بررسی مقایسه‌ای اثرات ناشی از تزریق داخل صفاقی و داخل بطن مغزی پیکروتوکسین و بیکوکولین در تنظیم گلوکز پلاسمایی موش کوچک آزمایشگاهی

زهرا قیروانی*- دکتر محمد حسین پورغلامی**

*مربی رشته فیزیولوژی- دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

** عضو هیات علمی دانشگاه تربیت مدرس- دانشکده پزشکی- دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

چکیده

مقدمه: گاما آمینوبوتیریک اسید (GABA) یک نروترانسمیتر مهاری مهم درسیستم اعصاب مرکزی‌می‌باشد. گزارشهای متعددی وجود دارد که گابا از طریق افزایش سطح پلاسمایی انسولین و کاهش گلوکاگون و سوماتواستاتین باعث کاهش میزان گلوکز خون می‌شود.

هدف: این بررسی جهت مقایسه اثرات ناشی از تزریق داخل صفاقی و داخل بطن مغزی پیکروتوکسین و بیکوکولین در تنظیم گلوکز پلاسمایی موش کوچک آزمایشگاهی انجام گردید.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تجربی جهت بررسی نقش پیکروتوکسین (آنتاگونیست غیر رقابتی)وبیکوکولین (آنتاگونیست رقابتی)از موش کوچک آزمایشگاهی، نژاد آلبینو و جنس نر با وزن ۲۵-۲۰ گرم‌استفاده شد. برای اندازه‌گیری قند خون ،در فواصل زمانی معین، خونگیری از سینوس چشمی حیوان انجام‌شد. جهت اندازه‌گیری غلظت گلوکز خون از روش ارتوتولوئیدین ودستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. جهت‌تزریق داخل بطن مغزی (ICV) هر یک از این داروها در دوزهای مختلف، ۵ گروه حیوان که دوره بهبودی ۵روزه را سپری کرده بودند (n = ۸) انتخاب شد. ٤ گروه به ترتیب دوزهای ۱۰ و ۲۵ و ۵۰ و۱۰۰ نانوگرم درمیکرولیتر پیکروتوکسین و بیکوکولین بصورت جداگانه و گروه پنجم نرمال‌سالین را به صورت (ICV)دریافت کردند. خونگیری بلافاصله پس از تزریق دارو صورت گرفته و هر ۱۵ دقیقه تکرار شد و تا ۹۰ دقیقه‌ادامه داشت.در تزریق داخل صفاقی (IP) هر یک از آنتاگونیست‌ها ۵ گروه حیوان (n=۸)انتخاب گردید. ٤ گروه اول دوزهای ۱، ۲، ٤ و ٦ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن هر یک از این داروها و گروه پنجم نرمال‌سالین را به صورت (IP)دریافت کردند. خونگیری بلافاصله بعد از تزریق دارو صورت گرفت وتا ۹۰ دقیقه‌ادامه داشت.به منظور مقایسه نتایج از آنالیز واریانس یکطرفه (one-way) استفاده شد و بین نمونه‌های‌معنی‌دار T-test به عمل آمد.

نتایج: بررسی نتایج نشان داد که پیکروتوکسین و بیکوکولین به صورت وابسته به دوز و زمان چه‌بصورت تزریق داخل صفاقی (IP) و چه بصورت تزریق داخل بطن مغزی سبب افزایش قند خون‌گردید.(P<۰/۰۵) نکته دیگر اینست که افزایش قند خون تا زمان ٤۵ دقیقه در همه دوزها مشاهده می‌شودولی‌پس‌ازاین زمان قندخون تقریباً طبق‌الگوی یکسانی‌کاهش می‌یابدودر ۹۰دقیقه به حداقل‌مقدار خود می‌رسد.

نتیجه‌گیری: در مجموع می‌توان گفت که افزایش گلوکز علاوه بر ترشح انسولین باعث ترشح گابا از سلولهای β پانکراس می‌شود و از آنجائیکه گابا در حالت عادی اثر مهاری بر روی ترشح سوماتواستاتین و گلوکاگون‌دارد، بنابراین قند خون در این مرحله کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که گیرنده‌های گابا ـ A در تنظیم قند خون‌نقش مهاری دارند.در خاتمه باید اضافه نمود که اثر سیستم گاباارژیک در تنظیم قند خون امری پیچیده بوده وشناخت دقیق‌تر آن مستلزم تحقیقات بیشتری می‌باشد.

کلید واژه ها: بیکوکولین/ پیکروتوکسین/گلوکز

مقدمه

گاما آمینوبوتیریک اسید(GABA) یک میانجی عصبی مهاری در سیستم اعصاب مرکزی‌می‌باشد (۱تا۵). امروزه مشخص شده که گابای‌رها شده در سیناپس گابا ارژیک با مولکول‌های ویژه‌ای به

نام‌گیرنده متصل می‌شود (۷). در سالهای ۱۹۸۰ و ۱۹۸۱، Hill و Bowery مشخص کردند که گابا از طریق دوجایگاه فارماکولوژیکی مختلف و مجزا عمل می‌کند (۸و ۱٦). این گیرنده‌ها تحت عنوان گیرنده گابا- A (حساس‌به بیکوکولین) و گیرنده گابا- B (غیر حساس به بیکوکولین) نامگذاری شدند (۹ تا ۱۲).البته در تعدادی ازمقالات وجود نوع سوم گیرنده گابا به نام گیرنده گابا -C (غیر حساس به بیکوکولین و باکلوفن) گزارش شده‌است (۵، ۸و۹). همچنین گیرنده‌ای به نام گیرنده گابا - x (حساس به باکلوفن و غیر حساس به بیکوکولین) درتعداد معدودی از مقالات مطرح شده است(۸).

در مورد نقش گابا در تنظیم قند خون شواهدی مبنی بر ارتباط دو جانبه بین سیستم گاباارژیک و گلوکز خون‌وجود دارد. به عبارتی گفته می‌شود که غلظت گلوکز خون توسط سیستم گابا ارژیک تنظیم می شود. اولین بارokada و همکارش در سال۱۹٦۷ مشاهده کردند که این نروترانسمیتر آمینواسیدی در سلولهای آندوکرین جزایر لانگرهانس وجود دارد (۱۳و۱٤). پس از گذشت چند سال Vincent(1983) و Skaue(1978) با استفاده‌از تکنیک‌های ایمنوهیستوشیمی مشاهده کردند که گابا و آنزیم‌های وابسته (GABA-T, GAD) همراه باانسولین در تعدادی از سلولهای β واقع در مرکز جزیره قرار دارند(۱۳و۱۵). همچنین گزارش شده که افزایش‌گلوکز هم باعث آزاد شدن انسولین و هم افزایش آزاد شدن گابا می‌شود وهمچنین گابا ممکن است در تنظیم‌سنتزانسولین دخالت داشته باشد(۱۵).در همین رابطه، Taniyama وهمکارش‌در سال ۱۹۸۳ گزارش‌کردندکه گابا به همراه انسولین از سلولهای β آزادمی‌شود و باسایر سلولها از جمله سلولهای حاوی‌سوماتواستاتین‌تداخل‌عمل دارد(۱۵).

همچنین مشخص شده که گابا و موسیمول رهاشدن سوماتواستاتین را از سلولهای α_1 پانکراس مهار می‌کنندو این اثر که از طریق گیرنده‌های گابا-A صورت می‌گیرد، توسط بیکوکولین مهار می‌شود(۱۳، ۱٤و۱۵).ازطرفی وجود گیرنده‌های گابا - A بر روی سلولهای α_1 می‌تواند نشان دهنده دخالت گابا در ترشح‌سوماتواستاتین باشد (۱۵).همچنین شواهد نشان می‌دهد که چنانچه گابا همراه با انسولین از سلولهای β ترشح شود، می‌تواند عمل مهاری گلوکز را بر روی ترشح گلوکاگون از سلولهای α_2 واسطه‌گری کند. این‌عمل مهاری بدون شک توسط بازشدن کانال‌های کلرگیرنده‌های گابا- A واقع در سلولهای α_2 صورت‌می‌گیرد(۱٤). این اثر توسط دیازپام افزایش یافته و توسط بیکوکولین مهار می‌شود(۱٤، ۱۵).

بطور خلاصه، در مورد تنظیم اعمال آندوکرینی گابا در پانکراس می‌توان گفت که گابا آزاد شدن‌سوماتواستاتین، گلوکاگون و انسولین را تنظیم می‌کند(۱۳، ۱٤و۱۵).

به منظور مقایسه اثرات ناشی از تزریق داخل صفاقی و داخل بطن مغزی بیکوکولین و پیکروتوکسین در تنظیم‌گلوکز پلاسمایی موش کوچک آزمایشگاهی این تحقیق انجام گرفت.

مواد و روش ها

در آزمایشات از موش سفید آزمایشگاهی، نژاد آلبینو و جنس نر در محدوده وزنی (۲۵-۲۰) گرم استفاده شد.حیواناتدردرجه‌حرارت(C^0 ۲۲-۲۰) نگه داری شده و از نظر خوردن و آشامیدن بجز در مراحل انجام آزمایش محدودیتی نداشتند.

به منظور اندازه‌گیری قند خون در فواصل زمانی معین، خون‌گیری ازسینوس چشمی (Retro orbital sinus) انجام گرفت و پس از جداسازی سرم غلظت قند با روش ارتوتولوئیدین و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ٦٥٠ نانومتر اندازه گیری شد(٦). در هر سری ازآزمایشات اثر دوزهای مختلف داروها روی قند خون بررسی شده و میانگین تغییرات قند خون مربوط به هردوز در زمانهای معین بدست آمد.

در این تحقیق بیکوکولین و پیکروتوکسین به صورت جداگانه (آنتاگونیست‌های گیرنده گابا – A) در دوزهای (١٠٠ ،٥٠، ٢٥، ١٠ نانوگرم در میکرولیتر) به صورت داخل بطن مغزی (ICV)و دردوزهای (١،٢،٤،٦ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن) به صورت داخل صفاقی (IP)تزریق شد و نتایج حاصل‌از تزریق هردارو در گروه آزمایشی با نتایج حاصل از تزریق سالین در گروه کنترل مورد مقایسه‌قرارگرفت.داروهای این تحقیق از شرکت SIGMAتهیه شده و حلال آنها آب مقطر بوده است.همچنین جهت‌بیهوش کردن حیوان از پنتوباربیتال سدیم استفاده شد(١٧). در همه آزمایشات حجم ٢ میکرولیتر از دارو یا سالین تزریق شد. گروه بندی حیوانات بسته به نوع و روش تزریق و دوز داروها صورت گرفت ودر هر گروه تعداد حیوانات ٨ عدد بود.بلافاصله پس از تزریق داروها خونگیری از سینوس چشمی حیوان انجام شد. هر ١٥دقیقه یکبار تکرار شد و تا ٩٠ دقیقه ادامه یافت .

حیوان توسط پنتوباربیتال سدیم (داخل صفاقی، ٤٠mg/kg) بیهوش‌گردیده و داخل دستگاه استریوتاکس ثابت شد .پس از آشکار شدن نقطه برگما جهت جایگذاری کانول‌در بطن جانبی مغز از برگما به مختصات ٣mm پایین‌تر از سخت شامه، ١/٥mm به سمت راست نسبت به‌برگما، ٠/٥mm به عقب) نقطه‌ای را روی سطح جمجمه علامت زده و با استفاده از دریل دندانپزشکی به آرامی وبا دقت سوراخ گردید (٤). پس از انجام کانول گذاری و گذشت دوره بهبودی ٥ روزه تزریق دارو انجام گرفت.در اکثر نمونه‌ها پس از انجام آزمایشات جهت اطمینان از ورود صحیح کانول به داخل بطن جانبی مغز ماده‌رنگی (Pontaminesky blue) توسط سرنگ هامیلتون و لوله رابط به بطن جانبی تزریق شده و پس از خارج‌نمودن مغز آنرا به مدت ٥ روز داخل محلول فرمالین ١٠٪ قرار داده و با تهیه برش و مشاهده نفوذ ماده رنگی‌به درون ناحیه بطن جانبی از صحت مراحل آزمایش اطمینان حاصل شد.

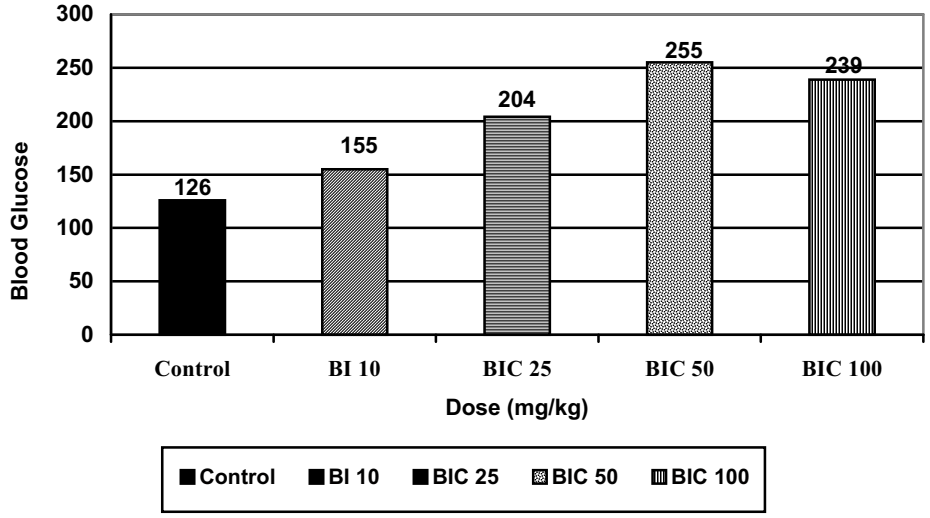
به منظور مقایسه نتایج از آنالیز واریانس یکطرفه (one way ANOVA) استفاده شدو بین نمونه‌های معنی‌دار T-test انجام گرفت. درتمام حالات ملاک معنی دار بودن ($P<٠/٠٥$) در نظرگرفته شد.

نتایج

در مرحله اول جهت پی بردن به اثرات محیطی پیکروتوکسین پنج گروه حیوان انتخاب گردید ($n=٨$). چهارگروه اول به ترتیب دوزهای ١، ٢، ٤ و ٦ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن پیکروتوکسین (IP) دریافت کردند و به گروه پنجم (گروه شاهد) نرمال سالین تزریق شد. خون گیری بلافاصله پس از تزریق دارو صورت گرفت‌و تا ٩٠ دقیقه ادامه یافت. پیکروتوکسین به صورت وابسته به دوز و زمان به ترتیب زیر سبب افزایش قند خون گردید:

با دوز١mg/kg قادر به افزایش قنـد خون پس از

۳۰دقیقه‌با(p<۰/۰۵) وپس از ٤٥ دقیقه با (p<۰/۰۱) می‌باشد.دوز۲mg/kgپیکروتوکسین‌نیزقادربه‌افزایش قندخون‌پس‌از۱۵دقیقه‌با(p<۰/۰۱)ودردقایق٤٥،۳۰، ٦۰،۷۵ و ۹۰با(p<۰/۰۰۱)می‌باشند.دوزهای٤mg/kg و ٦mg/kgقادربه‌افزایش‌قند خون در دقایق۱۵، ۳۰، ٤٥،٦۰، ۷۵ و ۹۰با(p<۰/۰۰۱)می‌باشند (نمودار ۱).



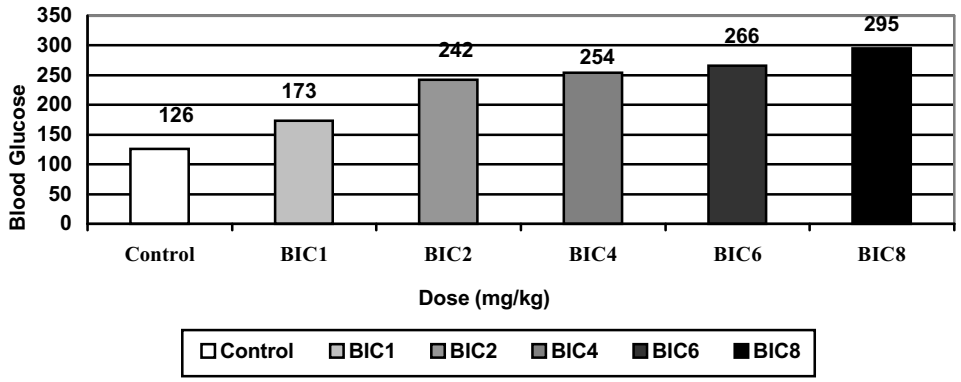
** P<۰/۰۱ *** P<۰/۰۰۱

نمودار۱: اثرپیکروتوکسین‌برروی غلظت قند خون‌در٤٥دقیقه‌پس از تزریق دارو:حیوانات در لحظه شروع آزمایش پیکروتوکسین (۱،۲،٤،٦mg/kg,IP) و یا سالین دریافت کرده‌اند. هر نقطه بیانـگر Mean±SEM قند خون در هر ۱۰۰cc خون در هشت حیوان است (n=۸).

در مرحله دوم جهت پی بردن به اثرات محیطی بیکوکولین‌شش گروه حیوان انتخاب گردید(n=۸). در پنج‌گروه به ترتیب دوزهای ۸، ٦، ٤، ۲، ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بیکوکولین(IP) تزریق شد و گروه ششم‌سالین را دریافت کردند. خون‌گیری بلافاصله پس از تزریق دارو شروع شد و تا ۹۰ دقیقه ادامه یافت.

بیکوکولین به صورت وابسته دوز و زمان به ترتیب زیر سبب افزایش قند خون گردید:

بادوز mg/kg ۱ قادر به افزایش قند خون در دقایق ۳۰ و ٤٥ با (p<۰/۰۰۱) می‌باشد. دوز ۲mg/kg بیکوکولین‌افزایش قند خون را در دقایق ۳۰، ٤٥ ، ٦۰،۷۵ و ۹۰ با (p<۰/۰۰۱) ایجاد می‌کند. دوزهای mg/kg ٤ و ٦mg/kg پس از۱۵ دقیقه با (p<۰/۰۱) و در دقایق ۳۰ ، ٤٥ ٦۰ ، ۷۵ و ۹۰ با (p<۰/۰۰۱) هیپرگلسیمی ایجاد می‌کند و دوزmg/kg ۸ در دقایق۱۵، ۳۰، ٤٥، ٦۰، ۷۵ و ۹۰ با (p<۰/۰۰۱) قادر به افزایش قند خون می‌باشد(نمودار۲).



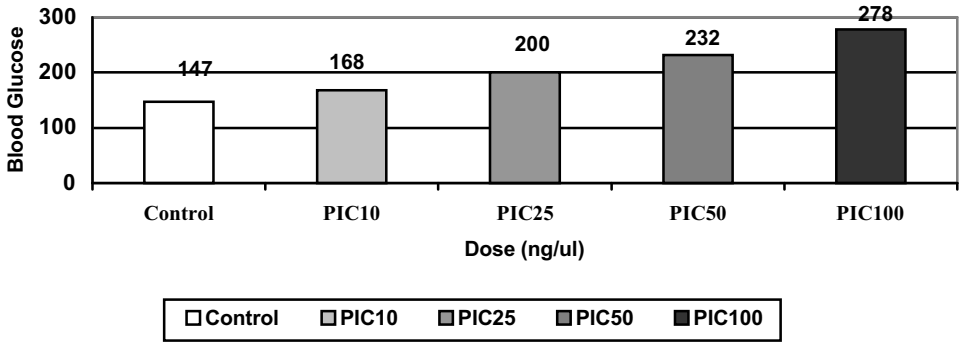
*** P<۰/۰۰۱

نمودار۲: اثر بیکوکولین بر روی غلظت قند خون در٤٥دقیقه پس از تزریق دارو: حیوانات در لحظه شروع آزمایش‌بیکوکولین (۱،۲،٤،٦،۸mg/kg,IP) و یا سالین دریافت کرده‌اند. هر نقطه بیانگر Mean±SEM قنـــد خـــون در هر ۱۰۰cc خون در هشت حیوان است(n=۸).

در مرحله سوم جهت پی بردن به اثرات مرکزی پیکرو توکسین پنج گروه حیوان که دوره بهبودی ۵روزه راسپری کرده بودند، انتخاب گردید(n=۸). در ٤ گروه به ترتیب دوزهای ۱۰ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم درمیکرولیترپیکروتوکسین و گروه پنجم سالین را به صورت داخل بطن مغزی(ICV) دریافت کردند. خون‌گیری بلافاصله پس از تزریق دارو صورت‌گرفت وهر ۱۵ دقیقه تکرار شد و تا ۹۰ دقیقه ادامه داشت.

پیکروتوکسین به صورت وابسته به دوز و زمان به ترتیب زیر سبب افزایش قند خون گردید:

در دوز ng/ul ۱۰ قادر به افزایش قند خون پس از ٤٥ دقیقه با (p<۰/۰۵) و پس از ۹۰ دقیقه با (۰/۰۱ >p) می‌باشد.در دوز ng/ul ۲۵ پس از ۱۵ دقیقه با (p<۰/۰۵) و پس از ۳۰ دقیقه با (p<۰/۰۱) و در دقایق ٤٥ و ٦۰ با (p<۰/۰۰۱) منجر به افزایش قند خون می‌شود. در دوزng/ul ۵۰ افزایش معنی‌داری در قند خون در دقایق ۳۰، ٤٥ و ٦۰ با (p<۰/۰۰۱) ایجاد می‌شود. پس از تزریق دارو در دوز ng/ul ۱۰۰ افزایش معنی داری در قند خون دردقایق ۱۵، ۳۰، ٤٥، ٦۰ و ۷۵ با (p<۰/۰۰۱) دیده می‌شود(نمودار ۳).

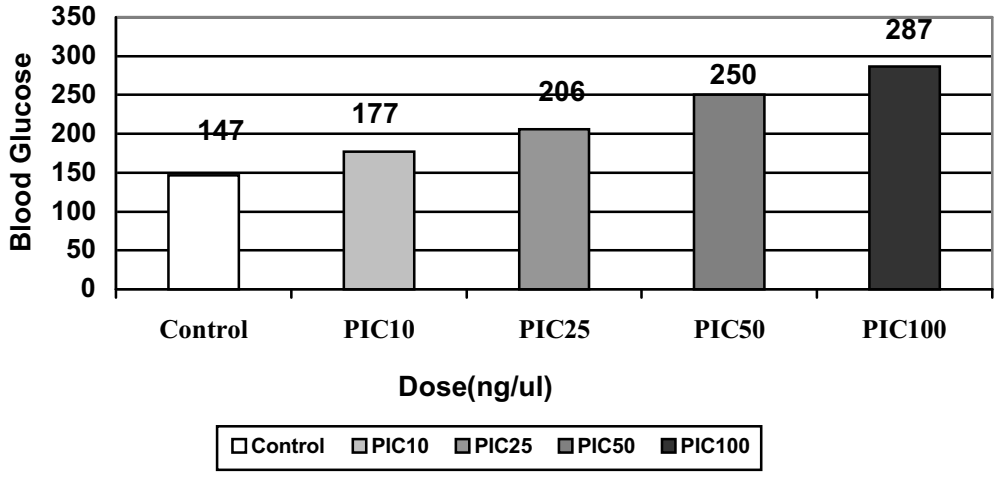


** P<۰/۰۱ *** P<۰/۰۰۱

نمودار۳:اثر پیکروتوکسین برروی غلظت قند خون در ٤٥ دقیقه پس ازتزریق دارو: حیوانات در لحظه شروع آزمایش پیکروتوکسین(۱۰۰ng/ul,ICV، ۵۰، ۲۵، ۱۰) و یاسالین دریافت کرده‌اند هر نقطه بیانگر Mean±SEM قندخون درهر۱۰۰cc خون در هشت‌حیوان است. (n=۸)

در مرحله چهارم جهت پی بردن به اثرات مرکزی بیکوکولین پنج گروه حیوان انتخاب شد. این حیوانات دوره بهبودی ۵ روزه را سپری کرده بودند (n=۸). در ٤ گروه به ترتیب بیکوکولین در دوزهای ۱۰ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰نانوگرم در میکرولیترو گروه پنجم سالین را به صورت داخل بطن مغزی (ICV) دریافت کردند. خون‌گیری بلافاصله پس از تزریق دارو صورت گرفت و هر ۱۵ دقیقه تکرار شد و تا ۹۰ دقیقه ادامه داشت.

بیکوکولین به صورت وابسته به دوز و زمان به ترتیب زیر سبب افزایش قند خون گردید:
دوز ۱۰ng/ul در دقایق۱۵، ٤۵، ۷۵ با(p<۰/۰۵) و در ٦۰ دقیقه با (p<۰/۰۰۱) سبب افزایش قند خون شد. دوز۲۵ng/ul منجر به افزایش قند خون دردقایق۷۵،٦۰،٤۵،۳۰ و ۹۰ با (p<۰/۰۰۱) گردید. دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر افزایش معنی‌داری در قند خون در دقایق ۱۵، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۷۵ و ۹۰ با (p<۰/۰۰۱) ایجادکرد(نمودار ٤).



*** P<۰/۰۵ *** P<۰/۰۰۱**

نمودار ٤: اثربیکوکولین بر روی غلظت قندخون در٤۵ دقیقه پس‌از تزریق‌دارو: حیوانات در لحظه شروع آزمایش بیکوکولین (ICV ng/ul,۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰) و یاسالین دریافت کرده‌اند.هرنقطه‌بیانگر Mean±SEM قند خون در هر ۱۰۰cc خون درهشت حیوان‌است.(n=۸)

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق در مرحله اول، پیکروتوکسین به صورت وابسته به دوز یک افزایش معنی‌دار (p<۰/۰۵) در قندخون موشهای گروه آزمایشی در مقایسه با موشهای گروه کنترل ایجاد کرده است (نمودار۱). پیکروتوکسین‌با دوز۱mg/kg فقط قادر به افزایش قند خون پس از ۳۰ دقیقه با (p<۰/۰۵) و پس از ٤۵ دقیقه با (p<۰/۰۱) می‌باشد و این نشان می‌دهد که احتمالا در این دوز پیکروتوکسین نتوانسته به طور کامل گیرنده گابا-A رابلوک کند ولی با افزایش دوز به میزان۲، ٤، ٦ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم، اختلاف معنی‌داری در قند خون(p<۰/۰۰۱) در همه دوزها از زمان ۱۵ دقیقه به بعد مشاهده می‌شود که این زمان ممکن است برای فعال شدن‌مکانیسم‌های تنظیمی لازم باشد. نکته دیگر این است که افزایش قند خون تا زمان ٤۵ دقیقه در همه دوزهامشاهده می‌شود ولی پس از این زمان قند خون تقریباً طبق الگوی یکسانی کاهش می‌یابد و در ۹۰ دقیقه به‌حداقل به

مقدار خود می‌رسد. احتمالا علت افزایش قند خون تا زمان ٤٥ دقیقه این است که پیکروتوکسین‌بانشستن بر روی جایگاه خودش در روی گیرنده گابا – A، آن را بلوک کرده و لذا اثر مهاری گابا بر روی ترشح‌هورمون‌های سوماتواستاتین و گلوکاگون برداشته می‌شود و به دنبال آن قند خون افزایش می‌یابد (١٤و١٥) .علت کاهش قند خون از زمان ٤٥ دقیقه تا ٩٠ دقیقه را می‌توان به این ترتیب توجیه نمود که بدنبال افزایش قندخون ترشح انسولین از سلولهای β پانکراس افزایش یافته و بدنبال آن میزان گلوکز خون کاهش می‌یابد.همچنین مطابق گزارشات محققین روشن شده که افزایش گلوکز علاوه بر ترشح انسولین، منجر به ترشح گاباز سلولهای β پانکراس می‌شود(١٥) و از آنجایی که گابا در حالت عادی اثر مهاری بر روی ترشح سوماتواستاتین و گلوکاگون دارد(١٣، ١٤و١٥) راین قند خون در این مرحله کاهش می‌یابد. نتایج آزمایشات‌محققین تائید کننده نتایج آزمایشات فوق می‌باشد.

بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که آنتاگونیست گابا (Ro5-3663) که احتمالا در جایگاه پیکروتوکسینین (Picrotoxinine) واقع در گیرنده گابا – A عمل می‌کند در دوز (mg/kg,IP ١٠–٥) باعث افزایش قند خون موش‌سوری می‌شود(١٨).

در مرحله دوم بیکوکولین به صورت وابسته به دوز، افزایش معنی‌داری ($p<٠/٠٥$) در قند خون موشهای‌گروه آزمایشی در مقایسه با موشهای گروه کنترل ایجاد کرده است (نمودار ٢). بیکوکولین با دوز ١mg/kg قادر به افزایش قند خون در دقایق ٣٠ و ٤٥ با ($p<٠/٠٠١$) می‌باشد در حالیکه با افزایش دوز (mg/kg ٦، ٤، ٢) اختلافات معنی داری ($p<٠/٠٠١$) قند خون از ١٥ دقیقه به بعد مشاهده می‌شود که این ١٥ دقیقه احتمالا صرف‌فعال شدن مکانیسم‌های تنظیمی می‌شود. در این نمودار هم مشابه نمودار اثر پیکروتوکسین تا زمان ٤٥ دقیقه‌قند خون در همه دوزها افزایش می‌یابد ولی پس از گذشت این زمان طبق الگوی خاصی کاهش می‌یابد و در ٩٠ دقیقه به حداقل مقدار خودش می‌رسد. از آنجایی که بیکوکولین آنتاگونیست رقابتی است، برای نشستن برروی گیرنده گابا – A باآن رقابت می‌کند و ضمن اشغال گیرنده آنرا بلوک می‌کند. بنابراین اثر مهاری گابا برروی ترشح سوماتواستاتین و گلوکاگون حذف می‌شود و قند خون افزایش می‌یابد. در مرحله دوم (از ٤٥ دقیقه‌تا ٩٠ دقیقه) بدلیل افزایش قند خون ترشح انسولین زیاد شده و لذا قند خون کاهش می‌یابد. نتایج این تحقیق،توسط گزارشات قبلی تایید می‌شود به این صورت که شواهد نشان می‌دهد چنانچه گابا همراه با انسولین ازسلولهای β ترشح شود، می‌تواند عمل مهاری گلوکز را بر روی ترشح گلوکاگون از سلولهای α_2 واسطه‌گری‌کند و تاکید شده که این عمل مهاری بدون شک توسط باز شدن کانال‌های کلر گیرنده‌های گابا – A واقع درسلولهای α_2صورت می‌گیرد و این اثر توسط بیکوکولین مهار می‌شود (١٤و١٥) علاوه بر این گزارش شده که‌گابا رهاشدن گلوکاگون تحریک شده توسط آرژینین را (به میزان ٧٠٪) کاهش می‌دهد و دیده شده که این اثرگابا توسط اضافه کردن ١٠٠ میکرو مول بیکوکولین مهار می‌شود. همچنین گزارش شده که اضافه کردن ١٠٠میکرومول بیکوکولین باعث افزایش معنی‌داری ($p<٠/٠٥$) در ترشح سوماتواستاتین می‌شود(١٩).در تعدادی‌از مقالات

مطرح می‌شود که گابا ممکن است در تنظیم سنتز انسولین دخالت داشته باشد. از طرفی گزارش شده‌که افزایش گلوکز هم باعث افزایش آزاد شدن انسولین و هم افزایش آزاد شدن گابا می‌شود(۱۵).
در مرحله سوم پیکروتوکسین به صورت وابسته به دوز یک افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۵) را در قند خون‌موشهای گروه آزمایشی در مقایسه با موشهای گروه کنترل ایجاد کرده است(نمودار ۳). پیکروتوکسین بادوز ۱۰ng/ul فقط قادر به افزایش قند خون پس از ٤٥ دقیقه با (p<۰/۰۵) و پس از ۹۰ دقیقه با (p<۰/۰۱)می‌باشد و این بیانگر آن است که در این دوز احتمالا پیکروتوکسین به طور کامل نتوانسته گیرنده گابا- A رابلوک کند ولی با افزایش دوز به میزان ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر اختلاف معنی‌داری با (p<۰/۰۵) در همه دوزها از زمان ۱۵ دقیقه تا ٦۰ دقیقه مشاهده می‌شود و این ۱۵ دقیقه ممکن است برای فعال شدن‌مکانیسم‌های تنظیمی لازم باشد. نکته قابل ذکر این است که در همه دوزها یک افزایش قند خون تا زمان ٤٥ دقیقه مشاهده می‌شود ولی پس از این زمان قند خون تقریباً طبق الگوی خاصی کاهش می‌یابد و در ۹۰ دقیقه به‌حداقل مقدار خود می‌رسد. احتمالا علت افزایش قند خون تا زمان ٤٥ دقیقه این است که پیکروتوکسین بانشستن بر روی جایگاه خودش در گیرنده گابا- A این گیرنده را بلوک کرده و لذا اثر مهاری گابا بر روی‌ترشح هورمونهای سوماتواستاتین و گلوکاگون برداشته می‌شود و بدنبال آن قند خون افزایش‌می‌یابد (١٤و١٥). علت کاهش قند خون از زمان ٤٥ دقیقه تا ۹۰ دقیقه را می‌توان بادلایل ذکر شده قبلی‌توجیه‌نمود. همچنین به نظر می‌رسد که در حالت عادی فاکتورهای مختلفی از سیستم عصبی مرکزی بر روی‌آزاد شدن انسولین و گلوکاگون مؤثر است. از طرفی مطالعات نروآناتومیکی و فیزیولوژیکی نشان می‌دهند تحریک هسته آمبیگوس که یکی از منابع موتونورون‌های واگ در ساقه مغز است و پانکراس را عصب دهی‌می‌کند، باعث افزایش آزاد شدن انسولین می‌شود (۲۰). همچنین مشخص شده که گابا یکی ازنروترانسمیترهای نورون‌های ورودی به این هسته می‌باشد که در ارتباط با ترشح انسولین نقش دارد (۲۰).بنابراین می‌توان گفت که احتمالا با مهار گیرنده گابا- A، آزاد شدن انسولین توسط فاکتورهای مختلفی در CNS ممانعت شود و بدنبال کاهش انسولین، قند خون افزایش یابد. از زمان ٤٥ دقیقه به بعد ممکن است این اثرمهاری به دلایل مختلفی (از جمله متابولیزه شدن دارو و کوتاه بودن نیمه عمر دارو...) از روی گیرنده برداشته‌شود. یا اینکه ممکن است افزایش قند خون مستقیماً منجر به افزایش آزاد شدن انسولین شود و بنابراین قندخون کاهش می‌یابد.
در مرحله چهارم بیکوکولین به صورت وابسته به دوز افزایش معنی‌داری (p<۰/۰۵) را در قند خون موشهای‌گروه آزمایشی و مقایسه با موشهای گروه کنترل ایجاد کرده است(نمودار٤). بیکوکولین با دوز ۱۰ ng/ul دردقایق ۱۵، ٤٥، ۷۵ با (p<۰/۰۵) و پس از ٦۰ دقیقه با (p<۰/۰۰۱) قادر به افزایش قند خون شد. با افزایش دوز به‌میزان ۲۵ ng/ul، در دقایق۳۰، ٤٥، ٦۰، ۷۵، ۹۰ با (p<۰/۰۰۱) افزایش قند خون ایجاد شد. در دوزهای (ng/ ul ۵۰، ۱۰۰) بیکوکولین در دقایق۱۵، ٤٥، ۳۰، ٦۰، ۷۵ با (p<۰/۰۰۱) قادر به افزایش قند خون شد. همچنین‌افزایش قند خون در همه دوزها (به استثنای ۱۰۰ng/ul) تا ٦۰ دقیقه ادامه دارد و پس از آن تا ۹۰ دقیقه کاهشی درمیزان قند خون ایجاد می‌شود. به نظر می‌رسد که در مرحله اول

بیکوکولین با قرار گرفتن بر روی گیرنده گابا-A آنرا مهار کرده و مانع اثر مهاری گابا بر روی قند خون شود و لذا قند خون افزایش یابد و بعد از گذشت مدت‌زمان (حدود۶۰ دقیقه) افزایش ترشح انسولین در اثر افزایش گلوکز منجر به کاهش قند خون در مرحله دوم‌شده . و لذا در ۹۰ دقیقه قند خون به کمترین میزان خودش می‌رسد.

همچنین گزارش شده که چنانچه تزریق‌بیکوکولین به داخل هسته آمبیگوس صورت گیرد باعث آزاد شدن‌انسولین به مقدار زیاد می‌شود. این نتایج تایید می‌کنند که نورون‌های هسته آمبیگوس که قادرند مقادیرانسولین پلاسمایی را تنظیم کنند، تحت تاثیر مهار گابا می‌باشند و مشخص شده که این اثر مختص نورون‌های‌هسته آمبیگوس است زیرا تزریق بیکوکولین به سایر هسته‌های ساقه مغز منجر به افزایش مقادیر انسولین‌پلاسمایی نمی‌شود(۲۰). با این وجود نقش فیزیولوژیکی گابا برروی نورون‌هایی که سلول‌های β پانکراس راعصب دهی می‌کنند هنوز روشن نشده است. به عبارت دیگر علت اینکه چرا به دنبال تزریق بیکوکولین دراین‌هسته، مقادیر زیادی انسولین از پانکراس آزادمی‌شودهنوزمشخص‌نشده‌است (۲۰).

در مجموع می‌توان گفت که گیرنده گابا - A احتمالا از طریق افزایش سطح پلاسمایی انسولین و کاهش‌گلوکاگون و سوماتواستاتین باعث کاهش میزان قند خون می‌شود. همچنین به نظر می‌رسد که گیرنده‌های‌گابا- A در تنظیم قند خون نقش مهاری دارند. در خاتمه باید اضافه نمود که اثر سیستم‌گاباارژیک برروی‌تنظیم‌قندخون پیچیده بوده وشناخت‌دقیقترآن‌مستلزم تحقیقات بیشتری‌می‌باشد

منابع

1.Baraldi M, Gradison L, Guidotti A, Distribution and Metabolism of Muscimol in the Brain and other Tissues of the Rat. J Neurochem 1979: 18: 57-62.

2.Bereiter DA, Berthoud HR, Becker MJA. Brainstem Infusion of the G-Aminobutyric Acid Antagonist Bicuculline Increases Plasma Insulin Levels in the Rat. Endocrinol 1982: 111: 324-328.

3.Bowery NG, GABA B. Receptors and their Significance in Mammalian Pharmacology. Tips 1989: 10: 401-407.

4.Chen R, Robinson SE. The Effect of Cholinergic Manipulations on the Analgesic Response to Carbotoxin in Mice. Life Sci 1990: 47: 1947-1954.

5.Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Jihnston AR. GABA, Bicuculline and Central Inhibition. Nature 1970: 226: 1222-1224.

6.Dobo WASKI EM. An O-toluidine Method for Body Floid Glucose Determination. Clin Chem 1982: 8: 215-220.

7.Enna SJ, Maggi A. Biochemical Pharmacology of GABA Ergic Agonists. Life Sci 1979: 24: 1727-1738.

8.Enna SJ, Snyder SH. Properties of γ-Aminobutyric Acid GABA Receptor Binding in Rat Brain Synaptic Membrane Fractions. Brain Research 1975: 10: 81-97.

9.Erdo SL, Wolf JR. γ-Aminobutyric Acid Outside the Mammalian Brain. J Neurochem 1990: 54: 363-372.

10.Ferreira MBC, Medina JH, Izquierdo I. Late Posttraining Memory Processing by Entorhinal Cortex: Involvement of NMDA and GABAergic Receptors, Pharmac. Biochem Ehav 1992:41: 767-771.

11.Hylden JLK, Wilcox GL. Pharmacology Charactrization of Substance P-induced Nociception in Mice:Modulation by Opioid and Noradrenergic Agonists at the Spinal Level. J Pharmac Exp Ther 1983: 226: 398-404.

12.Matsumoto RR. GABA Receptors: Are Cellular Differences Reflected in functionl?. Brain Rese 1989: 14: 203-225.

13.Niigina A. Neural Mechanisms in the Control of Blood Glucose Concentration. Nature 1989: 119: 833-840.

14.Ong J, Kerr DIB. GABA Receptors in Peripheral Tissues. Life SCI 1990: 46: 1489-1501.

15.Paredes RG, Anders A. GABA and Behavior: The Role of Receptor Subtypes. Neuro SCI BIO Behav REV 1992: 16: 145-170.

16.Patton HD, Fuchs AF, Hille B, Scher AM, teiner R. Text book of Physiology. 21 st ed. Philadelphia: WB Saunders, 1989: 81-97.

17.Reyanolds JEF. The Extra Pharmacopeia. 29th ed. London: The pharmaceutical press, 1996: 81-97.

18.Rorsman P, Berggren PO, Bokuist K. Glucose-Inhibition of Glucagon Secretion Involves Activation of GABAA - Receptor Chloride Channels. Nature 1989: 341: 233-236.

19.Sieghart W. Multiplicity of GABAA - Benzodiazepine Receptors. Tips 1989:10: 407-410.

20. Webester RA, Jordan CC. Neurotransmitters, Drugs and Disease. 1 st ed. London: Blackwell, 1989:235-245.

A Comparative Study of The Effects of Intraperitoneal and Intracerebellar Ventricle Injection of Picrotoxin and Biccuculine on Regulation of Blood Glucose Concentration in Mice

Ghirvani Z , Poor gholami H.

Abstract

Introduction: GABA is a inhibitory neurotransmitter in CNS that plays an important role in the regulation of blood glucose. There have been reports that GABA-A receptors might cause a reduction in the concentration of blood glucose by increasing the insulin plasma and decreasing the glucagon and somatostatine.

Objective: This study was carried out to compare the effects of interaperitoneal and intracerebellar ventricle injection of Picrotoxin and Biccuculine on regulation of blood glucose concentration in mice.

Materials and methods: In this experimental study, male albino mice weighing 20-30 grams were used. Serial blood collection from each animal was done by retro- orbital sinus puncture, and glucose concentration was measured using O-toluidin. In this experiment, the effect of different doses (IP and ICV) injection of Picrotoxin and Biccuculine on blood glucose was studied. One-way variance analysis and t-test were adopted in statistical analysis of the collected data.

Results: The results indicated that IP and ICV injection of Picrotoxin and Biccuculine induce significant increase of blood glucose concentration in two groups ($p<0.05$). Another point is that increased blood glucose concentration is observed until 45-th mintue in all doses but after this time, blood glucose almost according to similar pattern is reduced and in 90 minutes, it will reach its minimal level.

Conclusion: Therefore, it seems that GABA- A receptors have an inhibiting role in regulation of blood glucose. Further research seems inevitable since the effects of GABA-A receptors on blood glucose concentration is a complex phenomenon.

Key words: Bicucullin/ Glucose/ Picrotoxin