتورهای مربوطه را درسطح سلولهای گنادوتروفی تحت تاثیرقرارمی‌دهد، وباتوجه به شواهدبه دست آمده اگراثرات مرکزی آن رابرنورون‌های GnRH و دوپامین، کاملاً رد ننماییم، حداقل می‌توان نتیجه گرفت که اثرمستقیم گابا، براثرات غیرمستقیم (مرکزی) آن غالب است.

تشکر وقدردانی

درپایان برخود لازم می‌دانیم از زحمات بیدریغ مسئولان وکارشناسان محترم معاونت تکثیروپرورش شیلات ومرکز تکثیروپرورش شهید انصاری رشت بویژه آقایان مهندس حاجی زاده ومهندس طلوعی سپاسگزاری نماییم.

References

1. Andreson, R. A., Mitchell R.(1986): Effects of GABA receptor agoniston the secretion of growth hormone,Luteinizing hormone,adrenocorticotipin hormone and thyroid hormone from the rat pituitary gland in vitro, JEndocrinol 1081-8.
2. Breton, B., Govoroun, M., Mikolajczyk, T.(1998): GTHII secretion profiles during the reproductive cycle in female rainbow trout:relationship with pituitary responsivess to GnRH. A Stimulation. Gen.Comp.Endocrinol.,III, 38-50.
3. Govoroun, m., Chb, j., and Breton B. (1998): Immunological cross - reativity betw een rainbow trout GTH-land GTH-II and thie a and B subunits: application to the development of specific radioimmuoassays. Gen.comp . Endocrinol ., 111,28-37.
4. Hoar, w. s., Randall, D. J. and Donalason, E. M. (1983): FIshphysiology(Academic press, London) vol. lx, partb, 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): Areinvestigation of theGn-Rh(gonado tropin- releasing hormone) systems in the goldfish brain using antibodies to salmon Gn- RH . ceII Tiss. Res., 244,327-337.
6. Kah o., Dubourg, P., Mltinolim. G., Gonnet, F. and Calas, A.(1987): Central GABAergic innervation of the pituitary of the goldfish: Aradioautograpraphic and immunochemical study at the electron microscope level.Gen.compo Endocrinc:!:67:324-337.
7. Kah, o., Trudeau, V. L., Sloley, B. D., Chang, J. P., DUbourg, P., YuK, L. and Peter, RE.(1992): lnfIuence of GABA on gonadotropin release in the golodfish. 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): lmplication of GABA in the euroendocri ne regulation of gonadotropin release in the golofish, *carassius auratus*, in:proceedings of the fourth international symposium on productive physiology of fish (AP. scott, J. Psumpter, D. E, Kime, and M. S,

Rolfe, eds.). Norwich, U. K. (1991): F'ish symp. Sheffield.

9. Mc Cann, S. M., Rettora, L. (1988): The role of GABA in the control of anterior pituitary hornone secretion,In: GABA and Benzodizepine Receptors, edited by R.F.Squires. Boca Raton, FI:CRC, VOI. 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., Bretrol, B., Sokolowska-mikolajczyk, M., Epler, P.(1994): The effects of bicuculline (a GADA - Areceptor antagonist) on LHRH-A and pimozide 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, 1., Epler, P., Milkolajczyk, T., Breton Bieniarz, k. and Ollevier, F. (1990): A presumptive role for GABA in the stimulatory effects of Des-Gly 10, [D-Ala6] LHRH-ethlamide and pimozide on the gonadotropin.releas incarp, life sciences,47,1801-1812.
14. Scott, C. J., Clark, 1. h. (1993): Llnhibition 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, 0., Trudesau, V. L, DUIKa. J. G., and Peter, R. E.(1992):Amino acid neurotransmitters and dopamine in brainand pituitary of the goidfish: involvementin theregulation of gonadotropinsecretion, J. Neurochem., 58,.2254-2252.
16. Sokolowska, M., Mpeter, R. E., 'Nahorniak, C. S., and Chang, J. p. (1985): 'Seasonaleffebts of pimozide and desly 10 [D.ala16]LH.RH etylamide on gonadotrophin secretion in gold fish, Gen comp.Endocrinol.
17. Sokolowska- mikolajczyk, m ., chyb, J., Mikolajczyk, T., Epler, P., Eicniarz k. Popek, W. (1997): GABAergie modulalionon 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 ofgonadotropin-ll releasein goldfish: involvement of GABA(A) receptors, dopamine,and sex stroids, 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 reseptors and activation of chloride and voltage -sensitive calcium channels, Endocrinology, 126, 2499-2505.
20. Weir, C., Breton, B., and Reinaud, P.(1975):l n" fish physiology" by Hoar w.s., Randall D. J., Donaldson E.M., 1983,(Academic press London),Vol.lx,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 luteinizinizzng hormone release and ovulation, Neuroendocrinology.52,354-360.