

FFI RAPPORT

KARTLEGGING AV INTERAKSJONER MELLOM KOLINERG OG GLUTAMATERG NEVROTRANSMISJON I HIPPOKAMPUS VED ORGANOFOSFATFORGIFTNING

BORGE Bengt Åge Sørby

FFI/RAPPORT-2003/02395

FFIBM/812/137

Godkjent
Kjeller 20. juni 2003

Bjørn A Johnsen
Forskningsjef

**KARTLEGGING AV INTERAKSJONER MELLOM
KOLINERG OG GLUTAMATERG
NEVROTRANSMISJON I HIPPOKAMPUS VED
ORGANOFOSFATFORGIFTNING**

BORGE Bengt Åge Sørby

FFI/RAPPORT-2003/02395

FORSVARETS FORSKNINGSINSTITUTT
Norwegian Defence Research Establishment
Postboks 25, 2027 Kjeller, Norge

P O BOX 25
 NO-2027 KJELLER, NORWAY
REPORT DOCUMENTATION PAGE

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

1) PUBL/REPORT NUMBER FFI/RAPPORT-2003/02395	2) SECURITY CLASSIFICATION UNCLASSIFIED	3) NUMBER OF PAGES 99
1a) PROJECT REFERENCE FFIBM/812/137	2a) DECLASSIFICATION/DOWNGRADING SCHEDULE -	
4) TITLE KARTLEGGING AV INTERAKSJONER MELLOM KOLINERG OG GLUTAMATERG NEVROTRANSMISJON I HIPPOKAMPUS VED ORGANOFOSFATFORGIFTNING INTERACTIONS BETWEEN CHOLINERGIC AND GLUTAMATERGIC NEUROTRANSMISSION IN THE HIPPOCAMPUS FOLLOWING ORGANOPHOSPHATE POISONING		
5) NAMES OF AUTHOR(S) IN FULL (surname first) BORGE Bengt Åge Sørby		
6) DISTRIBUTION STATEMENT Approved for public release. Distribution unlimited. (Offentlig tilgjengelig)		
7) INDEXING TERMS IN ENGLISH: IN NORWEGIAN:		
a) <u>Organophosphate</u>	a) <u>Organofosfat</u>	
b) <u>Soman</u>	b) <u>Soman</u>	
c) <u>Brain</u>	c) <u>Hjerne</u>	
d) <u>Hippocampus</u>	d) <u>Hippokampus</u>	
e) <u>Neurotransmitters</u>	e) <u>Nevrotransmittere</u>	
THESAURUS REFERENCE:		
8) ABSTRACT The effects of soman on the release of endogenous acetylcholine and excitatory- and inhibitory amino acids from hippocampus have been studied in vitro in slices of the hippocampus from the guinea-pig, and in vivo in the albino rat following intra-hippocampal injections. Furthermore, alterations in the hippocampal EEG and animal behaviour have also been studied in rats after intra-hippocampal soman administration. In vitro perfusion of hippocampal slices with a soman-containing buffer does not provide clear results regarding the neurochemical alterations in neurotransmitter release in the central nervous system during soman intoxication. In vivo microinjection of soman in the hippocampus results in inhibition of the acetylcholinesterase activity and thereby an increase in the levels of acetylcholine in specific regions of the hippocampus. Secondary alterations in the release of glutamate, aspartate, GABA and other amino acid neurotransmitters in the CNS was not observed. In vivo microdialysis and microinjection of organophosphates like soman directly into the brain may be useful in further studies of neurochemical alterations following cholinesterase poisoning.		
9) DATE 20. June 2003	AUTHORIZED BY This page only Bjørn A Johnsen	POSITION Director of Research

ISBN-82-464-0729-5

UNCLASSIFIED

SECURITY CLASSIFICATION OF THIS PAGE
 (when data entered)

Forord

Denne hovedfagsoppgaven ble gjennomført ved Forsvarets forskningsinstitutt, Avdeling for beskyttelse og materiell, Kjeller, i perioden februar 2001 til november 2002, og er et ledd i cand.scient graden ved Fysiologisk institutt, Universitetet i Bergen.

Jeg vil først og fremst rette en stor takke til min dyktige veileder, professor Pål Aas, for fremragende veiledning og god støtte på alle måter gjennom hovedfaget. Han har alltid tatt seg tid til å hjelpe meg med faglig ekspertise, gode råd og stor tålmodighet.

Videre vil jeg takke senioringeniør Rita Tansø for uvurderelig hjelp og grundig opplæring i det praktiske laboratoriearbeidet, og med statistisk behandling av data. Jeg vil også takke Cand. Scient. Eirik Thorsnes for tålmodig brukerstøtte i LaTeX, forsker Trond Myhre for praktisk hjelp med operasjons prosedyre og gode råd, forsker Bjørnar Hassel for opplæring i bruk av HPLC, og pappa for økonomisk støtte gjennom hele studietiden.

Ellers vil jeg takke hovedfagsstudentene både ved Forsvarets forskningsinstitutt og fysiologisk institutt i Bergen, og selvsagt hele hybelhus gjengen, for å ha bidratt til et trivelig miljø rundt studiene.

Til slutt vil jeg takke min fantastiske kjæreste i Bergen, Tine Karlsen, for stor tålmodighet og støtte, og for å gjøre verden min til en fryd å leve i.

Kjeller, november 2002

Bengt Åge Sørby Borge

Innhold

Forord	ii
Sammendrag	vi
Sammendrag	vi
Forkortelser	ix
1 Innledning	1
1.1 Organofosfater	1
1.1.1 Biologisk mekanisme ved organofosfatforgiftning	2
1.1.2 Nervegasser	3
1.2 Medisinsk behandling og profylakse	3
1.3 Nervesystemet	4
1.3.1 Acetylcholin	5
1.3.2 Glutamat	6
1.3.3 GABA	9
1.3.4 Effekten av nervegass i CNS	10
1.4 Hippokampus	12
1.4.1 Generell struktur	12
1.4.2 Afferent innervering av hippokampus	13
1.4.3 Nevrotransmittere og reseptorer i hippokampus	15
1.4.4 EEG og Theta-rytme i hippokampus	15
1.5 Målsetting med oppgaven	17
2 Materiale og metoder	18
2.1 Forsøksdyr	18
2.2 Kjemikalier	18
2.3 Bufferløsninger	19
2.4 <i>In vitro</i> perfusjons forsøk	20
2.4.1 ³ H-glutamatfrisetting fra marsvin hippokampusskiver	21

2.4.2	Endogen ACh-frisetting fra marsvin hippokampusskiver	24
2.4.3	Effekten av soman på endogen aminosyrefrisetting	25
2.5	<i>In vivo</i> mikroinjeksjon av soman i rottehippokampus	26
2.6	ACh-analyse	30
2.7	Aminosyre analyse	31
2.8	Måling av AChE- og BuChE-aktivitet	33
2.9	Histokjemisk farging av hjerneskiver	34
2.10	Proteinbestemmelse	36
2.11	Statistikk	37
3	Resultater	38
3.1	<i>In vitro</i> frisetting av ³ H-glutamat fra marsvin hippokampusskiver	38
3.1.1	³ H-glutamatfrisetting ved kjemisk stimulering	38
3.1.2	³ H-glutamatfrisetting ved elektrisk stimulering og effekt av soman	39
3.1.3	Ca ²⁺ -avhengig frisetting av ³ H-glutamat	41
3.2	Endogen ACh-frisetting fra marsvin hippokampus skiver	42
3.3	Effekt av soman på endogen aminosyrefrisetting	42
3.3.1	Stimulering i fraksjon A, B og C	43
3.3.2	Stimulering kun i fraksjon A	50
3.4	AChE- og BuChE-aktivitet	55
3.5	Histokjemisk farging av marsvin hippokampus	56
3.6	<i>In vivo</i> mikroinjeksjon av soman i hippokampus hos rotte	57
3.6.1	Adferdsregistrering og EEG	58
3.6.2	Thetafrekvens	59
3.6.3	Theta og LIA-amplitude	60
3.6.4	Histokjemisk farging av rottehjerne	63
3.6.5	AChE- og BuChE-aktivitet	65
3.6.6	<i>In vitro</i> frisetting av endogen ACh	65
3.6.7	<i>In vitro</i> frisetting av endogene aminosyrer	66
3.6.8	Totalt aminosyreinnhold i hippokampus	69
4	Diskusjon	73
4.1	Metode diskusjon	73
4.2	Resultat diskusjon	76
4.2.1	Ca ²⁺ -avhengig frisetting	76
4.2.2	<i>In vitro</i> soman perfusjon av hippokampusskiver	77
4.2.3	Effekten av <i>in vivo</i> mikroinjeksjon av soman på hippokampal EEG og thetaaktiviteten	81
4.2.4	Effekten av <i>in vivo</i> mikroinjeksjon av soman på <i>in vitro</i> frisetting av ACH og endogene aminosyrer	83

INNHOLD

v

4.2.5	Konklusjon	85
4.3	Videre arbeid	86

Sammendrag

Organofosfater er en gruppe forbindelser som bl.a. benyttes i landbruket som pesticider, og av enkelte land til militære formål som nervegasser. Eksponering til organofosfater hemmer acetylkolinesteraseenzymet. Dette fører til en økt aktivering i alle kolinege synapser. Eksponering til høye konsentrasjoner kan føre til utvikling av nevrotoksiske skader i hjernen. Antakelig er økt frisetting av neurotransmitteren glutamat, som en følge av kolinerg aktivering av glutamaterge nevroner, en viktig forårsaker til de eksitotoksiske skadene som er observert etter nervegassforgiftning. I denne oppgaven har jeg studert *in vitro* frisetting av ^3H -glutamat og endogene aminosyrer fra hippokampusskiver etter soman eksponering både *in vitro* og *in vivo*. Resultatene ble sammenliknet med *in vivo* studier av nevrokjemiske forandringer etter systemisk administrasjon av soman utført av andre grupper, for å fastslå om *in vitro* metoder kan benyttes som et modellsystem for å studere interaksjonene mellom kolinerge og glutamaterge nevroner i hippokampus ved organofosfat-forgiftning. I tillegg ble effekten på adferd og hippokampal EEG studert etter *in vivo* mikroinjeksjon av soman direkte i hippokampus studert.

Følgende resultater og funn er gjort under gjennomføring av denne oppgaven:

- Jeg etablerte en *in vitro* metode for å studere effekten av organofosfater på interaksjoner mellom det kolinerge nervesystemet og nerveceller som benytter eksitatoriske aminosyrer i skiver av hippokampus fra marsvin. Resultatene fra dette arbeidet viser at denne metoden ikke er en god modell for slike eksperimentelle studier.
- Det ble i oppgaven klart vist at både KCl og elektrisk felt stimulering frisetter ^3H -glutamat og at denne frisettingen er avhengig av Ca^{2+} -ioner. Frisettingen kunne ikke hemmes fullstendig ved å fjerne Ca^{2+} -ioner i buffer, noe som tyder på at en del av frisettingen av ^3H -glutamat antakelig er uspesifikk fra ikke-nevronale lager.

- Soman endrer ikke frisettingen av verken ^3H -glutamat eller endogene aminosyrer. Årsaken til dette er ukjent og overraskende på bakgrunn av den kolinerge innveringen av glutamaterge nevroner i hippokampus. Det er dog gjort funn som tyder på at soman gir enkelte signifikante endringer i frisettingen av endogene aminosyrer, men det er ikke avdekket et klart bilde av hvilke vesentlige endringer i frisettingen av aminosyrer som skjer under varierende grad av stimulering.
- Elektrisk stimulering fører i motsetning til kjemisk stimulering med KCl, *ikke* til frisetting av endogene aminosyrer fra marsvin hippokampusskiver ved stimuleringsfrekvenser opptil 20 Hz.
- Preinkubering av hippokampusskiver i buffer med soman førte til frekvens avhengig ACh-frisetting ved *in vitro* elektrisk stimulering i samme frekvensområde som ble benyttet til å studere frisetting av ^3H -glutamat ved soman perfusjon.
- Jeg utviklet en *in vivo* metode for mikroinjeksjon av soman i hippokampus hvor både vevsdistribusjonen av soman (AChE-inhibisjon) og graden av endringer i neurotransmitter frisetting kunne måles. Dette gjør det enklere å måle effekter av soman i CNS uten at det oppstår forgiftning som gir perifere symptomer.
- *In vivo* mikroinjeksjon av 10 nmol soman i hippokampus kan gi EEG og adferdsendringer som er svært lik de endringer som er observert etter systemisk administrasjon av toksiske doser soman. Kun mindre kortvarige effekter ble observert etter mikroinjeksjon av 1 nmol soman.
- Ved *in vivo* mikroinjeksjon av 1 nmol soman i hippokampus kan soman diffundere ut av hippokampus og redusere AChE-aktiviteten i områder i de nærliggende hjernestrukturer.
- *In vivo* mikroinjeksjon av soman i hippokampus ga ingen entydig effekt på theta- og LIA-aktivitet i hippokampus. Det er gjort funn som tyder på at soman gir enkelte signifikante endringer av theta- og LIA-aktivitet, men det er ikke avdekket et klart bilde av hvilke vesentlige endringer som skjer under somaninjeksjon i hippokampus.
- Etter *in vivo* mikroinjeksjon av soman i hippokampus, var det en klar økning i *in vitro* frisetting av ACh fra hippokampusskiver nær injeksjonsstedet. Acetylkolinesterase og butyrylkolinesterase aktivitetene var også kraftig redusert i hippokampusskiver hvor det ble målt høy ACh-frisetting. Den økte frisettingen av ACh er et uttrykk for redusert nedbrytning av ACh. Det ble

ikke observert en tydelig effekt på frisetting av endogene aminosyrer fra hippokampusskivene.

- Totalinnholdet av glutamat, glutamin og alanin i hippokampusskiver rundt injeksjonsstedet, økte etter *in vivo* mikroinjeksjon av soman i hippokampus. Årsaken til denne økningen er ikke fastslått. Det ble kun målt små endringer i GABA og aspartat nivåene.

Forkortelser

ACh	Acetylkolin
AChE	Acetylkoline esterase
Ala	Alanin
AMPA	α -amino-3- hydroxy-5-metyl-4-isoxazolepropionate
AS	Aminosyrer
BD	Brocas diagonale bånd
BuChE	Buturylkolinesterase
BSA	Bovint serum albumin
CNS	Sentralnervesystemet
EC	Entorhinal korteks
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EEG	Elektroencefalogram
GABA	γ -amino-smørsyre
GAD	Glutamat dekarboksylase
GAT	GABA transportør
GD	Gyrus dentatus
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
HPLC	High performance liquid chromatography
LDCV	Large dense core vesikler
LIA	Large irregular amplitude
MS	Mediale septum
Min	Minutt
NMDA	N-metyl-D-aspartat
OPA	Ortho-phtaldialdehyd
PNS	Perifere nervesystem
PP	Perforant path
Sch	Schafferkolateral
SD	Standardavvik
SIA	Small irregular amplitude

SSV	Små synaptiske vesikler
Std	Standard
TMA	Tetrametylamonium perklorat
TOA	Tri-n-Octyl-Amine
TOAP	Tri-n-Octyl-Amine-Phosphate
Vol	Volum

Kapittel 1

Innledning

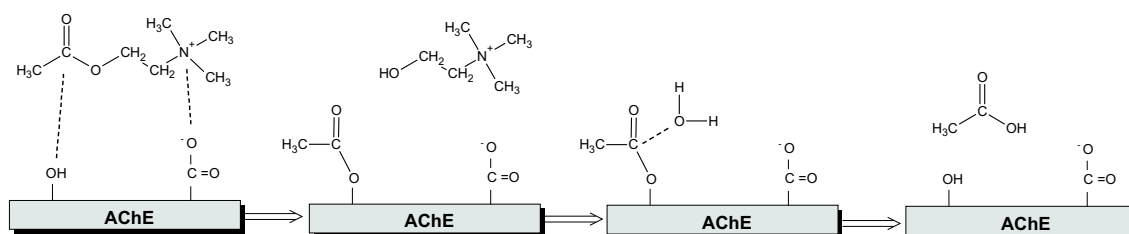
Forgiftninger forbundet med eksponering til organofosfatforbindelser som f. eks. insektmidler og nervegasser resultere i kraftig hemming av enzymet acetylkolinesterase, som hydrolyserer acetylkolin både i hjernen og i det perifere nervesystemet (PNS). En slik forgiftning kan bl.a. føre til nevrodegenerasjon i forskjellige deler av sentralnervesystemet (CNS) (Petras, 1994). En rekke studier tyder på at skader i CNS delvis er et resultat av en sekundær glutamat toksisitet. Det er tidligere gjort forsøk på å redusere de toksiske effektene av neurotransmitteren glutamat, men det er til nå ingen medikamenter som gir total beskyttelse mot slike virkninger tilgjengelig for klinisk bruk etter organofosfatforgiftning. Den kliniske behandlingen i dag er basert på antagonister mot kolinerge reseptorer, reaktiverer av organofosfat hemmet kolinesterase og bruk av GABA agonister. Denne studien inngår i et større prosjekt for å utvikle nye behandlingsstrategier mot organofosfat induerte nevrotoksiske skader.

1.1 Organofosfater

Organofosfater er derivater av fosforsyre eller syrling. De benyttes bl.a. i landbruket som pesticider, og av enkelte land til militære formål som nervegasser. Nervegasser har i moderne tid blitt brukt som både krigs- og terrorvåpen. Nervegassen sarin ble benyttet av den japanske dommedagssekten *Aum Shinrikyo* i et terrorangrep på undergrunnsbanen i Tokyo den 20. mars 1995 (Lia *et al.*, 2001). Nervegasser ble også benyttet av irakiske styrker i krigen mot Iran. Den kurdiske landsbyen Halabja ble i mars 1988 angrepet av irakiske fly som spredte nervegass av typen sarin eller tabun. Resultatet var at over 5000 sivile mistet livet (Ivarsson *et al.*, 1992).

1.1.1 Biologisk mekanisme ved organofosfatforgiftning

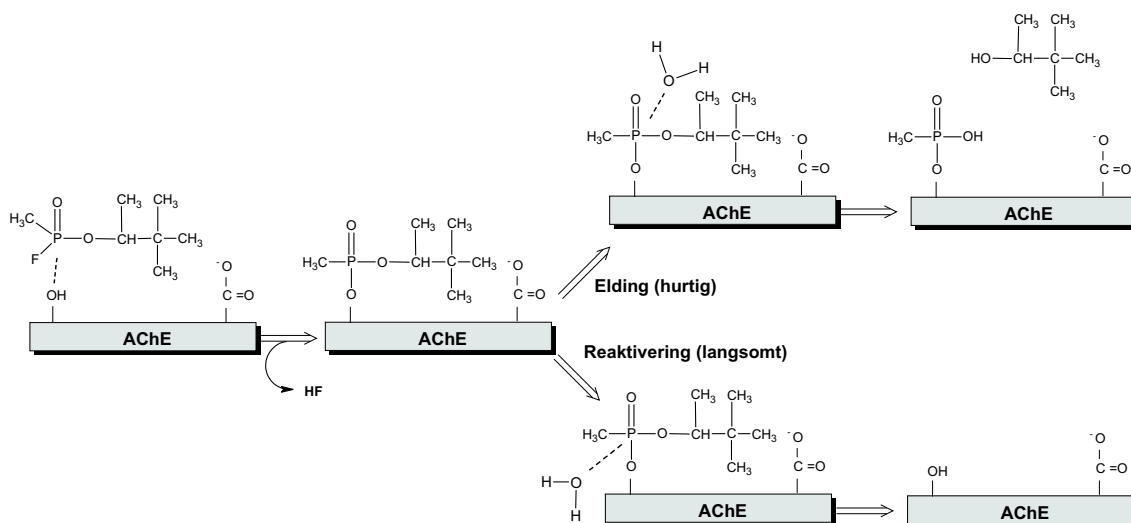
Acetylcholin (ACh) er kvantitativt en viktig neurotransmitter i vertebratenes CNS og PNS (Zimmermann, 1993). Kolinesterasene hydrolyserer ACh til acetat og kolin (figur 1.1). Basert på substratspesifisitet er kolinesterasene delt inn i acetylcholinesterase (AChE) og butyrylkolinesterase (BuChE) (Augustinsson, 1948; Whittaker, 1951). Lokaliseringen av AChE samsvarer godt med kolinerg innervering i neuronalt vev, og AChE er hovedsaklig synaptisk lokalisert (Siegel *et al.*, 1999), mens BuChE syntetiseres i leveren og frisettes i plasma. I tillegg er AChE lokalisert i røde blodlegemer. Den fysiologiske rollen til AChE lokalisert i blodlegemer og plasma BuChE i hydrolyse av ACh er omdiskutert og antas ikke å være en viktig mekanisme ettersom ACh raskt blir nedbrutt i synapsespalten.



Figur 1.1: Interaksjon mellom acetylcholinesterase og acetylcholin. AChE har to bindingssteder i det katalytiske området. Et anionisk sete som tiltrekker seg den positive ladningen på nitrogenatomet i ACh, og et ester bindingssete som binder karbonyl gruppen i ACh. Deacetylering skjer svært raskt og resulterer i fritt enzym.

Organofosfater utøver sin toksiske effekt ved å hemme spesifikke kolinesteraser (AChE) i synapsespaltene i CNS og PNS (Nachmansohn, 1940) (figur 1.2). Eksponering til slike stoffer kan medføre kliniske symptomer som miose, økt sekresjon av spytt, muskelsammentrekninger, kramper, epileptiske anfall og tilslutt koma og død.

Organofosfater bindes ofte irreversibelt til det aktive setet i AChE, inaktiverer enzymet og hindrer derved ACh i å bli hydrolysert i synapsespalten. Dette fører til kontinuerlig stimulering av kolinerge reseptorer i den postsynaptiske membran og dermed et tap av signalkontrollen mellom den pre- og postsynaptiske nervecelle. Reaktivering av organofosfat hemmet enzym vil kunne resultere i funksjonelt AChE (figur 1.2), men denne reaktiveringen vil foregå meget langsomt (timer til dager) ved nervergass hemmet AChE (Sultatos, 1994). Ved dealkylering av organofosfat hemmet AChE, såkalt elding, vil ikke bindingen til AChE kunne brytes. Dette resulterer derved i en irreversibel kovalent binding av organofosfatet til AChE. AChE må da erstattes ved syntese av nytt enzym (Clothier *et al.*, 1981).



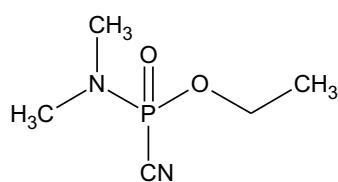
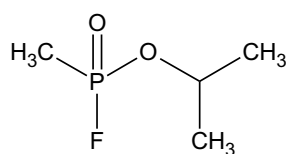
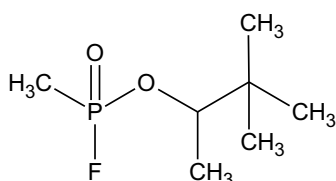
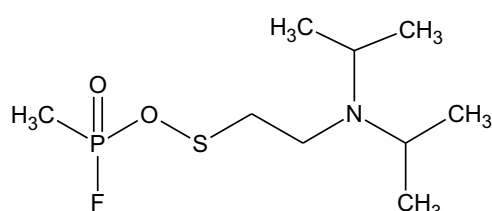
Figur 1.2: Interaksjon mellom acetylkolinesterase og organofosfatet soman. Nukleofi It oksygen på hydroksylgruppen i det aktive sete hos AChE danner kovalent binding til elektrofi It fosfor, som er aktivert av en 'leaving group', som for soman er fluor-atomet. Enzymet blir fosforylert, og 'leaving group' blir frisatt fra enzym-substrat komplekset.

1.1.2 Nervegasser

Nervegasser skiller seg fra pesticidene ved at de ofte er mer reaktive, og har en lavere kjemisk stabilitet. Alkylsubstituentene er ofte isopropyl eller andre store bulkete sidekjeder som hindrer reaktivering. Grupper som gir rask elding av nervegasshemmet enzym er vanlig, som 1,2,2-trimetylpropyl substituenten på soman. Elding av organofosfater reduserer effektiviteten av medisinsk behandling hos eksponerte individer, siden det er svært vanskelig å bryte bindingen mellom organofosfat og enzym etter dealkylering. Alle nervegassene er svært toksiske stoffer, og enkelte av disse er relativt enkle å produsere fra billige og lett tilgjengelige utgangsmaterialer. Nervegassene klassifiseres som **G**- (sarin, soman, tabun) eller **V**-gasser (Vx). V-gassene er giftigere enn G-gassene, men har et lavere damptrykk, som gjør dem mindre flyktige (Ivarsson *et al.*, 1992). Kjemisk struktur til de mest kjente nervegassene er gitt i figur 1.3

1.2 Medisinsk behandling og profylakse

I dag benyttes et kombinert medisinsk behandlingsregime ved organofosfatforgiftning. Atropin og oksim brukes for henholdsvis å blokkere overstimulering via kolinerge muskarine reseptorer og for å reaktivere organofosfathemmet AChE. I tillegg benyttes gjerne benzodiazepiner for å redusere utviklingen av hjerne-

**Tabun****Sarin****Soman****VX**

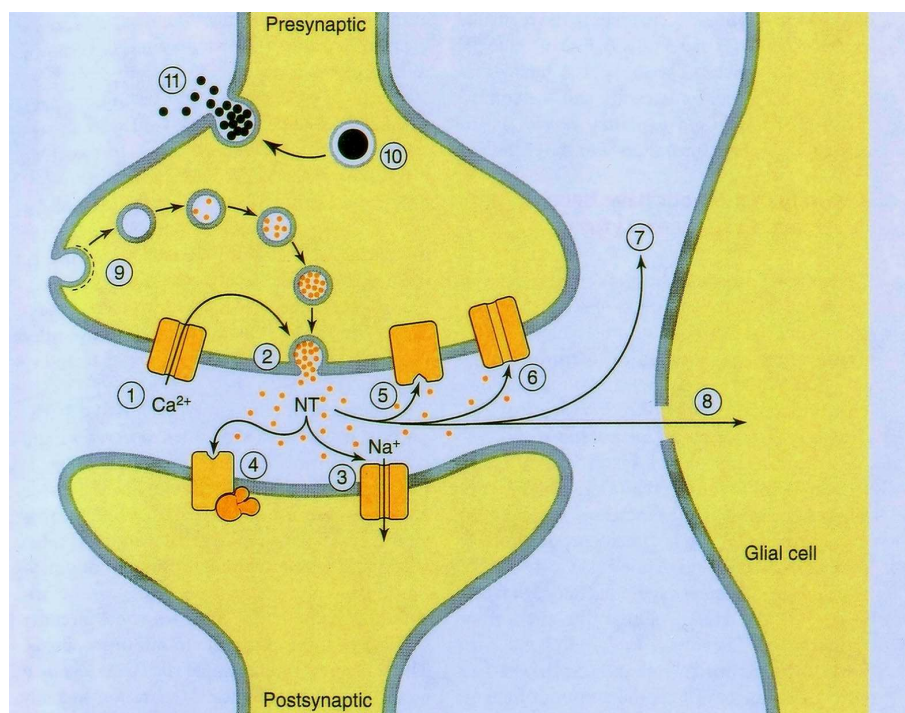
Figur 1.3: Strukturformel for noen nervegasser.

skader og for å redusere de generelle muskelkrampene. I Forsvaret brukes det i tillegg til den medisinske behandlingen med autoinjektorer (atropin og oksim), pyridostigminbromid tabletter profylaktisk for å hindre at kolinesterasene fullstendig hemmes irreversibelt av nervegasser under en eventuell slik eksponering. Inntak av pyridostigmin tabletter fører til at plasmakolinesterase blir reversibelt hemmet i størrelsesorden 15-30 % . Denne andelen av kolinesterasene er derved beskyttet mot irreversibel nervegass inhibering. Til tross for bruk av profylakse og medisinsk behandling, er ikke den medisinske beskyttelsen av hjernen og PNS tilstrekkelig effektiv idag (McDonough *et al.*, 1989; Philippens *et al.*, 1992; Clement & Broxup, 1993). Atropin og oksimer passerer blod-hjerne barrieren i begrenset grad (Wolthuis *et al.*, 1994), og disse medikamentene er derfor kun delvis effektive motmidler ved nervegassforgiftning. Administrasjon av medikamentene må dessuten foregå i et kort tidsintervall umiddelbart etter eksponering (5-10 min). Det er derfor nødvendig å utvikle nye behandlingsformer som gir effektiv medisinsk beskyttelse mot hjerneskader, og som gir forbedring i pasientens tilstand selv om administrering av medikamenter først skjer opptil 30 minutter eller mer etter nervegass eksponering.

1.3 Nervesystemet

Nervecellene kommuniserer med hverandre via synapser, hovedsakelig kjemiske (Elliot, 1905), men elektriske synapser forekommer også. En kjemisk synapse består av en presynaptisk nerveterminal og en postsynaptisk nerve-

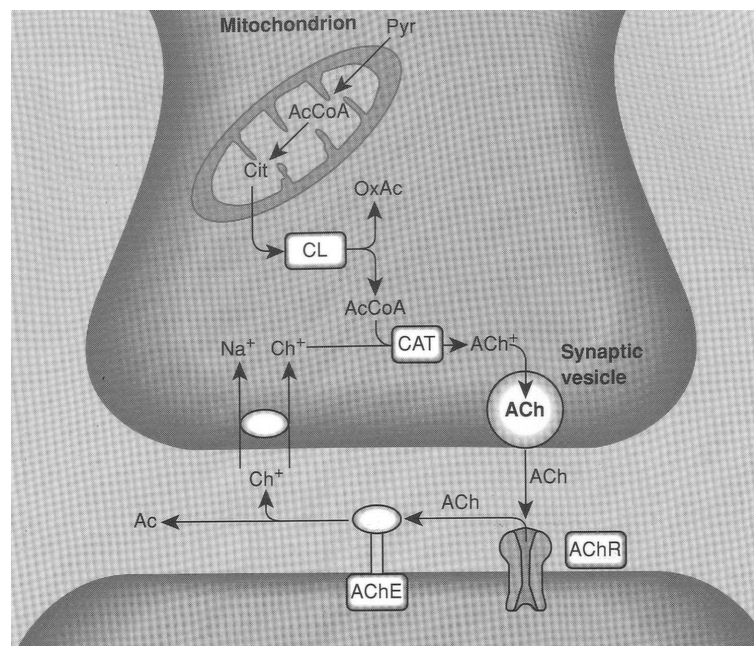
terminal eller et effektor organ. Prosessen for synaptisk transmisjon deles inn i flere steg (se figur 1.4). Nevrotoksiske forbindelser kan interferere med for eksempel metabolisme av neurotransmitterer, frisetting- og opptaksprosesser, eller ved binding til pre- og postsynaptiske reseptorer. Organofosfater utøver sin toksiske effekt ved å hindre nedbrytningen av ACh til acetat og kolin ved å hemme AChE (Nachmansohn, 1940).



Figur 1.4: Synaptisk transmisjon. Ved depolarisering av nevronet strømmer Ca^{2+} -ioner inn i cellen via spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler (1) som frisetter neurotransmittere fra små synaptiske vesikler (SSV) (2). Frisatte neurotransmittere binder seg til pre- eller postsynaptiske reseptorer, som enten er ionotrope (3), (6) eller metabotrope (4), (5). Signaloverføringen mellom pre- og postsynaptisk membran kan termineres ved re-opptak over presynaptisk nerveterminal (6) eller til glia celler (8). Eventuelt kan neurotransmittere nedbrytes i synapsespalten (7). SSV kan regenereres ved endocytose (9). Neuropeptider lagres i LDCV (Large dense core vesikler) (10) og frigis etter repetert stimulering av nevronet, fra steder utenfor det aktive synaptiske området (11) (fra Holz & Fisher, 1999).

1.3.1 Acetylcholin

ACh syntetiseres cytoplasmatisk i nerveterminalen fra acetyl co-enzym A (AcCoA) og kolin av enzymet acetyltransferase (figur 1.5). Hvorvidt acetylcholin i hovedsak frisettes fra vesikler eller fra cytoplasma er fortsatt omdiskutert (for oversikt, se Whittaker, 1990; Israel & Dunant, 1996; Dunant & Israel, 2000).



Figur 1.5: Skjematisk oversikt av syklusen i en kolinerg synapse. ACh syntese, frisetting og nedbrytning. Citrat hydrolyseres av citrat lyase (CL) til Acetyl Co-enzym A (AcCoA) og oxaloacetat (OxAc). Acetyltransferase (CAT) acetylerer kolin og danner ACh. Cytoplasmatiske ACh tas opp og lagres i synaptiske vesikler. Frisatt ACh kan bindes til postsynaptiske nikotineresptorer eller muskarineresptorer, og vil raskt bli nedbrutt av AChE. Kolin (Ch^+) kotretransporteres sammen med Na^+ fra synapsespalten tilbake til presynaptisk terminal (fra Nicholls, 1994).

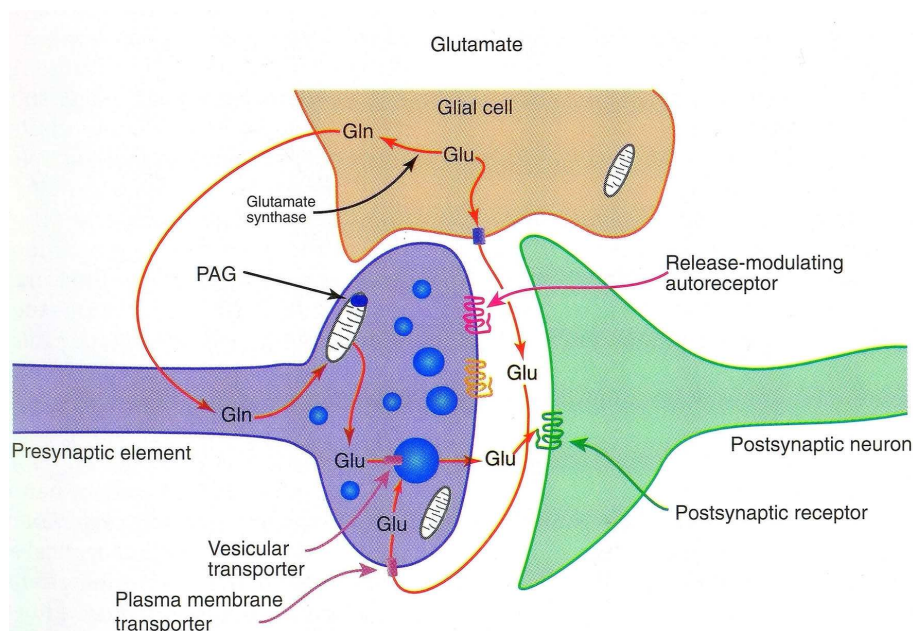
Kolinerge reseptorer

ACh reseptorer deles i to hovedgrupper: 1) Nikotin reseptorer, og 2) Muskarin reseptorer. Nikotin reseptorer er ligandstyrte kationkanaler som ved binding med ligand (nikotin, ACh) åpner for innfluks av små kationer (hovedsakelig Na^+), over cellemembranen. Effekten av nikotin i CNS er hovedsakelig stimulerende (Nicholls, 1994). Muskarin reseptorer er metabotrope reseptorer og utgjør over 95 % av ACh reseptorer i CNS (Nicholls, 1994). Reseptorene er transmembrane proteiner som aktiverer fosfolipase C, K^+ -kanaler eller inhiberer adenylat cyklase via aktivering av G-proteiner (Caulfield, 1993).

1.3.2 Glutamat

Glutamat anses som den kvantitativt viktigste eksitatoriske neurotransmitteren i CNS (Fonnum, 1984; Meldrum, 2000). Glutamat krysser ikke blod-hjerne barrieren (Oldendorf, 1971) og må derfor syntetiseres i hjernen. Etter Ca^{2+} -aktivert frisetting av neurotransmitter glutamat fra nerveterminalen blir glutamat re-opptatt

av Na^+ -avhengige glutamattransportører i nevroner og astrocytter, som også transporterer aspartat (Erecinska, 1987). Glutamat fra astrocyttene kan resirkuleres tilbake til nevronale synaptiske vesikler (figur 1.6) (Sisjö, 1978).

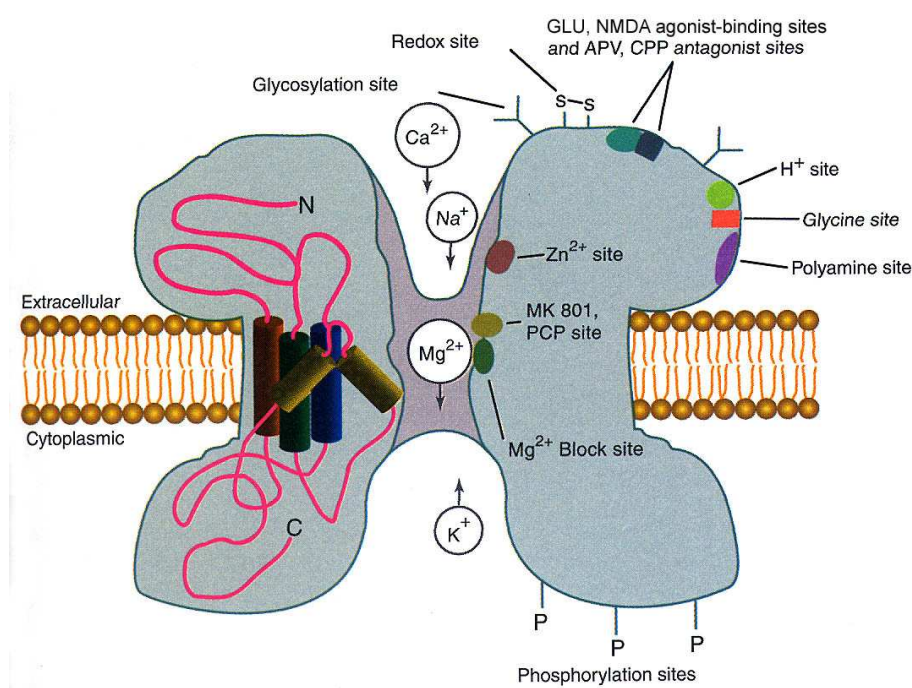


Figur 1.6: Skjematiske oversikt av syklusen i en glutamaterg synapse. Glutamat (Glu) syntetiseres via ulike metabolske veier og oppkonsentreres i SSV. Etter frisetting kan Glu binde seg til pre eller postsynaptiske reseptorer. Glutamat fjernes fra synapsespalten av glutamattransportører i nevroner eller astrocytter, og kan resirkuleres tilbake til nevroner fra astrocyttene (fra Zigmond *et al.*, 1999).

Glutamaterge reseptorer

Glutamat bindes til metabotrope og ionotrope reseptorer. Metabotrope glutamatreseptorer er G-protein koplete reseptorer som øker det intracellulære nivået av inositol-trifosfat og diacylglycerol, eller reduserer nivået av syklisk adenosinmonofosfat (Meldrum, 2000). Basert på farmakologiske studier er tre hovedtyper ionotrope reseptorer identifisert på bakgrunn av selektiv binding til ulike agonister: 1) α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolepropionate (AMPA reseptorer), 2) Kainat (Kainat reseptorer) og 3) N-metyl-D-aspartat (NMDA reseptorer) (Watkins *et al.*, 1990; Gasic & Hollmann, 1992). AMPA og kainat reseptorer er ligandstyrte kationkanaler med høy K^+ - og Na^+ -permeabilitet. NMDA reseptoren er funksjonelt forskjellig fra AMPA/kainat reseptorene. Binding av glutamat til NMDA-reseptoren under hvilepotensiale er ikke nok til å åpne kation kanalen, ettersom en karakteristisk egenskap ved NMDA reseptoren er den spenningsensitive blokkeringen av kanalen med Mg^{2+} (Meldrum,

2000). Mg^{2+} blokkeringen kan fjernes fra kanalen ved delvis depolarisering av den postsynaptiske membranen. NMDA reseptor-kanalen har høy permeabilitet for Na^+ - og Ca^{2+} -ioner (figur 1.7). NMDA reseptoren er også avhengig av koagonister som f.eks glycin for å bli aktivert, og hver reseptor antas å ha to glutamat og to glycinseter (Laube *et al.*, 1998). Kompleksiteten i NMDA reseptoren gjør at den kan modifieres farmakologisk av et bredt spekter av forbindelser som binder seg til de ulike bindingsetene (figur 1.7). Eksempler på slike bindingseter er glutamat/NMDA-setet, selve ionekanalen, polyaminsetet og glycinsetet (Parsons *et al.*, 1998).



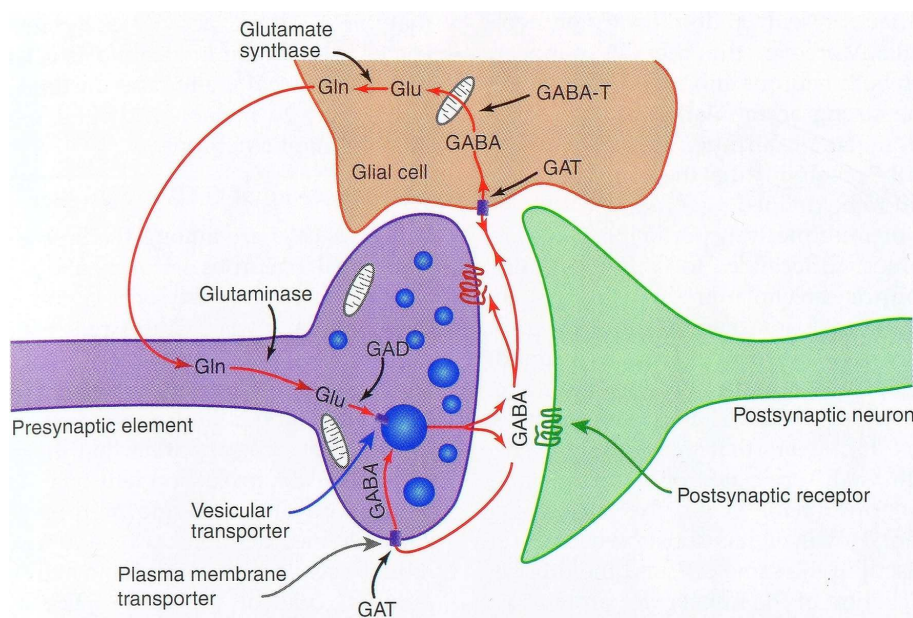
Figur 1.7: NMDA reseptoren. Figuren viser mange forskjellige bindingsseter hvor ligander (agonister/antagonister) kan modulere aktiviteten til NMDA reseptoren (fra Zigmond *et al.*, 1999).

NMDA reseptoren antas å være en viktig brikke i utviklingen av sentralnervøse effekter ved organofosfat-forgiftning bl.a. på grunn av den høye Ca^{2+} -permeabiliteten i NMDA reseptoren. NMDA-antagonister anses derfor som potensielle medikamenter for å beskytte mot organofosfat induisert epilepsi og hjerneskade (Lallement *et al.*, 1998; McDonough & Shih, 1993). Ca^{2+} -ioner er viktige signalmolekyler i nerveceller og cellene bruker mye energi for å holde Ca^{2+} -konsentrasjonen på et lavt nivå (μM). Glutamat i for høye konsentrasjoner kan fungere som eksitotoksin ved at en forlenget stimulering av de glutamaterge reseptorene, spesielt NMDA reseptorene, vil bidra til å gi en vedvarende økning

av cytoplasmatisk Ca^{2+} -konsentrasjon i nervecellene. Dette kan aktivere Ca^{2+} -avhengige proteaser, fosfolipaser og andre intracellulære sekundære signalveier og kan resultere i bl.a. inflammasjon, dannelse av frie radikaler eller nevronal celledød (Fonnum, 1998).

1.3.3 GABA

γ -amino-smørsyre (GABA) er den viktigste inhibitoriske aminosyren i CNS, og er lokalisert både i internevroner og projeksjonsnevroner i CNS (Zigmond *et al.*, 1999). GABA syntetiseres hovedsakelig fra metabolisme av glukose (figur 1.8).



Figur 1.8: Skjematisk oversikt av syklusen i en GABAerg synapse. GABA dannes ved dekarboksylering av glutamat (Glu) v.h.a glutamat dekarboksylase (GAD). Etter frisetting kan GABA binde seg til pre- eller postsynaptiske reseptorer. GABA fjernes fra synapsespalten av GABA transportører (GAT) i nevroner eller astrocytter, og kan resirkuleres tilbake til nevroner fra astrocyttene (fra Zigmond *et al.*, 1999).

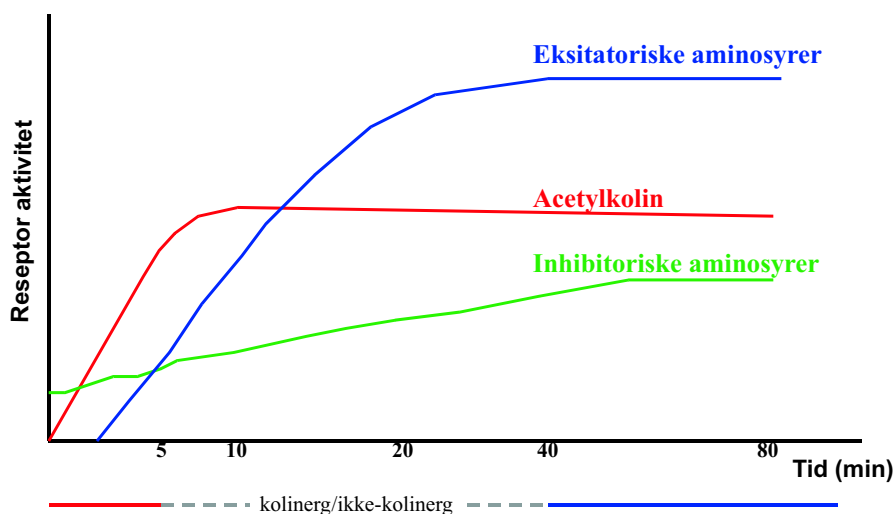
GABAerge reseptorer

To hovedtyper GABA reseptorer er identifisert. Ionotrope GABA_A reseptorer er ligandstyrte kationkanaler som ved binding av ligand (GABA) åpner for innfluks av Cl^- -ioner. Dette reduserer membranpotensialet, og minsker sannsynligheten for depolarisering i postsynaptiske nevroner (Siegel *et al.*, 1999). Denne mekanismen utnyttes under behandling av organofosfat-forgiftninger ved at GABA_A

antagonister (benzodiazepiner) administreres til pasienter for bl.a. å hindre hjerne-skader. Metabotrope GABA_B reseptorer er indirekte koplet til K⁺-kanaler. Ved aktivering kan reseptorene redusere Ca²⁺-konduktansen og inhibere cAMP via intracellulære mekanismer formidlet av G-protein (Siegel *et al.*, 1999).

1.3.4 Effekten av nervegass i CNS

Inhiberingen av AChE i CNS og PNS fører til hypereksitering av nerveceller i den kolinerge delen av nervesystemet. Ved organofosfat-forgiftning vil den ekstracellulære konsentrasjonen av ACh øke og kan i CNS initiere en kaskade av prosesser som kan fører til epileptisk anfall og kramper som raskt kan utvikles til *status epilepticus* i hjernen (Koplovitz & Skvorak, 1998; Shih & McDonough, 1997; Lallement *et al.*, 1998) og derved gi nevronale skader i utsatte områder av hjernen (Carpentier *et al.*, 2000). Økt synaptisk konsentrasjon av ACh vil raskt kunne rekruttere andre neurotransmittersystemer i CNS (figur 1.9). Spesielt de GABAerge og glutamaterge neurotransmittersystemene ser ut til å være involvert, ettersom NMDA-antagonister og benzodiazepiner er i stand til å moderere epileptiske anfall utløst av bl.a. nervegasser (McDonough & Shih, 1993). Under nervegassforgiftning vil konsentrasjonen av ACh overstige en terskel og aktivere glutamaterge nevroner og derved øke frisettingen av glutamat (Wade *et al.*, 1987; Lallement *et al.*, 1992a; Lallement *et al.*, 1992b).



Figur 1.9: Nervegass-induserte endringer i neurotransmitter nivået i CNS (fra Shih & McDonough, 1997).

Av den grunn vil en økt aktivering av kolinerge fibrer påvirke og aktivere glutamaterge systemer. Den økte ekstracellulære konsentrasjonen av glutamat vil

sammen med det høye nivået av ACh resulterer i en økt epileptiform aktivitet og derved kunne føre til eksitotoksiske skader på hjernen og påfølgende nevronal celledød (McDonough & Shih, 1997). Moduleringen av GABA-erge nevroner i forskjellige områder i CNS som et resultat av den kolinerge aktivisering ved nervegass forgiftning er derimot omstridt, og det foreligger varierende evidens for en slik aktivisering i litteraturen (Kar & Martin, 1972; Fosbraey *et al.*, 1990; Lallement *et al.*, 1993b).

Utviklingen av nervegass induerte sentralnervøse anfall i CNS er foreslått å bestå av tre faser: Umiddelbart etter forgiftning oppstår en tidlig kolinerg fase (0-5 min), deretter en transisjons fase med økende blandet kolinerg/ikke-kolinerg aktivisering (5-40 min) og til slutt en ikke-kolinerg fase (etter 40 min) (Shih & McDonough, 1997). Følgende endringer skjer i CNS i de tre fasene:

I. Kolinerg fase (0-5 min)

- Soman inhiberer AChE som resulterer i et økt ACh-nivået i de kolinerge synapsene.
- Økt nivå av ACh initierer epileptisk aktivitet i sensitive hjerneområder (amygdala, piriforme korteks, hippokampus og i deler av thalamus).
- Den epileptiske aktiviteten spres seg raskt til andre neurotransmitter systemer. Kolinerge antagonist i relativt moderate doser kan i denne fasen redusere anfallene og hindre hjerneskader.

II. Transisjons fase: blandet kolinerg-ikke-kolinerg fase (5-40 min)

- Nevroner som frisetter aminosyre neurotransmitter blir i større grad aktivert i denne fasen. Relativt høye doser med kolinerge antagonist kreves for å stoppe anfallene. Hjerneskader begynner å oppstå i sensitive områder.

III. Ikke-kolinerg fase (etter 40 min)

- I denne fasen forsterkes endringene i aminosyre neurotransmitter nivåene i synapsene. Anti-kolinerge medikamenter er ikke tilstrekkelig effektive i å terminere epileptiske anfall initiert av nervegasser. NMDA-reseptor antagonist administrert sammen med kolinerge antagonist kan redusere omfanget av anfallene. Nevronale skader med celledød oppstår i store deler av hjernen, men graden av skade kan antakelig begrenses noe.

Den første og tidligste fasen av nervegass induerte anfall antas å nesten utelukkende styres av kolinerge mekanismer (Shih & McDonough, 1997). Sentralt

virkende kolinerge antagonister som skopolamin er svært effektive i å redusere epileptisk aktivitet i denne fasen (Shih *et al.*, 1990). Ettersom varigheten på anfallene øker er det nødvendig med høyere doser for å oppnå terminering av den økte epileptiforme aktiviteten. Administrering av medikamenter med anti-NMDA aktivitet har derimot en begrenset effekt selv etter 40 min (McDonough & Shih, 1993). Den tidlige antiepileptiske virkningen av forbindelser med anti-kolinerge virkning tolkes som en spesifikk effekt som blokkerer den primære kolinerge eksitatoriske drivkraften, som starter og opprettholder anfallene i en tidlig fase av forgiftningen. Hvis anfallene ikke termineres vil den eksitatoriske aktiviteten i kolinerge nevroner rekruttere andre eksitatoriske neurotransmitter-systemer (bl.a. glutamat), som kan opprettholde anfallene uavhengig av den opprinnelige kolinerge aktiviteten (McDonough & Shih, 1993).

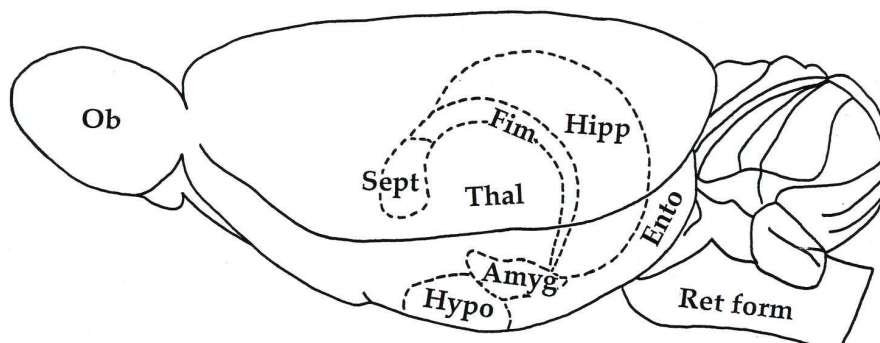
1.4 Hippokampus

Hippokampus har en lav terskel for å utvikle epileptiske anfall (Green, 1964) og ser ut til å være svært sensitiv for skader etter eksponering for ulike kjemiske forbindelser som kainat (Olney *et al.*, 1974), 3-acetylpyridin (Cogeshall & MacLean, 1958) glucocorticoider (Sapolsky, 1985), trimetyltinn (Brown *et al.*, 1979) og ved somanforgiftning (Petras, 1994; McDonough *et al.*, 1998). P.g.a. den sentrale rollen hippokampus utgjør for læring og hukommelse (Eichenbaum & Cohen, 2001), vil skader i dette området kunne få store konsekvenser. Dette bidrar til å gjøre hippokampus til et viktig forskningsobjekt også i utviklingen av nye effektive motmidler mot sentralnervøse effekter av nervegass.

1.4.1 Generell struktur

Hippokampus er del av en gruppe strukturer i det limbiske systemet som utgjør den hippokampale formasjonen (fig 1.10), som inkluderer hippokampus, gyrus dentatus (GD) og subiculum. Det limbiske systemet består for øvrig av hypothalamus, amygdala og septum. Fiberforbindelsene i den hippokampale formasjonen er lokalisert i avgrensede regioner, og celler og fibre danner adskilte lag (Andersen *et al.*, 1971). Hippokampus deles ofte inn i tre regioner; CA1, CA2 og CA3 (Lorente de Nó, 1934).

De viktigste nevronene i GD er korncellene. Korncellene er små monopolare nevroner organisert i 4-6 cellelag i det granulære cellelaget, som mottar synaptisk input fra dendritter i molekylærlaget. Aksonene fra korncellene projiserer via det polymorfe cellelaget til CA3 regionen (mosefibre) (Blackstad *et al.*, 1970). Pyramidecellene i CA1-CA3 er multipolare nevroner organisert i 3-6 cellelag i pyramidecellelaget, og har dendritter lokalisert i stratum radiatum, stratum



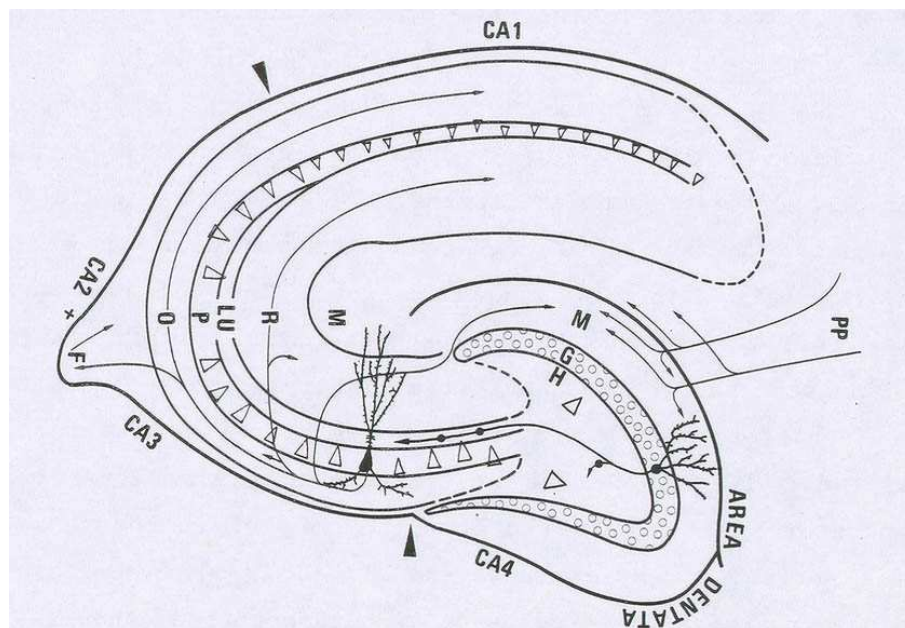
Figur 1.10: Plassering av hippocampus i rottehjerne med omliggende strukturer. Amyg: amygdala, Ento: entorinalkortex, Fim: fimbria, Hipp: hippocampus, Ob: olfactory bulb, Ret: retikulærdannelsen, Sept: septum, Thal: thalamus (fra Myhrer, 1997).

lucidum, stratum oriens og stratum lacunosum moleculare (Andersen *et al.*, 1971). Pyramidecellene i CA1 mottar afferente nevroner fra både enthorinal korteks (EC) og CA3 (Johnston & Amaral, 1998). De viktigste internevronene i både hippocampus og GD, er basketcellene (Johnston & Amaral, 1998).

Hippocampus er en tydelig laminert struktur med topografisk organiserte forbindelser (figur 1.11). Andersen *et al.* (1971) har foreslått en hypotese om laminær organisering av hippocampale baner som antar at hippocampus består av mange funksjonelle enheter eller lameller, og at hver enhet er en uavhengig struktur som er i stand til å utføre de samme funksjonene. Den indre organiseringen av hver lamell kan forenklet fremstilles som et nettverk med fire elementer (Andersen *et al.*, 1971; Andersen, 1975). Nevroner lokalisert i EC gir opphav til perforant path (PP) som danner synapser med både kornceller i GD og pyramideceller i CA3. Korncellene i GD gir opphav til mosefibre som danner synapser med dendritter på CA3 pyramideceller (Blackstad *et al.*, 1970). CA3 pyramideceller gir opphav til schafferkolateraler (Sch) som danner synapser med pyramideceller i CA1 (Andersen *et al.*, 1973). Eksitatoriske og inhibitoriske transverse forbindelser mellom lamellene eksisterer også. Disse forbindelsene kan modifisere aktiviteten til nærliggende lameller (Andersen *et al.*, 1971).

1.4.2 Afferent innervering av hippocampus

De viktigste kortikale afferente nevroner til hippocampus mottas via PP fra EC (Lorente de Nó, 1934; Hjort-Simonsen, 1972) og EC mottar projeksjoner tilbake fra hippocampus. EC mottar sanseinformasjon via afferente nerveceller i kortikale områder, og projiserer tilbake til mange av de samme kortikale områdene. Infor-



Figur 1.11: Skisse av hovedlagene og deres forbindelser i den hippocampale formasjonen. Merking: **Hippokampus:** F=fimbria, O=stratum oriens, P=stratum pyramidale (med de indikerte områdene CA1-4), R=stratum radiatum, M=stratum lacunosum moleculare, LU=stratum lucidum (mosefibrelaget). **Gyrus dentatus (Area dentata):** H=hilus gyrus dentata, G=stratum granulosum, M=stratum moleculare. PP=perforant path fra entorhinal korteks, danner fiber til molekylærlaget i gyrus dentatus. Granulær cellene gir opphav til mosefibre som kan danne synapser med internevroner i det polymorfe cellelaget, og med dendritter i stratum oriens i CA3 (fra Nalsund, 1986)

masjon som mottas av EC kan dermed sendes gjennom hele det hippocampale nettverket og bearbeides, for deretter å sendes tilbake til de kortikale områdene hvor informasjonssignalene hadde sin opprinnelse (Johnston & Amaral, 1998). Denne bearbeidingen av sanseinformasjon er essensiell for lagring av informasjon i langtidshukommelsen, og understreker den viktige fysiologiske rollen hippocampus spiller for hukommelse og læring.

Hippokampus mottar også informasjon via fibre fra ulike subkortikale områder (septumkjernene, locus coeruleus, mediale rafekjerner og supramammillær området). Septal projeksjon til hippocampus dannes fra celler i mediale septum (MS) og Brocas diagonale bånd (BD) og utgjør en av hovedprojeksjonene fra subkortikale områder til hippocampus og EC (Nyakas *et al.*, 1987; Gaykema *et al.*, 1990; Woolf *et al.*, 1984). 30-50 % av cellene i MS og 50-75 % av cellene i BD som sender afferente fibre til hippocampus er kolinerge (Amaral & Kurz, 1985; Wainer *et al.*, 1985), og denne innvervingen utgjør majoriteten av den kolinerge innvervingen til hippocampus.

1.4.3 Neurotransmittere og reseptorer i hippokampus

Den viktigste neurotransmitteren i hippokampus er glutamat, men aspartat er også en mulig neurotransmitter i hippokampus med eksitatorisk effekt (Nadler *et al.*, 1976; Storm-Mathisen, 1977; Roberts *et al.*, 1981). Glutamat blir frisatt fra PP, mosefibre, commissural-assosiasjonsfibrene, og Sch (Johnston & Amaral, 1998).

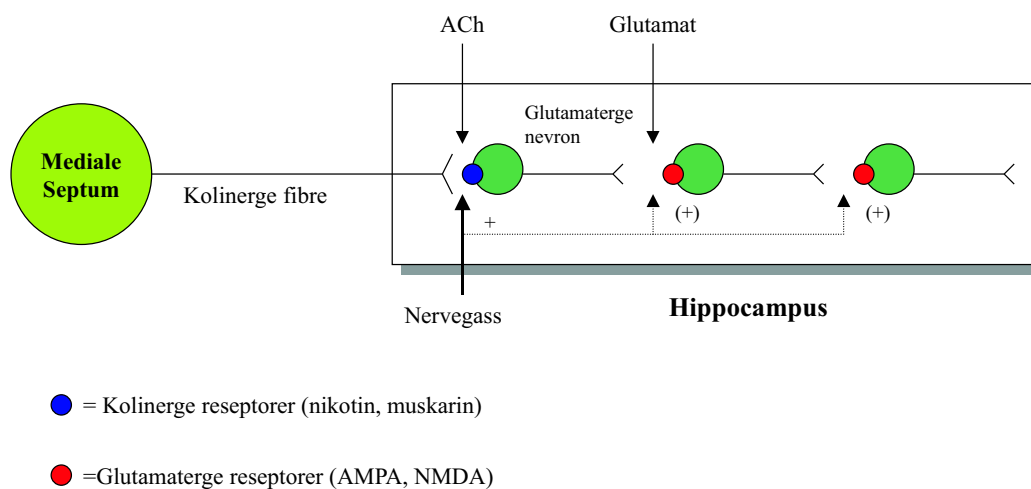
ACh er en annen viktig neurotransmitter i hippokampus som kan ha både eksitatorisk og inhibitorisk effekt. ACh kan eksitere GABAerge internevroner i polymorfe celledag som utøver inhibitorisk effekt på eksitatoriske kornceller i GD og pyramideceller i hippokampus (Benardo & Prince, 1982; Brunner & Misgeld, 1988). De GABAerge internevronene kan eksiteres ved aktivering av nikotine (Brunner & Misgeld, 1988), eller muskarine reseptorer (Kaspar & Wade, 2001). Det er videre vist at aktivering av presynaptiske nikotinreseptorer på glutamaterge nerveceller kan stimulere glutamatfrisettingen fra pyramideceller i CA3 (Gray *et al.*, 1996). Muskarine reseptorer er beskrevet både pre- og postsynaptisk i hippokampus (Williams & Johnston, 1993). Presynaptisk kan aktivering av muskarine reseptorer utøve en inhibitorisk effekt på glutamatfrisettingen (Marchi & Raiteri, 1989), mens postsynaptisk er aktiveringen av muskarine reseptorer koplet til inhibering av K^+ -kanaler (Brown & Adams, 1980; Brown *et al.*, 1990; Storm-Mathisen, 1990). Reduksjon i K^+ -konduktansen øker sannsynligheten for depolarisering av nevronet, og har en avgjort eksitatorisk effekt (Halliwell & Adams, 1982). Den økte kolinerge aktiveringen fra MS/BD ved organofosfat-forgiftning øker den intercellulære konsentrasjonen av glutamat i hippokampus (Lallement *et al.*, 1992a), sannsynligvis ved aktivering av pyramideceller og kornceller i GD (figur 1.12).

Den viktigste inhibitoriske neurotransmitteren i hippokampus er GABA (Roberts *et al.*, 1976). GABAerge synapser forekommer både på soma og dendrittene til pyramidale nevroner. GABA_B reseptorer er hovedsakelig lokalisert på dendrittene, mens GABA_A reseptorer er fordelt over hele nevronet (Miles *et al.*, 1996).

1.4.4 EEG og Theta-rytme i hippokampus

Den elektriske aktiviteten i ulike hjernestrukturer kan avleses som elektroencefalogram (EEG). EEG-avlesning gir et inntrykk av summen av den nevronale aktiviteten i det registrerte området. Ekstrakraniell EEG registreres ved å feste elektroder på utsiden av skallen. Ved intrakraniell EEG-registrering kan feltpotensialet i ulike hjernestrukturer registreres. Ved å operere inn en bipolar elektrode i hippokampus kan feltpotensialer i f.eks. GD og CA1 studeres, slik som utført i denne hovedoppgaven.

Forekomsten av thetarytme (4-12 Hz) i hippokampus hos rotte er sterkt knyttet



Figur 1.12: Kolinerg input fra mediale septum kan aktivere glutamaterge nevroner i hippocampus. Ved organofosfat-forgiftning vil glutamatfrisettingen øke fra kornceller og pyramideceller i hippocampus som blir innervert av kolinerge fibre. Den økte glutamatfrisettingen vil igjen stimulere andre glutamaterge nevroner, og danne en kaskade av glutamatfrisetting som kan føre til nevronal celledød.

til motorisk aktivitet. To typer motorisk adferd er klassifisert: type 1 adferd, som er karakterisert ved frivillige bevegelser (normal gange, reise seg på bakbeina, graving, hodebevegelser o.l.), generer hippocampal thetarytme i frekvensområdet 6-12 Hz. Type 2 adferd, karakteriseres av automatiserte/ubevisste bevegelser (ansiktsvask, kløe, tygging og årvåken immobilitet). Denne adferden genererer irregulær aktivitet med høy (LIA) eller lav amplitude (SIA) i frekvensområdet (2-50 Hz). Det er observert 2 typer theta i hippocampus: Type 1 theta genereres under type 1 adferd, mens type 2 er forbundet med immobilitet (Bland, 1986). Dannelsen av type 1 theta blir ikke hindret av administrering av atropin, men dannelsen er sensitiv til anestetika som urethan, etyleter og alkohol. Type 2 theta er resistent mot de fleste anestetika, men følsom for atropin (Bland, 1986), og har et noe bredere frekvensområde (4-12 Hz) enn type 1 theta (Bland & Oddie, 2001). Dannelsen av thetarytmen er avhengig av oppadstigende baner i hjernestammen som synkroniserer aktiviteten i hippocampus. MS fungerer som et knutepunkt for de oppadstigende banene, og fordeler input til posterior cingulate korteks, EC og den hippocampale formasjonen (Bland, 2000). Bland & Oddie (2001) har foreslått en sensorisk-motorisk modell der signaler til hippocampus fra sensoriske systemer som initierer type 1 adferd (type 1 theta) integreres med input fra motoriske systemer (type 1+2). Type 2 theta er dermed sannsynligvis alltid aktiv sammen med type 1 theta. Theta i hippocampus og relaterte strukturer fungerer dermed ved å gi voluntære motorsystemer kontinuerlig oppdatert tilbakemelding

på egen utførelse i henhold til forandringer i miljøet (via sensorisk input).

På bakgrunn av dette vil en økt kolinerg aktivering som ved nervegassforgiftning, kunne gi endringer i EEG og theta-rytme i hippocampus. Denne endringen kan forklares ut i fra de molekylære endringene i ulike neurotransmittersystemer i hippocampus. Dette er derfor en viktig og sentral nevro-nal aktivitet som kan benyttes i studier for å kartlegge endringer ved *in vivo* eksponering til nervegass og for å kunne studere aktuelle motmidler som kan påvirke kolinerge, glutamaterge, og GABAerge reseptorer.

1.5 Målsetting med oppgaven

På bakgrunn av den kunnskapen man har om nervesystemets oppbygning og funksjon er det viktig å utvikle og etablere nye metoder for å studere effekter av organofosfater i CNS. Det er spesielt viktig å studere effekter på områder i hjernen som er ekstra følsomme for slike kolinesterasehemmere. Denne oppgaven inngår i et større forskningsprosjekt som har som mål å studere betydningen av bl.a. antagonister til den glutamaterge NMDA-reseptoren, og spesielt til glycinsetet i reseptoren, ved organofosfat-forgiftning. Ut i fra disse studiene kan det vurderes hvorvidt slike blokkere vil kunne benyttes terapeutisk ved organofosfat-forgiftninger. Dette vil kunne bli et svært viktig bidrag i det kliniske arbeidet med å behandle slike pasienter.

Formålet med oppgaven var derfor følgende:

- Vurdere *in vitro* metoder for måling av effekter av organofosfater på skiver fra hippocampus. Dette er viktig for å fastslå om slike metoder kan brukes for å studere interaksjon mellom kolinerge og glutamaterge nevroner i hippocampus ved organofosfat-forgiftninger.
- Etablere en *in vivo* metode for injeksjon av organofosfater i hippocampus og studere effekter på hippocampal EEG og *in vitro* frisetting av endogen ACh og aminosyre neurotransmittere fra hippocampusskiver.
- Gjøre enkle adferdsregistreringer etter injeksjon av nervegass under *in vivo* forsøkene.

Kapittel 2

Materiale og metoder

2.1 Forsøksdyr

Dunkin Harly hann marsvin (200-250 g) og Wistar hann rotte (340-350 g) ble levert fra Møllergaards avlslaboratorier i Ejby, Danmark. Dyrene ble oppbevart på vivariet ved FFI i standard laboratoriebur i 12/12 timers syklus lys/mørke (21 °C og 55 % relativ fuktighet). Opptil 3 dyr ble oppbevart i ett og samme bur med dimensjonene [L:56 cm x B:38 cm x H:25 cm] for marsvinene og [L:55 cm x B:30 cm x H:20 cm] for rottene. Mens rottene ble foret med standard laboratoriediett, ble marsvinene foret med standard laboratoriediett tilsatt C-vitamin. Alle dyrene hadde fri tilgang til mat og drikke. Dyrene fikk tilvenne seg de nye omgivelsene i minst 7 døgn etter mottakelse på FFI, før dekapitering av marsvinene eller operasjon av rottene ble utført. Strø ble skiftet annenhver dag for å hindre opphopning av urin.

Alle *in vivo* eksperimenter på dyr ble gjennomført ihht til “Søknad om tillatelse til å utføre forsøk med dyr ved godkjent forsøksdyravdeling” etter godkjenning fra Forsøksdyrutvalget.

2.2 Kjemikalier

Alomone labs (Jerusalem, Israel)

ω -conotoxin GVIA

American Radiolabeled Chemicals Inc (USA)

^3H -glutamat (L-[3,4- ^3H]-glutamat), 60 Ci/mmol, 1 mCi/ml

Amersham International plc. (UK)

[1- ^{14}C]-acetylkolinylklorid, 55,5 mCi/mmol, 100 $\mu\text{Ci/ml}$

Dumex-alpha (København, Danmark)

Stesolid (diazepam 5 mg/ml)

Fluka (Sveits)

TMA (tetramethylammonium perklorat)

Forsvarets forskningsinstitutt (Kjeller, Norge)

Soman [σ -(1,2,2 trimetylpropyl)-metylphosphonofluoridat] er syntetisert ved FFI og har renhet på mer enn 95 % målt ved NMR.

Jansen (Buckinghamshire, UK)

Hypnorm (fentanyl citrate 0,315 mg/ml og fluanisone 10 mg/ml)

Merck, KGaA (Darmstadt, Tyskland)

Acetylcholinjodid, Folin Ciocalteus fenolreagens, ortho-fosforsyre 85 %

Pachard Instruments Company (Massachusetts, USA)

Opti-Fluor scintillasjonsvæske RBI, Insta-Fluor scintillasjonsvæske RBI

Sigma Chemical Company (St. Louis, USA)

Acetylthiokolinjodid, EDTA (etylendiaminetetraacetat), EGTA (etylenglycol-bis(β -aminoethyleter)N,N-tetraacetat), Ethopropazin, Glycin, OPA (DL- α -aminoadipinsyre, o-phataldialdehyde), TOA (tri-n-octyl-amine), Trizma (tris[hydroksymetyl]aminometan hydroklorid)

Alle øvrige kjemikalier var av standard laboratoriekvalitet.

2.3 Bufferløsninger

Hippokampuskivene ble perfundert med en buffer etablert ved FFI (tabell 2.1). Bufferen har en sammensetning av stoffer som er tilnærmet lik cerebrospinalvæske. Bufferkapasiteten til NaHCO_3 i standard kunstig cerebrospinalvæske er erstattet med Na_2HPO_4 som ikke krever konstant tilførsel av 95 % O_2 og 5% CO_2 for å holde pH lik 7,4.

Stoffer	Normal buffer	Høy KCl buffer	Normal, lav Ca ²⁺ -buffer	Høy KCl lav Ca ²⁺ -buffer
Tris-HCl	15	15	15	15
NaCl	140	120-20	140	120-20
KCl	5	25-125	5	25-125
Ca ²⁺	2	2	0,1	0,1
MgSO ₄	1	1	10	10
Na ₂ HPO ₄	1,2	1,2	1,2	1,2
Glucose	5	5	5	5
EDTA	-	-	0,001 ¹	0,001 ¹
ω -Conotoxin GVIA	-	-	0,01 ¹	0,01 ¹
Soman	0,01/0,001 ²	0,01 ²	-	-

Tabell 2.1: Bufferløsninger benyttet i perfusjonsforsøkene. Konsentrasjonene er oppgitt i mM.

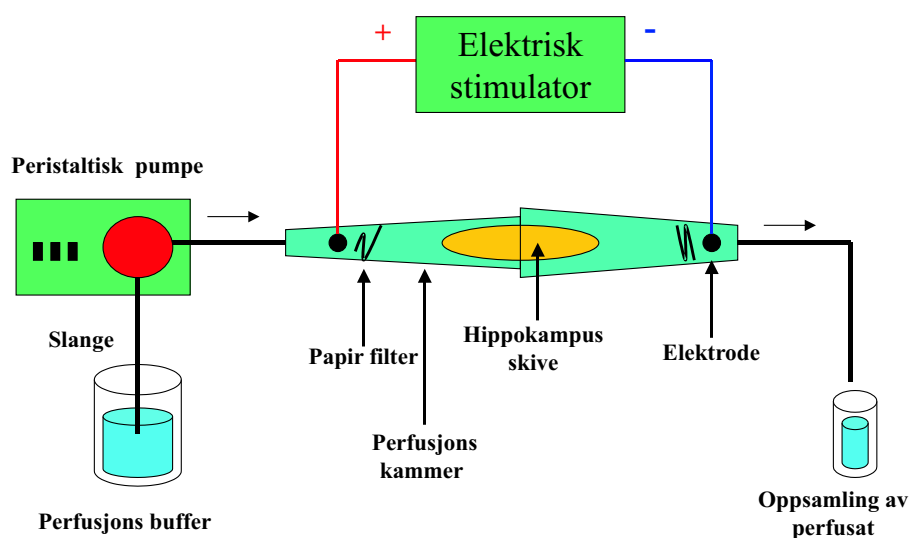
¹ EDTA og ω -Conotoxin GVIA ble kun tilsatt i noen av bufferløsningene hvor konsentrasjonen av Ca²⁺ var lav (0,1 mM), ved bestemmelse av Ca²⁺-avhengig frisetting av glutamat.

² Soman ble kun tilsatt i bufferløsninger ved forsøk for å påvise effekten av soman på glutamatfrisetting, og under preinkubering av hippokampusskiver med soman ved bestemmelse av endogen ACh-frisetting.

2.4 *In vitro* perfusjons forsøk

Marsvinene og rottene ble avlivet ved dekapitering og hodet ble øyeblikkelig lagt på is. Skalletaket ble åpnet med saks, hjernen ble tatt ut og hippokampus ble dissekert frem. Hele prosessen ble utført på is og det ble tilført 0,32 M sukrose-løsning for å holde vevet nedkjølt og hindre uttørkning. Hippokampus ble plassert på en microtom, og fra marsvinene ble 6 skiver fra dorsal hippokampus med en tykkelse på 400 μ m skåret til. Etter forsøkene med *in vivo* mikroinjeksjon i rotter, ble hippokampusskiver skåret etter et bestemt skjema (figur 2.4). Alle skivene ble overført til en plastskål med 2 ml oksygenert normalbuffer (tabell 2.1). Hippokampusskivene ble etter en eventuell forbehandling vasket med 3 x 2 ml normalbuffer, og plassert i perfusjonskammer (1 skive i hvert kammer for marsvinene og 2 skiver i hvert kammer for rottene). I hvert forsøk ble det benyttet 6 kammer. Perfusjonskamrene var laget av to pipettespisser som var delt på midten, og satt sammen (figur 2.1). Skivene ble perfundert med oksygenert buffer (25°C) av en peristaltisk pumpe (Ole Dich instrument makers ApS, Danmark) som ble justert til å levere 200 μ l/min.

Oppsamling av perfusjonsbuffer ble utført etter noe ulike skjema avhengig av hvilke forsøk som ble utført. Hver prøve utgjorde bufferløsning samlet over 5 minutter (totalt 1,0 ml). For aktivering av skivene til frisetting av neurotransmittere ble det enten benyttet kjemisk stimulering eller elektrisk felt stimulering. Ved

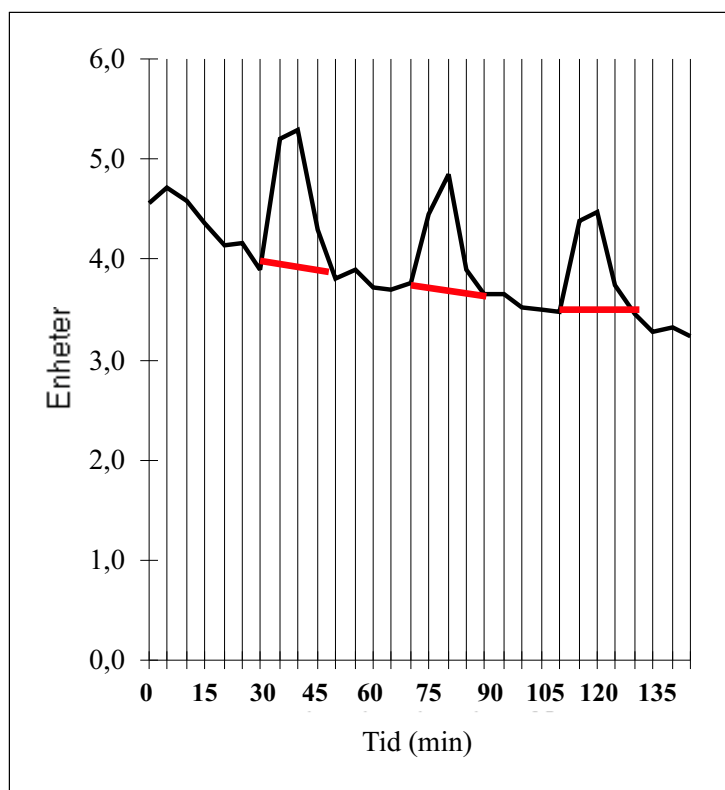


Figur 2.1: Perfusjons oppsett for *in vitro* stimulering (kjemisk og elektrisk) av hippocampuskiver.

kjemisk stimulering ble det benyttet buffer med økende konsentrasjon av K^+ -ioner (5-125 mM KCl, tabell 2.1). Ved elektrisk stimulering ble det benyttet en Grass S88 stimulator (Grass instruments Co. Quincy, USA). Elektrisk depolarisering av nervecellene ble utført ved at et elektrisk felt ble aktivert over 2 elektroder (figur 2.1). Ved stimulering benyttes impulser med varighet på 0,2 ms, spenningen var supramaksimal (70 V) og stimuleringsfrekvensen ble endret i området 0-30 Hz. Både kjemisk og elektrisk stimulering resulterer i depolarisering av nevronene og vil øke frisettingen av ulike neurotransmittere fra synapsene i hippocampuskivene.

2.4.1 ^3H -glutamatfrisetting fra marsvin hippocampuskiver

For å kunne sammenlikne resultatene fra de ulike forsøkene ble frisetting av ^3H -glutamat uttrykt som arealet under toppene over basallinjen, som utgjør spontan frisetting av neurotransmitter (figur 2.2). Første topp etter stimulering i fraksjon **A** ble satt til 100 % og toppene etter stimulering i fraksjon **B** og **C** ble uttrykt som % av topp **A**. Dette bidro til høyere oppløslighet i målingen av ^3H -glutamatfrisetting enn hva som ble oppnådd ved måling av endogen aminosyrefrisetting. Hippocampuskiver fra marsvin ble inkubert 30 minutter i 2 ml normalbuffer tilsatt 20 μl ^3H -glutamat (60 Ci/mmol, 1 mCi/ml) før plassering i perfusjonskammeret. Følgende forsøk ble utført:



Figur 2.2: Frisatt radioaktivitet i perfusat som funksjon av tid. Figuren viser et typisk resultat fra et kontrollforsøk etter frisetting av ^3H -glutamat i fraksjonene **A**, **B** og **C** ved elektrisk stimulering med 20 Hz. Resultatene uttrykkes som funksjon av areal under toppene.

^3H -glutamatfrisetting ved kjemisk og elektrisk stimulering

Forsøket ble utført, som vist i tabell 2.2

Inkubering	3X	Perfundere	K1-K7	A	K8-K14	B	K15-K21	C	K22-K28
30 min	vask	30 min	Sampl. hvert 5 min 00:35	5 min 00:40	Sampl. hvert 5 min 01:15	5 min 01:20	Sampl. hvert 5 min 01:55	5 min 01:00	Sampl. hvert 5 min 02:35

Tabell 2.2: Skjema for inkubering og frisetting av ^3H -glutamat ved kjemisk og elektrisk stimulering. Fraksjon K1-K28 var oppsamling av perfusjonsbuffer fra ustimulerte kontroller. Fraksjon **A**, **B** og **C** ble samlet under kjemisk eller elektrisk stimulering av hippokampusskivene. Nederste linje i figuren angir total tid ved avslutning av de ulike fraksjoninnsamlingene. Forsøket varte totalt i 2 t og 35 min.

Forsøket startet etter en initiell perfusjon i 30 minutter med normalbuffer. Under innsamling av kontrollfraksjonene (K1-K28) ble skivene perfundert med normalbuffer (5 mM KCl). Etter innsamling av syv kontrollfraksjoner (K1-K7) ble skivene stimulert elektrisk eller kjemisk i fraksjon **A**. Stimuleringe i fraksjon

B utgjorde den avleste verdien for frisetting av ^3H -glutamat ved økende kjemisk eller elektrisk stimulering. Stimulering i fraksjon **C** fungerte som en kontroll på at responsen i skiven ikke hadde endret seg drastisk siden forsøkets første stimulering i fraksjon **A**. Stimulering i fraksjon **A** og **C** ble utført ved perfusjon av buffer med KCl-konsentrasjon på 50 mM (kjemisk stimulering), eller ved perfusjon med normalbuffer og elektrisk felt stimulering på 20 Hz. I fraksjon **B** ble skivene stimulert med varierende konsentrasjoner av KCl i buffer (5-125 mM) eller varierende frekvens (0-30 Hz). Alle fraksjonene ble samlet i tellerør som ble tilsatt 10 ml Opti-Fluor og satt til avlesning av β -stråling i scintillasjons-teller (1900 TR, Packard instruments inc., USA). Hippokampusskivene ble homogenisert i 100 μl 20 mM Na-fosfat buffer (pH 7,4) og analysert for totalinnhold av ^3H -glutamat.

Kontroll av Ca^{2+} -avhengighet for ^3H -glutamatfrisetting ved kjemisk og elektrisk stimulering

Forsøket ble utført som vist i tabell 2.3

Inkubering	3X	Perfundere	K1-K7	A	K8-K13	Ca^{2+} lav buffer		K15-K21	C	K22-K28
						K14	B			
60 min	vask	30 min	Sampl. hvert 5 min 00:35	5 min 00:40	Sampl. hvert 5 min 01:10	5 min 01:15	5 min 01:20	Sampl. hvert 5 min 01:55	5 min 01:00	Sampl. hvert 5 min 02:35

Tabell 2.3: Skjema for inkubering og frisetting av ^3H -glutamat ved kjemisk og elektrisk stimulering. Fraksjon K1-K28 var oppsamling av perfusjonsbuffer fra ustimulerte kontroller. Fraksjonene **A**, **B** og **C** ble samlet under kjemisk eller elektrisk stimulering av hippokampusskivene. Under innsamling av fraksjon K14 og **B**, ble hippokampusskivene perfundert med buffer med lav Ca^{2+} . Nederste linje i fi guren angir total tid ved avslutning av ulike fraksjoninnsamlinger. Forsøket varte totalt i 2 t og 35 min.

Forsøket ble gjennomført etter samme prosedyre som beskrevet for ^3H -glutamatfrisetting ved kjemisk og elektrisk stimulering. Hvert forsøk bestod av seks parallelle forsøk. Parallell en og to utgjorde kontrollforsøk. Parallell tre til seks ble perfundert med buffer med lav Ca^{2+} -konsentrasjon (0,1 mM mot 2 mM i parallell en og to) fem minutter før (K14) og under stimulering i fraksjon **B**. Det ble også gjort forsøk der ulike farmaka for inhibering av Ca^{2+} -avhengig glutamatfrisetting ble tilsatt i buffer med lav Ca^{2+} -konsentrasjon; 1 mM ω -conotoxin GVIA (antagonist til nevronale spenningsstyrte Ca^{2+} -kanaler) og 1 mM EGTA (kelator med høy affinitet for Ca^{2+}). Ved kjemisk stimulering ble fraksjonene **A**, **B** og **C** stimulert med 75 mM KCl i buffer. Ved elektrisk stimulering ble 20 Hz benyttet ved alle stimuleringene. Hippokampusskivene ble homogenisert i 100 μl 20 mM Na-fosfat buffer (pH 7,4) og analysert for totalinnhold av ^3H -glutamat.

Effekt av soman på ^3H -glutamatfrisetting fra marsvin hippokampusskiver ved elektrisk stimulering.

Forsøket ble utført som vist i tabell 2.4

Inkubering	3X	Perfundere	K1-K7	A	K8-K13	Soman		K15-K21	C	K22-K28
						K14	B			
60 min	vask	30 min	Sampl. hvert 5 min 00:35	5 min 00:40	Sampl. hvert 5 min 01:10	5 min 01:15	5 min 01:20	Sampl. hvert 5 min 01:55	5 min 01:00	Sampl. hvert 5 min 02:35

Tabell 2.4: Skjema for inkubering og frisetting av ^3H -glutamat ved elektrisk stimulering og perfusjon med $10\ \mu\text{M}$ soman i buffer. Fraksjon K1-K28 var oppsamling av perfusjonsbuffer fra ustimulerte kontroller. Fraksjonene **A**, **B** og **C** ble samlet under elektrisk stimulering av hippokampusskivene. Under innsamling av fraksjon K14 og **B**, ble hippokampusskivene perfundert med buffer tilsatt $10\ \mu\text{M}$ soman. Nederste linje i fi guren angir total tid ved avslutning av ulike fraksjoninnsamlinger. Forsøket varte totalt i 2 t og 35 min.

Forsøket ble gjennomført etter samme prosedyre som beskrevet for ^3H -glutamatfrisetting ved kjemisk og elektrisk stimulering. Hvert forsøk bestod av seks parallelle forsøk. Alle seks paralleler ble elektrisk stimulert i fraksjon **A**, **B** og **C**. Parallell en og to ble perfundet med normalbuffer under hele forsøket (kontrollforsøk). Parallell tre til seks ble perfundet med normalbuffer med $10\ \mu\text{M}$ soman 5 minutter før (K14) og under stimulering i fraksjon **B**. Elektrisk stimulering i fraksjon **A** og **C** ble utført ved 20 Hz. Fraksjon **B** ble stimulert med varierende frekvens (0-30 Hz). Hippokampusskivene ble homogenisert i $100\ \mu\text{l}$ 20 mM Na-fosfat buffer (pH 7,4) og analysert for totalt ^3H -glutamatinnhold, AChE-aktivitet (avsnitt 2.8) og proteininnhold (avsnitt 2.10).

2.4.2 Endogen ACh-frisetting fra marsvin hippokampusskiver

Hippokampusskiver fra marsvin ble inkubert ved romtemperatur i 30 minutter i $1\ \mu\text{M}$ soman i 2 ml normalbuffer for fullstendig inhibering av AChE-aktivitet i vevet før plassering i perfusjonskammer. Forsøket ble utført, som vist i tabell 2.5

Inkubering	3X	Perfundere	Kontroll	X	Kontroll	A	Kontroll	Y	Kontroll	B	Kontroll	Z	Kontroll	C
30 min	vask	60 min	25 min 00:25	5 min 00:30	5 min 00:35	5 min 00:40	25 min 01:05	5 min 01:10	5 min 01:15	5 min 01:20	25 min 01:45	5 min 01:50	5 min 01:55	5 min 02:00

Tabell 2.5: Skjema for inkubering og frisetting av endogen ACh ved elektrisk stimulering. Perfusjonsbuffer i tidsintervallene "Kontroll" ble ikke samlet. Fraksjonene **X**, **Y** og **Z** er oppsamling av perfusjonsbuffer fra ustimulerte kontrollfraksjoner. Fraksjonene **A**, **B** og **C** ble samlet under elektrisk stimulering av hippokampusskivene. Nederste linje i fi guren angir total tid ved avslutning av ulike fraksjoninnsamlinger. Forsøket varte totalt i 2 t.

Forsøket startet etter en initiell perfusjon i 60 minutter med normalbuffer for å redusere den frie konsentrasjonen av soman i vevet. Alle parallellene ble perfundet med normalbuffer gjennom hele forsøket. Fraksjonene **A** og **C** ble

stimulert med 20 Hz, mens fraksjon **B** ble stimulert med varierende frekvens (1-20 Hz). Fraksjonene ble samlet i eppendorfrør som stod på is og satt i fryser for å hindre metabolisering av ACh. Fraksjonene ble frysetørket og løst i 200 μ l destillert vann for å oppkonsentrere ACh innholdet. Etter risting i whirl-mixer og sentrifugering i 5 min ved 11.000 rpm, ble 20 μ l av den oppkonsentrerte supernatanten analysert på HPLC for bestemmelse av ACh innhold (avsnitt 2.6). Hippokampusskivene ble homogenisert i 100 μ l 20 mM Na-fosfat buffer (pH 7,4) og analysert for AChE-aktivitet (avsnitt 2.8) og proteininnhold (avsnitt 2.10).

2.4.3 Effekten av soman på endogen aminosyrefrisetting fra marsvin hippokampusskiver

Det ble gjennomført en serie forsøk for å undersøke om perfusjon av hippokampusskiver med 10 μ M soman i buffer kunne påvirke frisettingen av aminosyrene glutamat, aspartat, GABA, glutamin og alanin under kjemisk og elektrisk stimulering

Fraksjonene ble samlet i eppendorfrør som stod på is og satt i fryser for å hindre metabolisering av aminosyrene. Fraksjonene ble frysetørket og løst i 190 μ l destillert vann og tilsatt 10 μ l med 20 μ M internstandard (DL- α -aminoadipinsyre). Etter sentrifugering ved 11.000 rpm i 5 minutter ble supernatanten tatt ut og frysetørket på nytt. Prøven ble løst i 50 μ l destillert vann og sentrifugert. 35 μ l av den oppkonsentrerte supernatanten ble analysert på HPLC for bestemmelse av aminosyreinnholdet (avsnitt 2.7). Hippokampusskivene ble homogenisert i 100 μ l 20 mM Na-fosfat buffer (pH 7,4) og analysert for AChE-aktivitet (avsnitt 2.8) og proteininnhold (avsnitt 2.10).

Frisetting av endogene aminosyrer ved kjemisk og elektrisk stimulering i fraksjonene A, B og C

Forsøket ble utført som vist i tabell 2.6

Perfundere	10 μ M soman											
	Kontroll	X	Kontroll	A	Kontroll	Y	Kontroll	B	Kontroll	Z	Kontroll	C
30 min	25 min	5 min	5 min	5 min	25 min	5 min	5 min	5 min	25 min	5 min	5 min	5 min
	00:25	00:30	00:35	00:40	01:05	01:10	01:15	01:20	01:45	01:50	01:55	02:00

Tabell 2.6: Skjema for frisetting av endogene aminosyrer ved kjemisk og elektrisk stimulering og perfusjon med 10 μ M soman i buffer. Perfusjonsbuffer i tidsintervallene "Kontroll" ble ikke samlet. Fraksjonene **X**, **Y** og **Z** er oppsamling av perfusjonsbuffer fra ustimulerte kontrollfraksjoner. Fraksjonene **A**, **B** og **C** ble samlet under kjemisk eller elektrisk stimulering av hippokampusskivene. Hippokampusskivene ble perfundert av buffer tilsatt 10 μ M soman 5 min før og under innsamlingen av fraksjon **B**. Nederste linje i fi guren angir total tid ved avslutning av ulike fraksjoninnsamlinger. Forsøket varte totalt i 2 t.

Forsøket startet etter initiell perfusjon i 30 minutter med normalbuffer. Hvert forsøk bestod av 6 parallelle forsøk. Parallell en og to utgjorde kontrollforsøk og ble perfundert med KCl-buffer uten soman i fraksjonen **B**. Parallell tre til seks ble perfundert av buffer med 10 μM soman 5 minutter før og under stimulering i fraksjon **B**. Stimulering i fraksjonene **A** og **C** utgjorde kontrollstimuleringer før og etter soman perfusjon. Ved kjemisk stimulering ble fraksjonene **A** og **C** stimulert med 50 mM KCl, mens fraksjon **B** ble stimulert med varierende konsentrasjon av KCl (25-100 mM) i perfusjonsbuffer. Ved elektrisk stimulering ble fraksjonene **A** og **C** stimulert med 20 Hz, mens fraksjon **B** ble stimulert med varierende frekvens (1-20 Hz).

Frisetting av endogene aminosyrer ved kjemisk stimulering kun i fraksjon A

Forsøket ble utført som vist i tabell 2.7.

Kontroll		10 μM soman	
X	Kontroll	A	
25 min	5 min	5min	5min
00:25	00:30	0:35	00:40

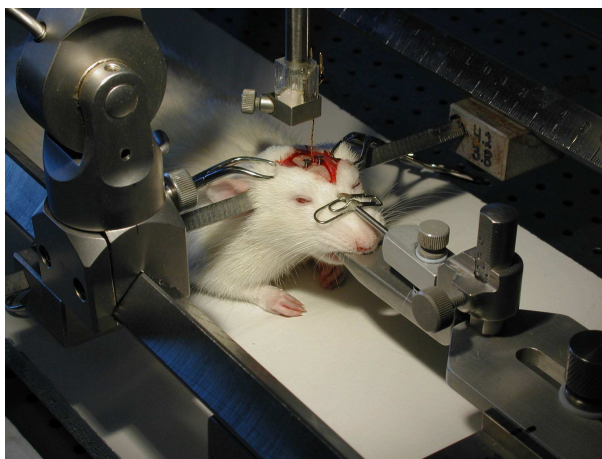
Tabell 2.7: Skjema for frisetting av endogene aminosyrer ved kjemisk stimulering og perfusjon med 10 μM soman i buffer. Perfusjonsbuffer i tidsintervallene "Kontroll" ble ikke samlet. Fraksjon **X** er oppsamling av perfusjonsbuffer fra ustimulerte kontrollfraksjoner. Fraksjon **A** ble samlet under kjemisk stimulering. Hippokampusskivene ble perfundert av buffer tilsatt 10 μM soman, 5 minutter før og under innsamling av fraksjon **A**. Nederste linje i figuren angir total tid ved avslutning av ulike fraksjoninnsamlinger. Forsøket varte totalt i 40 min.

Hvert forsøk bestod av 6 paralleller. Parallell en og to utgjorde kontrollforsøk og ble perfundert med KCl-buffer uten soman i fraksjon **A**. Parallell tre til seks ble perfundert med 10 μM soman 5 minutter før og under stimulering i **A**. Kjemisk stimulering i **A** ble utført med varierende konsentrasjon av KCl (5-100 mM) i perfusjonsbuffer.

2.5 *In vivo* mikroinjeksjon av soman i rottehippokampus

In vivo mikroinjeksjon i hippokampus ble utført på 17 wistar hann rotter (340-380 g). Dyrene ble operert under kirurgisk anestesi (4,5 mg/kg diazepam, 0,28 mg/kg fentanyl og 0,9 mg/kg fluanison, injisert intraperitonealt) med hodet festet i stereotakse (figur 2.3). Bipolar elektrode som registrerte elektrisk feltpotensial ble implantert i korncellelaget i GD og pyramidecellelaget i CA1 (3,2 mm bak bregma, 2 mm lateralt fra midtlinjen og 3 mm dybde fra dura mater). Elektrodene

var laget av to sølvvaiere (300 μM i diameter) isolert helt frem til spissen og loddet til hver sin "male" gullplugg. Elektrodene ble tvunnet sammen og kuttet slik at elektrodespissen i CA1 var 0,7 mm kortere en elektrodespissen i GD og implantert med 1,5 mm mellomrom fra hverandre. Elektrodene ble implantert med den lengste elektrodespissen posterior og i 25° vinkel fra midtlinjen til anterior elektrode. I tillegg ble en guidekanyle av G35 sprøytespiss (0,5 mm ytre diameter, 11 mm lengde) implantert i korncellelaget i GD i høyre hippokampus (5 mm bak bregma, 3,5 mm lateralt fra midtlinjen og 3 mm dybde fra dura mater). Elektrodekontaktene ble festet i plastbrikker som ble støpt på plass i skalletaket med Durelon sement. Dyrene hadde en recoveryperiode på minimum 7 dager før start av forsøket.



Figur 2.3: Rotte i stereotakse under implantering av bipolar elektrode.

Feltpotensial EEG i hippokampus ble registrert gjennom hele forsøket v.h.a en polygraf med papirutskrift (Grass model 7P5A, Grass instrument, Co). Registrering ble foretatt ved unipolar registrering fra korncellelaget i GD og pyramidecellelaget i CA1. Ved forsøkets start ble basal thetaamplitude og frekvens (4-12 Hz) ved ulik adferd, samt "Large Irregular Amplitude" (LIA) bestemt før mikroinjeksjon av 1 μl 0,9 % NaCl (kontroll, n=6), 1 nmol soman løst i 1 μl 0,9 % NaCl (n=9), eller 10 nmol soman løst i 1 μl 0,9 % NaCl (n=2), via en G30 sprøytespiss (0,3 mm ytre diameter, 12 mm lang) gjennom guidekanylen. Injeksjonshastigheten på CMA/100 mikropumpen (Carnegie medicin AB, Sverige) var 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ og injeksjonsnålen ble stående i 1 minutt etter injeksjonen var fullført før den ble fjernet fra guidekanylen. Basal thetaamplitude og LIA før injeksjon ble definert som 100 % og avlesning av amplituder etter injeksjon ble bestemt som prosent av basalamplitude. Rottene måtte utføre samme bevegelse før og etter injeksjon og utslagene måtte være tydelige og klare på EEG utskriften for at avlesningen skulle

bli godkjent. En avlesning innenfor hvert tidsintervall ble registrert. Thetaamplitude og frekvens ble avlest enten når rottene stod på bakbena, eller ved sammenhengende gange i mer enn 3 sekunder. LIA-amplitude ble bestemt når rottene stod helt i ro. Avlesning ble utført i 45 minutter etter injeksjon, før rottene ble avlivet ved dekapitering. Hjernen ble dissekert ut og analysene utført og gruppert som vist i tabell 2.8.

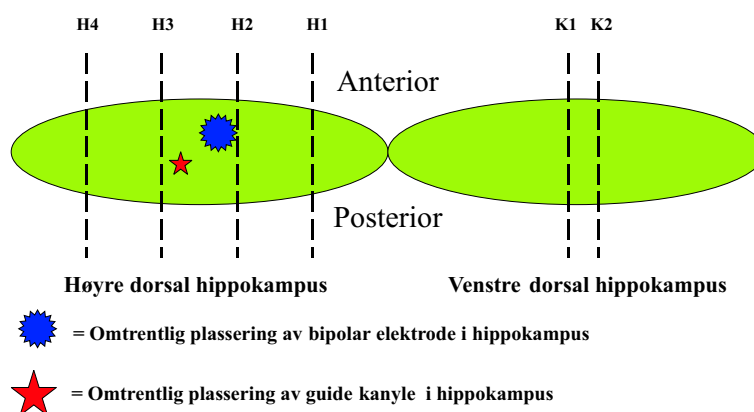
	Kontroll 0,9 % NaCl (n=6)	Soman 1 nmol (n=9)	Soman 10 nmol (n=2)	Bestemmelse av følgende parametre i hippokampus hos soman injiserte dyr og kontrolldyr
Antall	1	1	-	Histokjemisk farging
dyr	5	8	2	AChE-aktivitet
(n)	4	5	2	Frisetting av ACh
	4	5	2	Frisetting av aminosyrer
	4	5	2	Totalinnhold av aminosyrer

Tabell 2.8: Analyser utført på hippokampusskiver fra rotter etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 nmol og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl, i hippokampus.

For alle analysene unntatt histokjemisk farging (beskrevet i avsnitt 2.9), ble hippokampus dissekert frem, og skåret i 400 μ m tykke skiver. Det ble tatt ut seks prøver etter hvert forsøk (figur 2.4). Hver prøve bestod av to hippokampusskiver skåret rett etter hverandre på en mikrotom. To prøver ble dissekert fra midten på venstre dorsal hippokampus og fungerte som intern kontroll (V.H) for å undersøke en eventuell spredning av soman fra injeksjonene i høyre hippokampus. I høyre hippokampus ble det skåret kontinuerlig snitt sentralt fra midtlinjen mellom venstre og høyre dorsal hippokampus, distalt til enden av høyre dorsale hippokampus. Mellom hver tredje til fjerde snitt ble det tatt ut to skiver som utgjør en prøve, totalt fire prøver (H1-H4). De fire prøvene fra høyre sides hippokampus i hvert forsøk representerer derfor hippokampusskiver i ulik avstand fra injeksjonsstedet, men med standardisert innbyrdes avstand fra hverandre.

Skivene ble plassert i nedkjølt oksygenert normalbuffer øyeblikkelig etter disseksjon, og plassert to og to i hver av de seks perfusjonskammerene. Stimulering og innsamling av fraksjoner ble utført som vist i tabell 2.9.

Hvert forsøk bestod av 6 paralleller. Parallell en og to var kontrollprøver fra venstre dorsal hippokampus (V.H). Parallell tre til seks var hippokampusskiver fra høyre dorsal hippokampus. Kjemisk stimulering i fraksjon A ble holdt konstant på 66 mM KCl i perfusjonsbuffer. Fraksjonene ble samlet i eppendorfrør som stod på is og satt i fryser. Fraksjonene ble frysetørket og løst i 190 μ l destillert vann og tilsatt 10 μ l 20 μ M DL- α -aminoacidipinsyre. Etter sentrifugering ble 25 μ l av supernatanten analysert for innhold av ACh (avsnitt 2.6). Resterende superna-



Figur 2.4: Figuren illustrerer venstre og høyre dorsal hippocampus sett ovenfra etter disseksjon fra rottehjerne. Figuren viser uttak av skiver fra rotte hippocampus mikroinjisert med 1 nmol soman, 10 nmol soman eller 0,9 % NaCl. Fire prøver med lik avstand over hele høyre dorsal hippocampus ble tatt ut (H1-H4). To kontrollprøver ble tatt fra midten på venstre dorsal hippocampus (K1 og K2). Figuren viser også penetreringsområdet for bipolar elektroder og guidekanyle i hippocampus.

Kontroll	X	Kontroll	A
25 min	5 min	5min	5min
00:25	00:30	0:35	00:40

Tabell 2.9: Skjema for *in vitro* frisetting av endogene aminosyrer og ACh ved kjemisk stimulering fra rotte hippocampusskiver, etter *in vivo* mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl med/uten soman. Perfusjonsbuffer i tidsintervallene "Kontroll" ble ikke samlet. Fraksjon X, er oppsamling av perfusjonsbuffer fra ustimulert kontroll. Fraksjon A ble samlet under kjemisk stimulering. Nederste linje i figuren angir total tid under ved avslutning av ulike fraksjoninnsamlinger. Forsøket varte totalt i 40 min

tant ble frysetørket og løst i 50 μ l. Prøvene ble sentrifugert og 35 μ l av det oppkonsentrerte perfusatet analysert for innhold av aminosyrer på HPLC (avsnitt 2.7). Hippokampusskivene ble homogenisert i 150 μ l 20 mM Na-fosfat buffer (pH 7,4) og analysert for totalinnhold av aminosyrer, AChE-aktivitet (avsnitt 2.8) og proteininnhold (avsnitt 2.10).

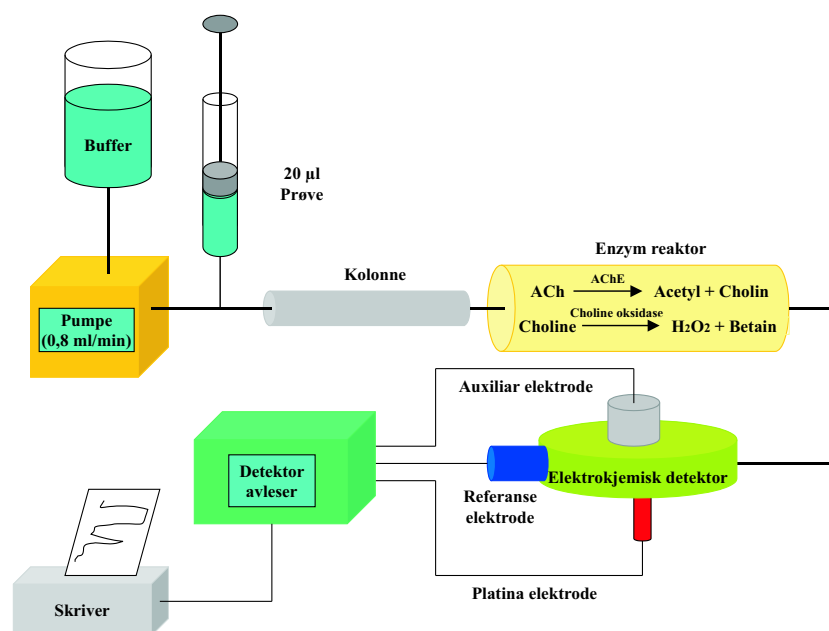
2.6 ACh-analyse

For måling av endogen ACh ble det benyttet HPLC med elektrokjemisk deteksjon, beskrevet av Stadler & Nesselhutt (1986).

HPLC- buffer:

Na ₂ HPO ₄	0,1 M
NaH ₂ PO ₄	0,1 M
TMA	5 mM
EDTA	0,1 mM

En HPLC-pumpe (Waters 510) leverte et konstant volum på 0,8 ml/min HPLC-buffer gjennom systemet. Totalt injisert prøveløp var 20 µl av de oppkonsentrerte fraksjonene. I kolonnen (Biometra, Biomed analytik GmbH, Tyskland) separeres kolin og acetylkolin, som passerer gjennom en enzymreaktor (Biometra) med immobilisert acetylkolinesterase og kolin oksidase (figur 2.5). ACh blir i analysen hydrolysert til kolin og acetat. Kolin ble viderer omdannet av kolin oksidase til H₂O₂ og betain før deteksjon av H₂O₂ i den elektrokjemiske detektoren (JN1 fra BCMA, Göttingen, Tyskland). Konsentrasjonen av H₂O₂ er derved direkte korrelert til konsentrasjonen av ACh i prøven.



Figur 2.5: Skissen viser HPLC med elektrokjemisk detektor for bestemmelse av ACh.

For bestemmelse av mengde ACh i prøven ble detektoren kalibrert med en eksterntstandard med kjent mengde ACh (2 pmol). Mengde ACh ble beregnet etter formel (2.1).

$$\text{ACh frisatt}(\text{pmol}/\text{mg}/\text{min}) = \frac{\text{ACh i prøve}(\text{pmol}) \times \text{Totalt prøvevol}(\mu\text{l})}{\text{Prøve vol}(\mu\text{l}) \times \text{Protein}(\text{mg}) \times \text{Tid fra innsamling}(\text{min})} \quad (2.1)$$

2.7 Aminosyre analyse

Frisetting og totalinnhold av aminosyrer i hippokampusskiver ble analysert på omvendt fase HPLC med fluorimetrisk deteksjon og auto-sampler. Aminosyrene fluoriserer ikke i seg selv og måtte derfor derivatiseres med ortho-phthalaldehyd (OPA) og 2-merkaptoetanol. OPA og 2-merkaptoetanol danner fluoriserende derivater med primære aminogrupeer.

Kromatografi

Instrumenter

Kromatograf:	Hewlett Packard 1050
Detektor:	CMA/280 Fluorescens detektor
Integrator:	Hewlett Packard 35900E

Kolonne

Cromospher CT8	(Chrompack, Instrumentteknikk A.S, Norge)
Lengde:	250 mm
Indre diameter:	3 mm
Partikkelstørrelse:	5 μm

Det ble benyttet gradient eluering, og den mobile fasen bestod av:

Fase A:

5 %	Fosfatbuffer (pH 5,4)
15 %	Metanol

Fase B:

100 %	Metanol
-------	---------

Gradienten startet med 90 % fosfatbuffer og 10 % metanol, endret seg gradvis til 25 % fosfatbuffer og 75 % metanol over 30 minutter, for så å øke til 90 %

fosfatbuffer og 10 % metanol.

OPA-reagens

0,1 g o-phtaldialdehyd
 1,0 ml metanol
 100 µl 2-mercaptoetanol
 4,0 ml Dobbel dest. H₂O
 5,0 ml 0,8 M H₃BO₃, pH 12

Stoppereagens

2,0 M NaH₂PO₄

Aminosyrene ble derivatisert med OPA-reagens før injeksjon på kolonnen. 10 µl OPA-reagens ble mikset med 35 µl prøve i 1 minutt før 5 µl stoppreagens ble tilsatt. Stoppereagens senker pH og stopper bindingen av OPA til primære aminer. Totalt prøvevolum på 45 µl ble injisert på kolonnen. Eksternstandard bestod av 1 µM løsning av aminosyrene: glutation, aspartat, glutamat, glutamin, alanin, taurin, GABA og DL- α -aminoadipinsyre. Eksternstandard ble injisert mellom ca hver 6 prøve for å bestemme retensjonstiden og responsfaktorene for de enkelte aminosyrene. Responsfaktoren for de enkelte aminosyrene, ble bestemt av forholdet mellom arealet av aminosyren og α -aminoadipinsyre i den eksterne standarden. Internstandard som ble benyttet var DL- α -aminoadipinsyre. Mengden av de ulike aminosyrene (AS) i prøvene ble beregnet som vist i formel 2.2, ved å dividere arealet under kurven i kromatogrammet for de enkelte aminosyrene i prøven, med arealet av internstandard med kjent konsentrasjon. Multiplisering med responsfaktor ble utført for å korrigere for varierende utslag på detektoren for de ulike aminosyrene.

$$\text{Mengde AS(nmol)} = \frac{\text{Areal AS} \times \text{Intern Std(nmol)} \times \text{Responsfaktor}}{\text{Areal Intern Std}} \quad (2.2)$$

Total frisetting av aminosyrer fra hippokampusskivene ble beregnet som vist i formel 2.3. Aminosyremengden fra formel 2.2, multipliseres med totalt prøvevolum og divideres med prøvevolumet (35 µl), for å bestemme den totale aminosyremengden i perfusatet. Ved å dividere på tiden for perfusat innsamling (5 min) og proteinmengde (mg) i hippokampusskivene ble frisettingen av aminosyrer per mg protein og minutt bestemt.

$$\text{AS frisatt(pmol/mg/min)} = \frac{\text{AS i prøve(nmol)} \times \text{Totalt prøvevol}(\mu\text{l}) \times 1000 \text{ pmol/nmol}}{\text{Prøve vol}(\mu\text{l}) \times \text{Protein(mg)} \times \text{Tid frak innsaml}(\text{min})} \quad (2.3)$$

For *in vivo* forsøkets analyse av endogen aminosyrefrisetting (avsnitt 2.5) multipliseres verdien for frisatt aminosyre med $\frac{200 \mu\text{l}}{175 \mu\text{l}}$ etter som 25 μl fjernes for analyse av ACh, fra 200 μl totalt prøve volum etter første frysetørking. I utregningen av totalt aminosyreinnhold i hippokampusskivene fjernes tidsfaktoren for perfusat innsamling og svaret får dermed enheten (pmol/mg).

Proteinfelling i hippokampushomogenat

Før hippokampushomogenat fra *in vivo* forsøket ble analysert for totalt aminosyreinnhold på HPLC måtte alle proteiner fjernes ved proteinfelling.

Fellingsløsning:

Perklorsyre	3,5 %
NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	5 mM
α -AAA	1 μM

30 μl homogenat ble tilsatt 1 ml fellingsløsning. Løsningen ble sentrifugert i 5 minutter ved 12.000 rpm og supernatanten ble overført til 15 ml sentrifugerør. Løsningen ble pH-justert til mellom 6,5 og 7,5 med en KOH-løsning. Løsningen ble sentrifugert på nytt, og supernatanten overført til 2 ml eppendorfrør og frysetørket. Prøven løses i 200 μl destillert vann, sentrifugeres og 35 μl av supernatanten ble analysert på HPLC for bestemmelse av aminosyreinnhold.

2.8 Måling av AChE- og BuChE-aktivitet

For å forsikre at AChE- og BuChE-aktiviteten i hippokampusskivene var tilstrekkelig inhibert (80-95 %) ved perfusjon og ved preinkubering med soman, ble AChE- og BuChE-aktiviteten i skivene målt. For analyse av kolinesteraseaktivitet ble det benyttet en radiokjemisk metode beskrevet av Sterri & Fonnum (1978). Homogenat av hippokampus ble inkubert med et substrat som inneholdt [¹⁴C]-ACh i 15 min. Reaksjonen ble stoppet med 10 mM Na-fosfat buffer (pH 7,4) og graden av kolinesterase hemming ble bestemt ved sammenlikning med blindprøver uten homogenat. For bestemmelse av AChE-aktivitet ble prøvene inkubert med ethopropazin tilsatt i substratet for å inhibere BuChE. Aktiviteten ble beregnet ut fra proteininnholdet i hippokampusskivene og inkubasjonstiden for substratet med ¹⁴C-ACh (15 min)(AChE-aktivitet/mg protein/minutt).

Substrat

¹⁴ C-AChE	10 µCi/ml	10 µl
Acetylkolin iodide	7,8 mM	250 µl
Na-fosfat buffer pH 7,4	20 mM	500 µl

Substrat med ethopropazin

¹⁴ C-AChE	10 µCi/ml	10 µl
Acetylkolin iodide	7,8 mM	250 µl
Ethopropazin	0,3 mM	500 µl

TOAP i isoamylalkohol

Ortho-fosforsyre	0,25 M	35,7 ml tilsettes i 2 liter vann
TOA	0,2 M	70,7 g i 1 liter isoamylalkohol

TOAP (Tri-n-Octyl-Amine-Phosphate) ble blandet minst 1 dag i forveien. 1 del TOA (Tri-n-Octyl-Amine) og 2 deler fosforsyre ble ristet godt, og stod i minst 1 døgn slik at det ble etablert en organiskfase og en vannfase. Den øverste fasen var TOAP i isoamylalkohol.

For analyse av enzymaktiviteten ble 6 paralleller for hver prøve benyttet hvorav, 3 paralleller ble brukt for bestemmelse av total kolinesteraseaktivitet og 3 for bestemmelse av AChE-aktivitet. I tillegg ble blindprøver analysert. Hver parallell ble tilsatt 10 µl substratløsning (3 med og 3 uten ethopropazin). Blindprøvene ble tilsatt 10 µl 20 mM Na-fosfat buffer og de øvrige prøvene ble tilsatt 10 µl hippokampushomogenat. Etter risting i whirl-mixer, ble prøvene inkubert i 15 minutter i vannbad (30 °C). Reaksjonen ble stoppet ved overføring av reaksjonsrøret til tellerør, og iskald 1 ml 0,1 M Na-fosfat buffer (pH 7,4) ble sprøytet ned i reaksjonsrørene. Deretter ble 10 ml tellvæske og 4 ml TOAP tilsatt hvert tellerør, og ¹⁴C-acetyl fra hydrolysert ACh diffunderer over i den organiske fasen. Prøvene ble satt til telling for registrering av β-stråling.

2.9 Histokjemisk farging av hjernesliver

For å påvise kolinerge synapsers utbredelse i ulike områder av hippokampus og inhibering av AChE i ulike hjerneområder etter *in vivo* mikroinjeksjon av soman, ble det benyttet en metode for histokjemisk farging av AChE i hjernesliver beskrevet første gang av Koelle & Fridenwald (1949) og senere modifisert av Shute & Lewis (1961). Påvisning av AChE i hjernevev er en god indikasjon på lokalisering av kolinerge synapser.

Løsninger:**Na-Acetatbuffer 200 mM**

Na-acetat	200 mM	ca 280 ml
-----------	--------	-----------

Iseddik	200 mM	ca 120 ml
---------	--------	-----------

Blandes sammen til pH 5,0

Stamløsning

Na-acetat buffer		125 ml
------------------	--	--------

Glycin	64 mM	125 ml
--------	-------	--------

CuSO ₄	8 mM	250 ml
-------------------	------	--------

pH justeres til 5,0

Inkubasjonsmedium

Acetylthiokolinjodid	175 mg
----------------------	--------

Ethopropazin	9 mg
--------------	------

Stamløsning	150 ml
-------------	--------

Na₂S 1%

1,0 g Na₂S løses i 100 ml H₂O og pH justeres til 7,2.

Dag 1: Dyret ble avlivet ved dekapitering. Skalletaket ble åpnet med saks og hjernen tatt ut. Horisontalsnitt av marsvinhjerne ble utført for å dokumentere tilstedeværelse av kolinerge fibre til hippokampus. For rottene i mikroinjeksjonsforsøket ble koronalsnitt av en hjerne fra kontrollgruppen (mikroinjisert 0,9 % NaCl) sammenliknet med koronalsnitt av en hjerne fra rotte mikroinjisert med 1 nmol soman i hippokampus for å bekrefte i hvor stor grad soman hadde diffundert fra injeksjonsstedet. Hjernene ble nedfrost med CO₂ og oppbevart i fryser før snitting i kryostat. I kryostaten ble hjernesnitt på 40 μm skåret til. Snittene ble tørket ved romtemperatur i minst 1 time og satt til inkubering i inkubasjonsmediumet over natten. Ethopropazin binder seg til BuChE og hemmer disse slik at binding av acetylthiokolinjodid blir spesifikk til AChE.

Dag 2: Snittene ble skyllet i destillert H₂O og farget i 1 % Na₂S til brun farge (ca 1 min). Snittene ble så skyllet noen ganger i dest H₂O og fiksert i 3,5 % formalin over natten.

Dag 3: Snittene ble skyllet i destillert H₂O for å fjerne all formalin. Dehydrering i økende % alkoholløsning og histoclear ble utført etter følgende skjema:

50% Alkohol	x 1 skål
70% Alkohol	x 2 skåler
96% Alkohol	x 2 skåler
100% Alkohol	x 2 skåler
Histoclear	x 2 skåler

Etter dehydrering ble snittene tilsatt en dråpe histomount og ferdig montert med dekkglass.

2.10 Proteinbestemmelse

Proteininnholdet i hippokampusskivene ble målt etter metode beskrevet av Lowry *et al.* (1951). Metoden er basert på en to-steps fargereaksjon mellom fosfomolybdationer og kobberbehandlede proteiner i basisk miljø.

Følgende reagenser ble tillaget:

A: 2% Na₂CO₃ i 0,1 M NaOH

B: 0,5% CuSO₄·5H₂O

C: 1 % K(Na)tartrat i destillert vann

Stoppereagens: 1 del Folin-Ciocalteu reagens + 1 del destillert vann

Bruksreagens: 1 del B + 1 del C + 98 deler A

Standardprotein: Bovint serum albumine (BSA) (0,5 mg/ml)

200 µl destillert vann ble tilsatt i hvert reagensrør. Tre paralleller for hver standard og homogenat ble analysert. Standardkurve med BSA ble etablert ut i fra måling av proteinmengde lik 10, 15 20 og 25 µg protein i separate rør. 5 µl hippokampushomogenat ble tilsatt til separate prøverør. Alle rørene ble inkubert med 1 ml bruksreagens i 10 min, før 100 µl stoppreagens ble tilsatt. Etter minimum 30 minutter ble absorbansen i hver prøve avlest ved 750 nm i et UV-1201 spektrofotometer med gjennomstrømningskyvette (Shimadzu corporation, Japan). Standardprøvene ble benyttet til å bestemme standardkurven. Totalt proteininnhold i skivene ble beregnet etter formel 2.4:

$$\text{Proteinmengde(mg)} = \frac{\text{Protein prøve}(\mu\text{g}) \times \text{Totalt homogenat vol}(\mu\text{l})}{\text{Prøve vol}(\mu\text{l}) \times 1000 \mu\text{g/mg}} \quad (2.4)$$

2.11 Statistikk

Alle data er presentert som gjennomsnitt \pm SD og ble bearbeidet og fremstilt grafisk ved bruk av Graph Pad Prism (versjon 3.0). For å sammenlikne to behandlinger ble Student's t-test benyttet. For å sammenlikne flere grupper med en kontroll ble det anvendt en-veis variasjonsanalyse (one-way ANOVA) med Dunnett's test som post-test. Ettersom de fleste forsøkene og analysene var svært tidkrevende, ble bare noen få forsøk gjentatt tilstrekkelig antall ganger for å utføre sikre statistiske analyser. Student's t-test og en-veis variasjonsanalyse ble alikevel gjennomført selv om antall forsøk/registreringer kunne være så lav som $n=2$. Forskjeller ble vurdert som statistisk signifikante når $p < 0.05$ (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). Ikke-lineær regresjonsanalyse ble benyttet på resultatene fra frisetting av ^3H -glutamat og endogen ACh.

Kapittel 3

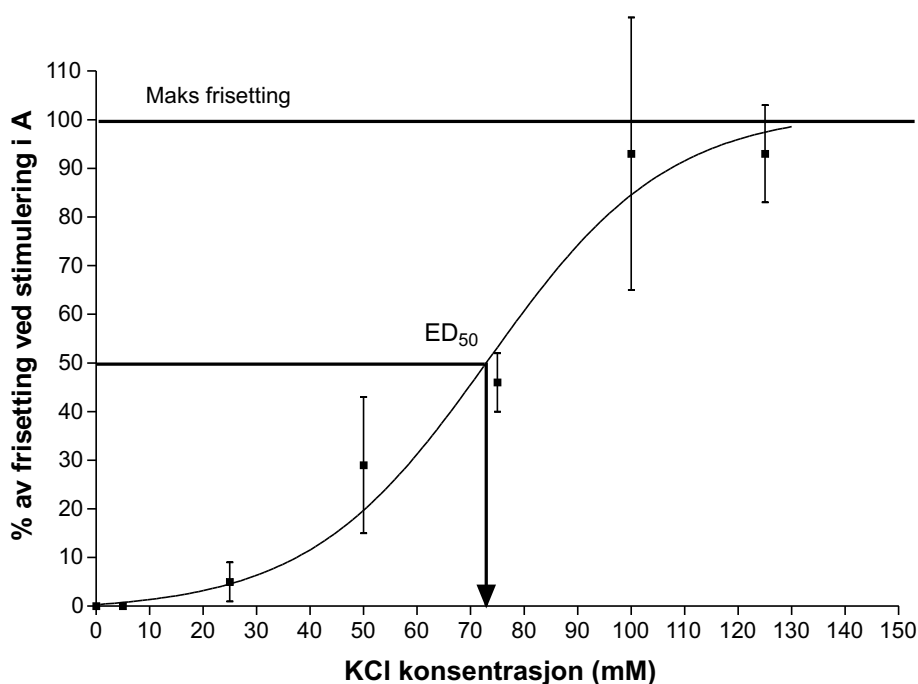
Resultater

3.1 *In vitro* frisetting av ^3H -glutamat fra marsvin hippokampusskiver

I denne oppgaven ønsket vi å undersøke effekter av soman eksponering *in vitro* på hippokampus og utvikle dette som modell for å studere betydningen av glutamat i skadeutviklingen ved somanforgiftning. For å etablere modellen ble det gjennomført en rekke eksperimenter for å undersøke effekten av både kjemisk (KCl) og elektrisk stimulering på frisettingen av ^3H -glutamat fra marsvin hippokampusskiver. Depolarisering antas å være nødvendig for å kunne registrere en eventuell endring i frisettingen av ^3H -glutamat fra hippokampusskiver eksponert for soman. Videre var det viktig å få bestemt hvilken stimuleringsintensitet som gir 50 % av maksimal frisetting (ED_{50}). Ved stimulering med en intensitet tilsvarende ED_{50} kan vi observere både en eventuell økning eller reduksjon i ^3H -glutamatfrisetting som følge av soman eksponering. Måling av frisatt ^3H -glutamat ble gjennomført som beskrevet i avsnitt 2.4.1.

3.1.1 ^3H -glutamatfrisetting ved kjemisk stimulering

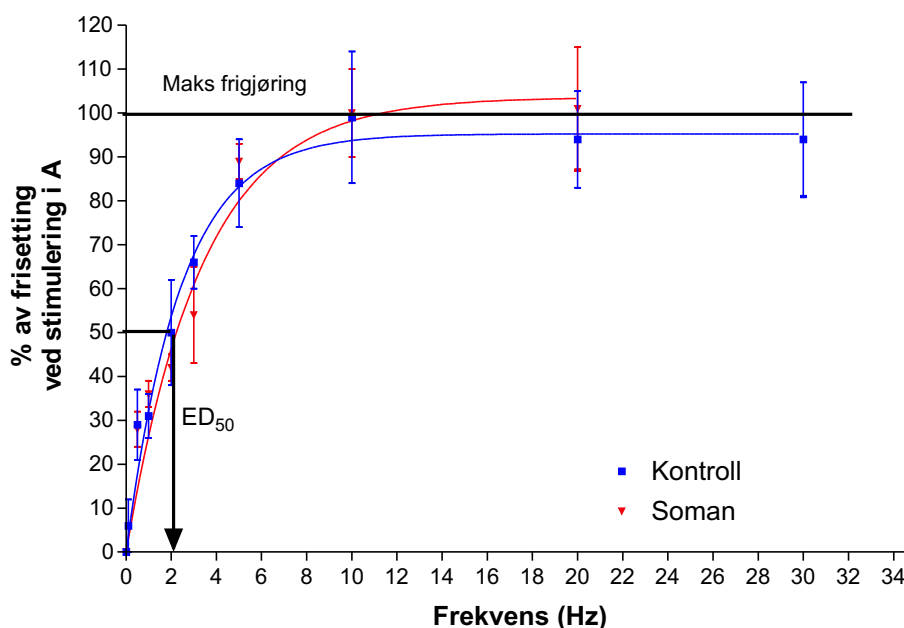
Figur 3.1 viser frisetting av ^3H -glutamat ved stimulering med økende KCl-konsentrasjon i buffer i fraksjon **B**. Frisettingen økte gradvis fra 0 % ved perfusjon med normalbuffer (5 mM KCl) til en maksimal frisetting ved perfusjon med 100 mM KCl. Konsentrasjonen av KCl som gir 50 % av maksimal respons (ED_{50}), ligger i konsentrasjonsområdet fra 70 til 75 mM KCl.



Figur 3.1: Frisetting av ^3H -glutamat fra marsvin hippokampusskiver ved økende kjemisk stimulering i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som % av frisetting etter stimulering i fraksjon **A** ($\bar{x} \pm \text{SD}$). $n=8$ for 5 og 50 mM, $n=2$ for 25 mM, og $n=4$ for 75, 100 og 125 mM.

3.1.2 ^3H -glutamatfrisetting ved elektrisk stimulering og effekt av soman

Figur 3.2 viser frisetting av ^3H -glutamat ved elektrisk stimulering og perfusjon med normalbuffer med og uten soman i fraksjon **B**. Frisettingen økte gradvis fra 0 % uten stimulering (basalfrisetting) til maksimal frisetting ved stimulering med 10 Hz. Ved perfusjon med soman under elektrisk stimulering i fraksjon **B** ble det ikke registrert noen signifikant endring i frisetting av ^3H -glutamat i forhold til kontrollforsøk for hver av stimuleringsfrekvensene (0-20 Hz). Dette indikerer at soman ikke påvirker frisetting av ^3H -glutamat fra hippokampusskivene under elektrisk stimulering. Stimuleringsfrekvensen som gir 50 % av maksimal frisetting (ED_{50}) er ca 2 Hz for både kontrollforsøk og forsøk hvor hippokampusskiver ble perfundert med soman. Tabell 3.1 viser frisetting av ^3H -glutamat ved elektrisk stimulering med 20 Hz i fraksjonene **A** og **C**. Det ble ikke registrert signifikante endringer i frisettingen av ^3H -glutamat ved elektrisk stimulering med 20 Hz i fraksjon **C** mellom kontrollforsøk og i forsøk hvor hippokampusskiver hadde blitt perfundert med 10 μM soman i fraksjon **B**.



Figur 3.2: Frisetting av ^3H -glutamat fra hippokampusskiver perfundert med normalbuffer (kontroll), og normalbuffer tilsatt $10 \mu\text{M}$ soman i fraksjon **B** (soman). Verdiene er presentert som % av frisettingen etter stimulering i fraksjon **A** ($\bar{x} \pm \text{SD}$). 0 Hz (kontroll: $n=2$ og soman: $n=5$), 0,1 Hz (kontroll: $n=2$ og soman: $n=0$), 0,5 Hz (kontroll: $n=3$ og soman: $n=5$), 1 Hz (kontroll: $n=6$ og soman: $n=4$), 2 Hz og 3 Hz (kontroll: $n=2$ og soman: $n=2$), 5 Hz, 10 og 20 Hz (kontroll: $n=4$ og kontroll: $n=4$) og 30 Hz (kontroll: $n=2$ og soman: $n=0$).

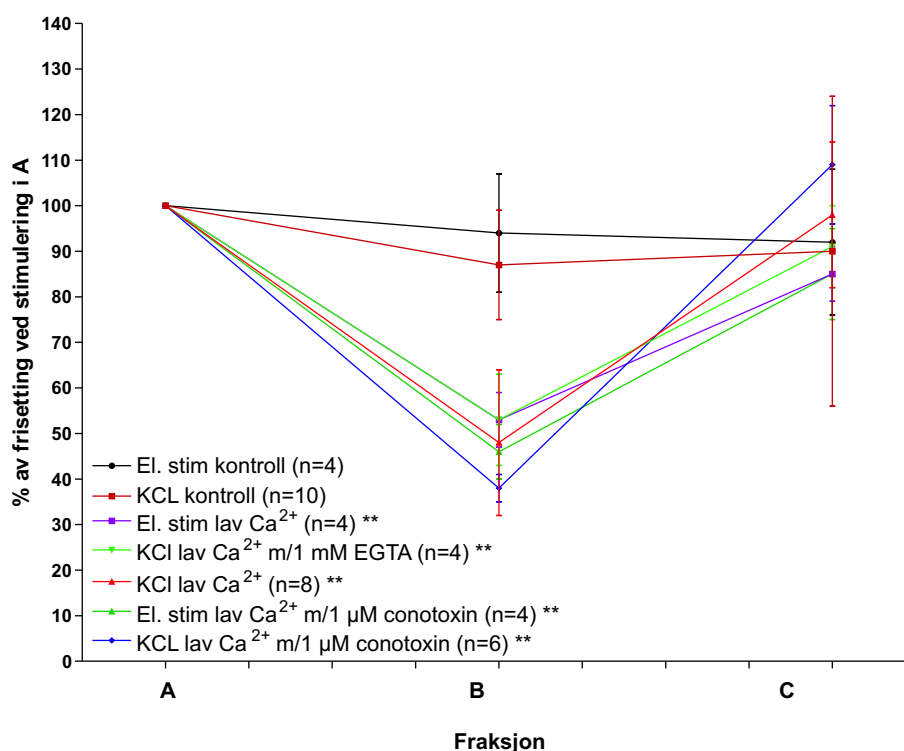
Frisatt ^3H -glu ved stimulering av hippokampusskiver

Prøve	Kontroll	$10 \mu\text{M}$ soman
A	100 ± 0	100 ± 0
B	-	-
C	108 ± 23	104 ± 20

Tabell 3.1: Frisetting av ^3H -glutamat fra marsvin hippokampusskiver perfundert med normalbuffer (kontroll) eller normalbuffer tilsatt $10 \mu\text{M}$ soman i fraksjon **B**. Skivene er elektrisk stimulert i fraksjonene **A**, **B** og **C**. Fraksjonene **A** og **C** er stimulert med 20 Hz, mens fraksjon **B** er stimulert i frekvensområdet 0-30 Hz (se figur 3.2). Verdiene er presentert som % av frisettingen etter stimulering i fraksjon **A** ($\bar{x} \pm \text{SD}$). $n=24$ for alle verdiene i **A** og **C**.

3.1.3 Ca^{2+} -avhengig frisetting av ^3H -glutamat ved kjemisk og elektrisk stimulering

For å undersøke hvor stor andel av den totale ^3H -glutamatfrisettingen som ble frisatt fra et nevronalt lager av neurotransmitter, ble skivene stimulert kjemisk og elektrisk under perfusjon av buffer med lav Ca^{2+} (0,1 mM) som vist i figur 3.3.



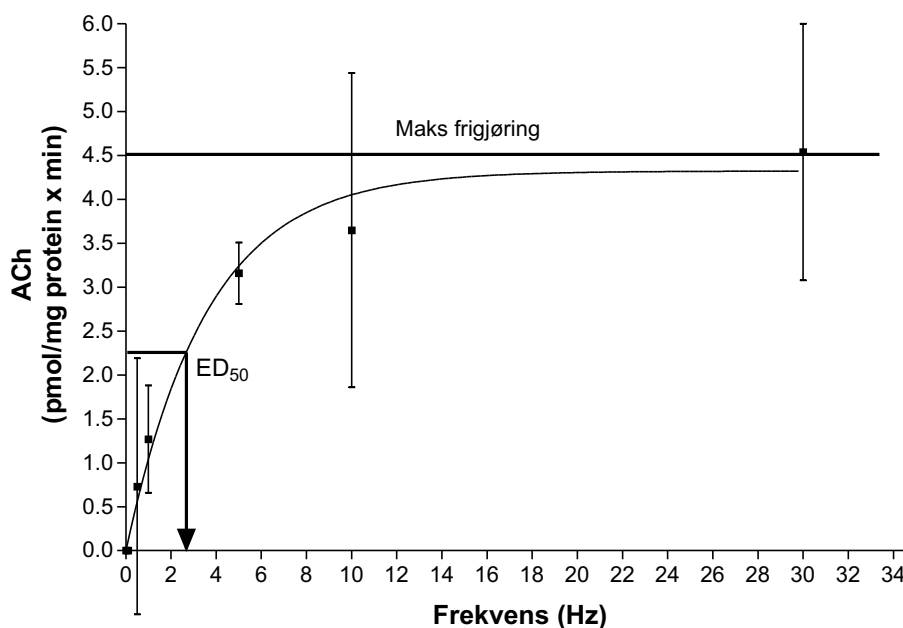
Figur 3.3: Frisetting av ^3H -glutamat fra marsvin hippokampusskiver perfundert med normalbuffer (kontroll) eller normalbuffer med lav Ca^{2+} . Skivene ble stimulert kjemisk med 75 mM KCl i buffer (KCl) eller elektrisk med 20 Hz (El. stim). Effekten av 1 μM ω -conotoxin GVIA og 1 mM EGTA i buffer med lav Ca^{2+} ble også undersøkt. Verdiene er presentert som % av frisetting etter stimulering i fraksjon A ($\bar{x} \pm \text{SD}$). Ved signifi kante forskjeller: ** $p < 0.01$.

Ved perfusjon med buffer med lav Ca^{2+} under kjemisk og elektrisk stimulering i fraksjon **B** ble frisettingen av ^3H -glutamat signifikant redusert i forhold til kontroll ($p < 0.01$). Ved kjemisk stimulering ble frisettingen redusert med 39 % ved perfusjon med lav Ca^{2+} -buffer (0,1 mM Ca^{2+}) i forhold til kontrollforsøk (2 mM Ca^{2+}). Differansen økte ytterligere til 49 % når buffer med lav Ca^{2+} ble tilsatt 1 μM ω -conotoxin GVIA. Ved elektrisk stimulering var differansen på henholdsvis 41 % ved perfusjon med lav Ca^{2+} -buffer og 48 % ved perfusjon med lav Ca^{2+} -buffer tilsatt 1 μM ω -conotoxin GVIA. Ved perfusjon med lav Ca^{2+} -buffer tilsatt 1 mM EGTA var frisettingen av ^3H -glutamat økt med ca 5 % ved

kjemisk stimulering i forhold til frisettingen ved perfusjon av buffer med lav Ca^{2+} . Frisettingen av ^3H -glutamat var tilbake til mer enn 85 % ved stimulering i fraksjon C ved perfusjon med normal Ca^{2+} -buffer for alle forsøk.

3.2 Endogen ACh-frisetting fra marsvin hippokampus skiver

Frisetting av endogen ACh ved elektrisk stimulering i fraksjon B er vist i figur 3.4. Frisettingen økte gradvis fra 0 pmol fra ustimulerte hippokampusskiver (basalfrisetting) til en maksimal frisetting av ACh mellom 10 og 30 Hz. Maksimal frisetting var på mellom 4,0 og 4,5 pmol ACh/mg protein x minutt. Stimuleringsfrekvensen som gav 50 % frisetting av ACh (ED_{50}) er mellom 2 og 3 Hz.



Figur 3.4: Frisetting av endogen ACh fra marsvin hippokampusskiver ved elektrisk stimulering i fraksjon B. Verdiene er presentert som pmol ACh/mg protein x minutt ($\bar{x} \pm \text{SD}$). $n=4$ for 0.1, 0.5, 1.0 og 30 Hz, $n=6$ for 5 og 10 Hz.

3.3 Effekt av soman på endogen aminosyrefrisetting fra marsvin hippokampusskiver

Ettersom jeg ikke kunne registrere en effekt av soman på stimulert frisettingen av ^3H -glutamat var det naturlig å undersøke om soman eksponering av hippokampus-

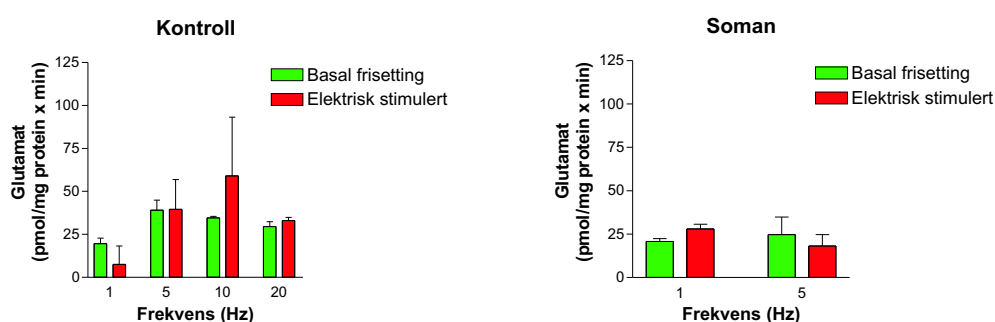
skiver endret frisettingen av de endogene neurotransmitteraminoesyrene glutamat og GABA og hvorvidt dette også påvirket frisetting av andre endogene aminosyrer som glutamin og alanin. Frisetting av aminosyren aspartat ble også registrert, men resultatene er ikke tatt med ettersom frisatt mengde aspartat var svært lav og ofte under deteksjonsgrensen for HPLC-analysen. Forsøkene ble utført som beskrevet i avsnitt 2.4.3.

3.3.1 Stimulering i fraksjon A, B og C

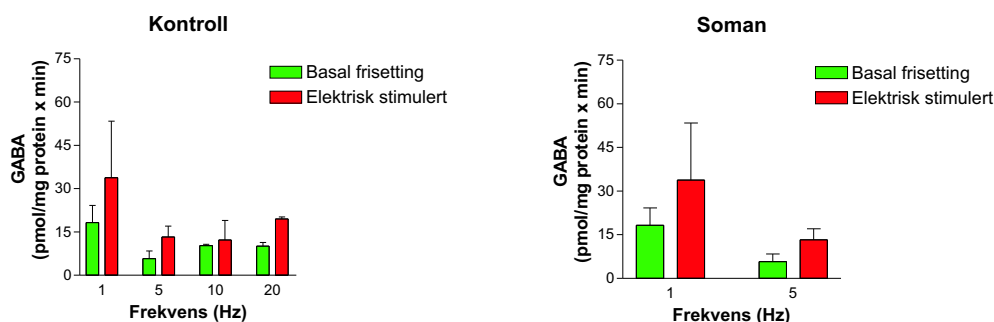
For å bestemme eventuelle endringer i aminosyrefrisetting ved de samme betingelsene som i studiene av frisetting av ^3H -glutamat, ble skivene stimulert etter ett tilsvarende skjema som for frisetting med ^3H -glutamat med stimulering i fraksjonene **A**, **B** og **C**. Skivene ble perfundert med $10\ \mu\text{M}$ soman i buffer eller uten soman i buffer (kontroll), 5 minutter før og under stimulering i fraksjon **B**.

Elektrisk stimulering

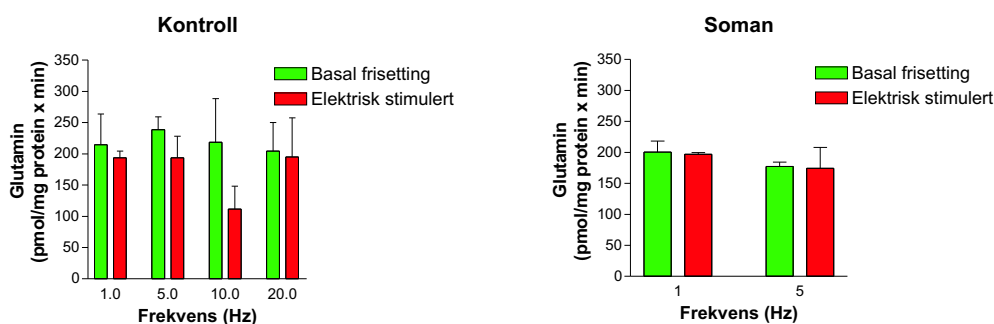
Frisetting av aminosyrene glutamat, GABA, glutamin og alanin fra marsvin hippokampusskiver ved elektrisk stimulering i fraksjon **B** er vist i figurene 3.5-3.8. Elektrisk stimulering i frekvensområdet 1-20 Hz (fraksjon **B**) gav ikke signifikante endringer i frisettingen av aminosyrene glutamat, GABA, glutamin og alanin i forhold til ustimulert basalfrisetting (fraksjon **Y**). Dette var tilfelle både ved perfusjon med soman i normalbuffer ($10\ \mu\text{M}$) og ved perfusjon med normalbuffer uten soman i fraksjon **B** (kontroll).



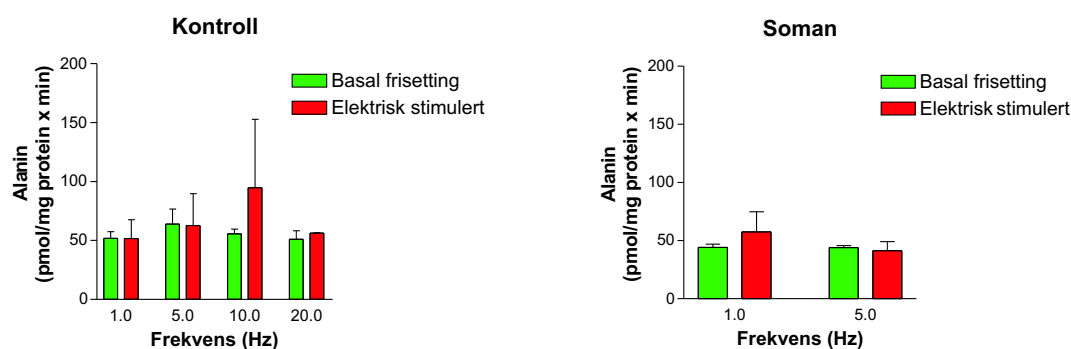
Figur 3.5: Frisetting av endogen glutamat fra marsvin hippokampusskiver ved elektrisk stimulering i fraksjon **B** sammenliknet med basalfrisetting i fraksjon **Y**. Skivene ble perfundert med normalbuffer (Kontroll) eller $10\ \mu\text{M}$ soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol glu/mg protein x min ($\bar{x} \pm \text{SD}$), $n=2$ for alle verdiene.



Figur 3.6: Frisetting av endogen GABA fra marsvin hippokampusskiver ved elektrisk stimulering i fraksjon **B** sammenliknet med basalfrisetting i fraksjon **Y**. Skivene ble perfundert med normalbuffer (Kontroll) eller 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol GABA/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$), n=2 for alle verdiene.



Figur 3.7: Frisetting av endogen glutamin fra hippokampusskiver ved elektrisk stimulering i fraksjon **B** sammenliknet med basalfrisetting i fraksjon **Y**. Skivene ble perfundert med normalbuffer (Kontroll) eller 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol gln/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$), n=2 for alle verdiene.



Figur 3.8: Frisetting av endogen alanin fra hippokampusskiver ved elektrisk stimulering i fraksjon **B** sammenliknet med basalfrisetting i fraksjon **Y**. Skivene ble perfundert med normalbuffer (Kontroll) eller 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol ala/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$), n=2 for alle verdiene.

Kjemisk stimulering

Figurene 3.9-3.12 viser differansen mellom pmol aminosyre frisatt/mg protein x minutt fra marsvin hippocampusskiver ved kjemisk stimulering med KCl-buffer (fraksjon **B**) og ved ustimulert basalfrisetting (fraksjon **Y**). Tabellene 3.2-3.5 viser totalfrisetting av aminosyrer i fraksjon **B** ved kjemisk stimulering med KCl-buffer.

Differanse mellom kjemisk stimulert frisetting og basalfrisetting:

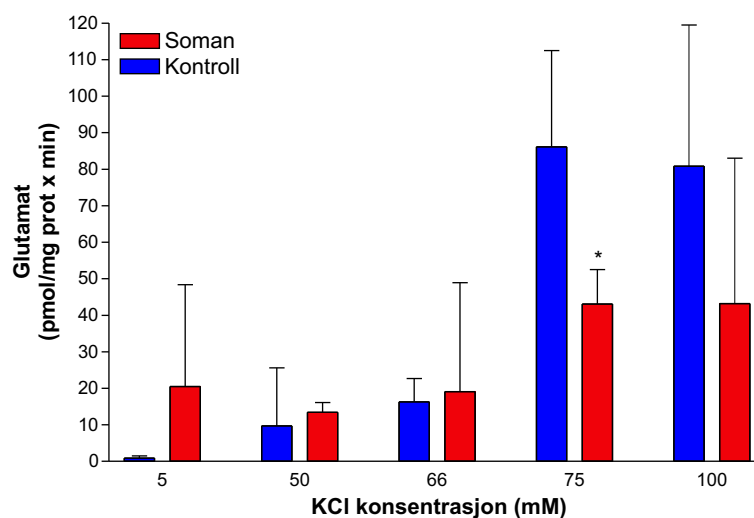
Glutamat (figur 3.9): Det ble ikke observert en endring i frisetting av endogen glutamat fra hippocampusskiver ved kjemisk stimulering før konsentrasjonen av KCl i buffer var minimum 75 mM. Stimulering med 100 mM KCl økte ikke frisettingen av glutamat i forhold til 75 mM KCl verken fra hippocampusskiver perfundert med soman i buffer (10 μ M) eller skiver perfundert uten soman i buffer (kontroll). Det var en reduksjon i frisatt glutamat fra hippocampusskiver perfundert med soman sammenliknet med kontroll ved stimulering med 75 og 100 mM KCl og denne reduksjonen var signifikant ved stimulering med 75 mM KCl ($p < 0.05$).

GABA (figur 3.10): Frisettingen av GABA fra hippocampusskiver perfundert uten soman (kontroll) viste en konsentrasjonsavhengig økning med økende KCl-stimulering opptil stimulering med 75 mM KCl. Stimulering med 100 mM KCl økte ikke frisettingen av GABA i forhold til 75 mM KCl verken fra hippocampusskiver perfundert med soman i buffer (10 μ M) eller i kontrollforsøk. For hippocampusskiver perfundert med soman var det en økning i GABA-frisetting ved stimulering fra 5 til 50 mM KCl som var omtrent uendret ved høyere stimuleringsnivåer. Det var en reduksjon i frisatt GABA fra hippocampusskiver perfundert med soman sammenliknet med kontrollforsøk ved stimulering med 75 mM KCl, men denne reduksjonen var ikke signifikant.

Glutamin (figur 3.11): Frisettingen av glutamin fra hippocampusskiver perfundert med buffer uten soman (kontroll) viste en konsentrasjonsavhengig økning med økende KCl-stimulering opptil stimulering med 75 mM KCl. Differansen mellom basalfrisetting og KCl-stimulert frisetting (11,9-40,3 pmol/mg protein x min) var imidlertid liten i forhold til basalfrisetting (123,0-326,9 pmol/mg protein x min). For hippocampusskiver perfundert med soman i buffer (10 μ M) ble det ikke påvist en økning i glutaminfrisettingen ved KCl-stimulering i forhold til basalfrisetting.

Alanin (figur 3.12): De foreliggende forsøkene viste at det ikke var noen klar korrelasjon mellom alaninfrisetting og økende KCl-stimulering fra verken

hippokampusskiver perfundert med buffer uten soman (kontroll) eller buffer med soman (10 μ M). Det var en signifikant reduksjon i frisatt alanin fra hippokampusskiver perfundert med soman, sammenliknet med kontrollforsøk ved stimulering med 75 mM KCl ($p < 0.05$).

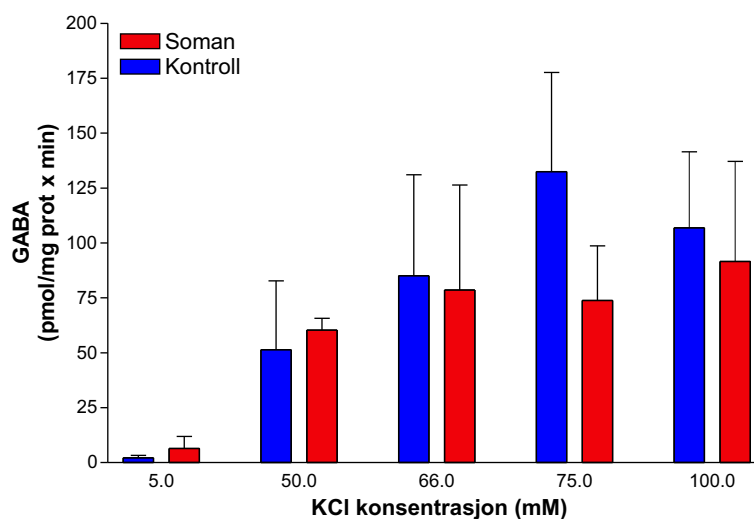


Figur 3.9: Differansen mellom endogen glutamat frisatt ved kjemisk stimulering og basal-frisetting (fraksjon **B** minus fraksjon **Y**). Hippokampusskivene ble stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol glu/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Kontroll: $n=2$ for 5 og 66 mM KCl. For alle øvrige verdier er $n=4$. Ved signifi kante forskjeller: $*p < 0.05$.

Frisatt glutamat ved stimulering av hippokampusskiver

[KCl]	Kontroll	Soman
5 mM	48,8 \pm 0,9	62,6 \pm 28,7
50 mM	50,3 \pm 6,5	47,3 \pm 14,8
66 mM	38,5 \pm 7,4	58,5 \pm 23,2
75 mM	132,5 \pm 22,2	95,6 \pm 3,9 *
100 mM	121,1 \pm 42,8	72,5 \pm 43,9

Tabell 3.2: Absoluttverdier for frisetting av endogen glutamat fra hippokampusskiver kjemisk stimulert med KCl-buffer uten soman (kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol glu/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Kontroll: $n=2$ for 5 mM og 66 mM KCl. For alle øvrige verdier er $n=4$. Ved signifi kante forskjeller: $*p < 0.05$.

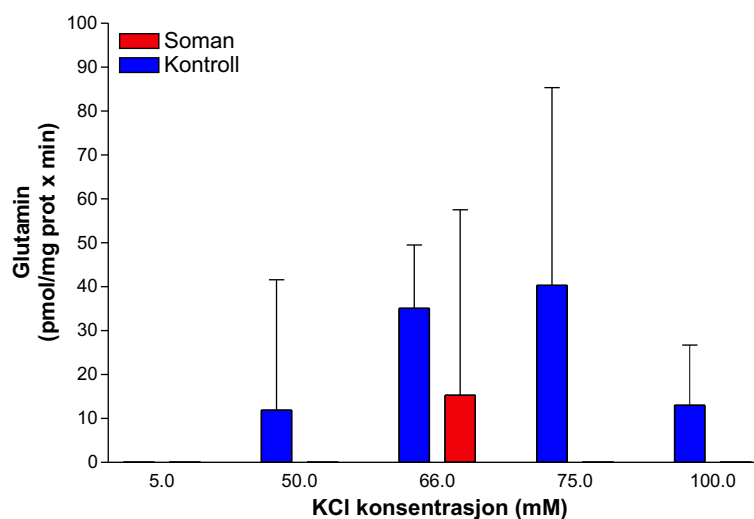


Figur 3.10: Differansen mellom endogen GABA frisatt ved kjemisk stimulering og basal-frisetting (fraksjon **B** minus fraksjon **Y**). Hippokampusskivene ble stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol GABA/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Kontroll: n=2 for 5 og 66 mM KCl. For alle øvrige verdier er n=4.

Frisatt GABA ved stimulering av hippocampusskiver

[KCl]	Kontroll	Soman
5 mM	24,8 \pm 2,7	28,5 \pm 7,7
50 mM	81,1 \pm 31,7	80,3 \pm 12,5
66 mM	109,4 \pm 47,4	105,0 \pm 50,7
75 mM	169,1 \pm 66,1	90,6 \pm 14,3
100 mM	117,9 \pm 42,5	97,1 \pm 40,6

Tabell 3.3: Absoluttverdier for frisetting av endogen GABA fra hippocampusskiver kjemisk stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol GABA/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Kontroll: n=2 for 5 mM og 66 mM KCl. For alle øvrige verdier er n=4

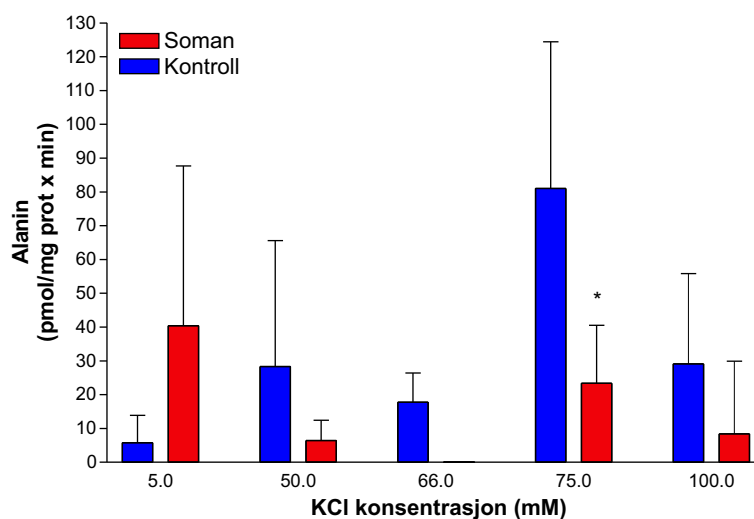


Figur 3.11: Differansen mellom endogen glutamin frisatt ved kjemisk stimulering og basalfrisetting (fraksjon **B** minus fraksjon **Y**). Hippokampusskivene ble stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol gln/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Frisetting ved kjemisk stimulering \leq basalfrisetting for Kontroll: 5 mM KCl og Soman: 5, 50, 75 og 100 mM KCl. Kontroll: n=2 for 5 og 66 mM KCl. For alle øvrige verdier er n=4.

Frisatt glutamin ved stimulering av hippocampusskiver

[KCl]	Kontroll	Soman
5 mM	326,2 \pm 16,3	340,0 \pm 27,9
50 mM	258,8 \pm 80,2	198,4 \pm 21,3
66 mM	158,2 \pm 12,8	196,6 \pm 53,2
75 mM	304,3 \pm 39,0	250,3 \pm 20,3 *
100 mM	250,6 \pm 53,8	172,0 \pm 46,7

Tabell 3.4: Absoluttverdier for frisetting av endogen glutamin fra hippocampusskiver kjemisk stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol gln/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Kontroll: n=2 for 5 mM og 66 mM KCl. For alle øvrige verdier er n=4. Ved signifi kante forskjeller: *p<0.05.



Figur 3.12: Differansen mellom endogen alanin frisatt ved kjemisk stimulering og basalfrisetting (fraksjon **B** minus fraksjon **Y**). Hippokampusskivene ble stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol ala/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Frisetting ved kjemisk stimulering \leq basalfrisetting for Soman 66 mM KCl. Kontroll: n=2 for 5 og 66 mM KCl. For alle øvrige verdier er n=4. Ved signifi kante forskjeller: *p<0.05.

Frisatt alanin ved stimulering av hippocampusskiver

[KCl]	Kontroll	Soman
5 mM	103,2 \pm 10,7	130,3 \pm 49,6
50 mM	103,3 \pm 50,5	57,5 \pm 18,3
66 mM	52,5 \pm 12,9	52,0 \pm 8,6
75 mM	160,4 \pm 62,0	96,6 \pm 8,7
100 mM	89,9 \pm 38,4	56,5 \pm 23,2

Tabell 3.5: Absoluttverdier for frisetting av endogen alanin fra hippocampusskiver kjemisk stimulert med KCl-buffer uten soman (kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon **B**. Verdiene er presentert som pmol ala/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Kontroll: n=2 for 5 mM og 66 mM KCl. For alle øvrige verdier er n=4

For alle aminosyrene oppnås maksimal frisetting ved stimulering med 75 mM KCl-buffer uten soman. Ved å øke konsentrasjonen av KCl i buffer fra 75 til 100 mM reduseres frisettingen av aminosyrene GABA, glutamin og alanin ved perfusjon med KCl-buffer uten soman (kontroll). Ved stimulering med 75 og 100 mM KCl var frisettingen av aminosyrene glutamat, GABA, glutamin og alanin fra hippokampusskiver lavere ved perfusjon med soman i buffer (10 μ M) i forhold til kontrollforsøk.

3.3.2 Stimulering kun i fraksjon A

Det ble også gjennomført en serie forsøk for å undersøke om kjemisk stimuleringen med 50 mM KCl-buffer i fraksjon A kamouflerte en eventuell endring i frisetting av endogene aminosyrer i fraksjon B ved soman perfusjon. Det ble derfor gjennomført forsøk der effekten av soman perfusjon på aminosyrefrisetting ble registrert etter bare 35 min, uten en foregående kjemisk stimulering. Skivene ble perfundert med 10 μ M soman i buffer eller uten soman i buffer (kontroll), 5 minutter før og under stimulering i fraksjon A.

Kjemisk stimulering

Figurene 3.13-3.16 viser differansen mellom pmol aminosyre frisatt/mg protein x minutt fra marsvin hippokampusskiver ved kjemisk stimulering med KCl-buffer (fraksjon A) og ved ustimulert basalfrisetting (fraksjon X). Tabellene 3.6- 3.10 viser totalfrisetting av aminosyrer i fraksjon A ved kjemisk stimulering med KCl-buffer.

Differanse mellom kjemisk stimulert frisetting og basalfrisetting:

Glutamat (figur 3.13): Frisettingen av glutamat viste en konsentrasjonsavhengig økning med økende konsentrasjon av KCl fra hipokampusskiver perfundert med soman i buffer (10 μ M). Ved perfusjon med buffer uten soman (kontroll) var frisettingen konsentrasjonsavhengig med økende KCl-konsentrasjon opptil 75 mM KCl, før frisettingen ble redusert ved stimulering med 100 mM KCl i forhold til stimulering med 75 mM KCl. Frisettingen var lavere for soman perfunderte skiver i forhold til kontrollforsøk ved stimulering med 50 og 75 mM KCl, mens frisettingen var høyere enn i kontrollforsøk ved stimulering med 100 mM KCl, men ingen av differansene var signifikante.

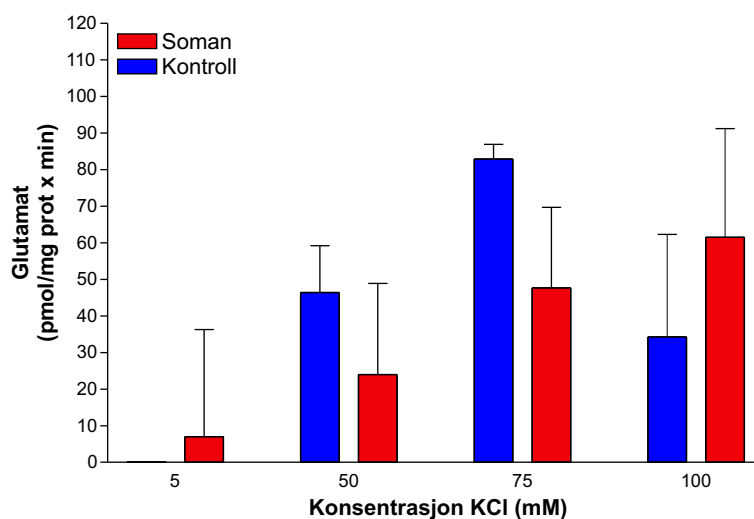
GABA (figur 3.14): Frisettingen av GABA viste en konsentrasjonsavhengig økning med økende konsentrasjon av KCl fra hippokampusskiver perfundert med soman i buffer (10 μ M). Ved perfusjon med buffer uten soman (kontroll)

var frisettingen konsentrasjonsavhengig med økende KCl-konsentrasjon opptil 75 mM KCl, før frisettingen ble redusert ved stimulering med 100 mM KCl i forhold til stimulering med 75 mM KCl. Frisettingen var lavere for soman perfunderte skiver i forhold til kontrollforsøk ved stimulering med 75 mM KCl, mens frisettingen var høyere enn i kontrollforsøk ved stimulering med 100 mM KCl, men ingen av differansene var signifikante.

Glutamin (figur 3.15): Frisettingen av glutamin fra hippokampusskiver perfundert med buffer uten soman (kontroll) viste en konsentrasjonsavhengig økning med økende KCl-konsentrasjon opptil 75 mM KCl, før frisettingen ble redusert ved stimulering med 100 mM KCl i forhold til stimulering med 75 mM KCl. For hippokampusskiver perfundert med soman i buffer (10 μ M) var det en økning i frisettingen fra stimulering med 5 til 50 mM KCl som var omtrent uendret ved høyere stimuleringer. Differansen mellom basalfrisettingen og KCl-stimulert frisetting (83,6-31,5 pmol/mg protein x min) var imidlertid liten i forhold til basalfrisetting (183,3-333,4 pmol/mg protein x min). Frisettingen var lavere for soman perfunderte skiver i forhold til kontrollforsøk ved stimulering med 50 og 75 mM KCl, og denne reduksjonen var signifikant ved stimulering med 75 mM KCl ($p < 0.05$).

Alanin (figur 3.16): De foreliggende forsøkene viste at det ikke var noen klar korrelasjon mellom alaninfrisetting og økende KCl-stimulering fra verken hippokampusskiver perfundert med buffer uten soman (kontroll) eller buffer med soman (10 μ M). Det ble ikke påvist signifikante endringer i frisettingen av alanin fra hippokampusskiver perfundert med soman, sammenliknet med kontrollforsøk.

I likehet med frisetting av aminosyrer ved stimulering i fraksjonene **A**, **B** og **C** oppnås maksimal frisetting av aminosyrene glutamat, GABA og glutamin ved stimulering med 75 mM KCl-buffer uten soman. Ved å øke konsentrasjonen av KCl i buffer fra 75 til 100 mM reduseres frisettingen av aminosyrene glutamat, GABA og glutamin ved perfusjon med buffer uten soman (kontroll). Ved stimulering med 75 mM KCl var frisettingen av aminosyrene glutamat, GABA og glutamin lavere ved perfusjon med soman i buffer i forhold til kontrollforsøk, mens ved stimulering med 100 mM KCl var frisettingen av de samme aminosyrene ved perfusjon med soman enten lik eller høyere enn i kontrollforsøk.

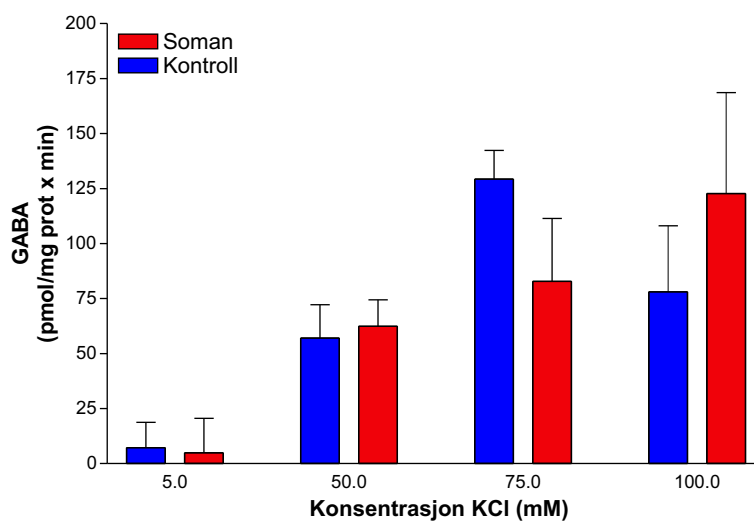


Figur 3.13: Differansen mellom endogen glutamat frisatt ved kjemisk stimulering og basalfrisetting (fraksjon A minus fraksjon X). Hippokampusskivene ble stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon A. Verdiene er presentert som pmol glu/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). Frisetting ved kjemisk stimulering \leq basalfrisetting for Kontroll: 5 mM KCl. n=2 for Kontroll og n=4 for Soman. Ved signifi kante forskjeller: *p<0.05.

Frisatt glutamat ved stimulering av hippokampusskiver

[KCl]	Kontroll	10 μ M soman
5 mM	35,0 \pm 5,7	49,1 \pm 33,4
50 mM	111,9 \pm 0,2	107,7 \pm 11,5
75 mM	155,1 \pm 10,3	120,1 \pm 28,1
100 mM	66,3 \pm 31,1	95,6 \pm 32,2

Tabell 3.6: Absoluttverdier for frisetting av endogen glutamat fra hippokampusskiver kjemisk stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon A. Verdiene er presentert som pmol glu/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). n=2 for Kontroll og n=4 for Soman.

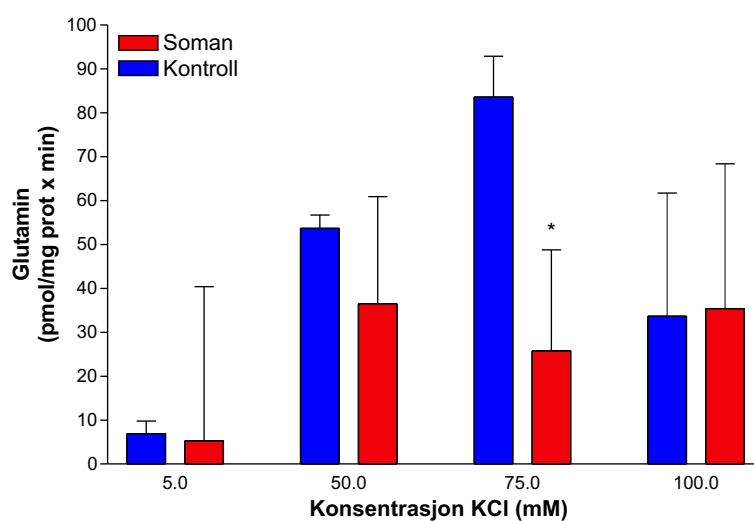


Figur 3.14: Differansen mellom endogen GABA frisatt ved kjemisk stimulering og basal-frisetting (fraksjon A minus fraksjon X). Hippokampusskivene ble stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon A. Verdiene er presentert som pmol GABA/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). n=2 for Kontroll og n=4 for Soman.

Frisatt GABA ved stimulering av hippokampusskiver

[KCl]	Kontroll	10 μ M soman
5 mM	15,0 \pm 0,5	10,9 \pm 12,8
50 mM	101,0 \pm 17,1	107,4 \pm 15,3
75 mM	188,7 \pm 16,8	132,4 \pm 32,3
100 mM	90,1 \pm 29,3	136,3 \pm 46,4

Tabell 3.7: Absoluttverdier for frisetting av endogen GABA fra hippokampusskiver kjemisk stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon A. Verdiene er presentert som pmol GABA/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). n=2 for Kontroll og n=4 for Soman.

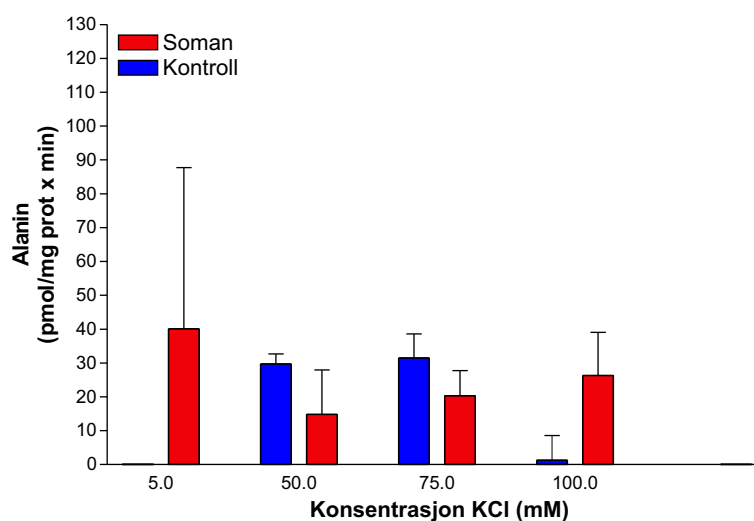


Figur 3.15: Differansen mellom endogen glutamin frisatt ved kjemisk stimulering og basal-frisetting (fraksjon A minus fraksjon X). Hippokampusskivene ble stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon A. Verdiene er presentert som pmol gln/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). n=2 for Kontroll og n=4 for Soman. Ved signifi kante forskjeller: *p<0.05.

Frisatt glutamin ved stimulering av hippocampusskiver

[KCl]	Kontroll	10 μ M soman
5 mM	267,5 \pm 60,0	188,6 \pm 34,9
50 mM	319,9 \pm 53,2	267,5 \pm 73,9
75 mM	417,0 \pm 13,7	294,4 \pm 75,6
100 mM	310,8 \pm 65,0	288,6 \pm 83,8

Tabell 3.8: Absoluttverdier for frisetting av endogen glutamin fra hippocampusskiver kjemisk stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon A. Verdiene er presentert som pmol gln/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). n=2 for Kontroll og n=4 for Soman.



Figur 3.16: Differansen mellom endogen alanin frisatt ved kjemisk stimulering og basalfrisetting (fraksjon A minus fraksjon X). Hippokampusskivene ble stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon A. Verdiene er presentert som pmol ala/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). n=2 for Kontroll og n=4 for Soman.

Frisatt alanin ved stimulering av hippocampusskiver		
[KCl]	Kontroll	10 μ M soman
5 mM	55,8 \pm 0,3	86,6 \pm 91,5
50 mM	106,4 \pm 13,4	91,1 \pm 23,2
75 mM	122,7 \pm 0,1	101,5 \pm 12,2
100 mM	54,3 \pm 13,9	68,1 \pm 34,0

Tabell 3.9: Absoluttverdier for frisetting av endogen alanin fra hippocampusskiver kjemisk stimulert med KCl-buffer uten soman (Kontroll) eller KCl-buffer med 10 μ M soman (Soman) i fraksjon A. Verdiene er presentert som pmol ala/mg protein x min ($\bar{x} \pm SD$). n=2 for Kontroll og n=4 for Soman.

3.4 AChE- og BuChE-aktivitet

Tabell 3.10 viser AChE- og BuChE-aktivitet i hippocampusskiver etter ulike *in vitro* forsøk. AChE- og BuChE-aktiviteten i hippocampusskivene ble målt som beskrevet i avsnitt 2.8. AChE- og BuChE-aktiviteten ble målt i både kontrollforsøk og i forsøk hvor kolinesteraseenzymene var hemmet med soman. AChE-aktiviteten i skiver perfundert med 10 μ M soman (frisetting av ^3H -glutamat og

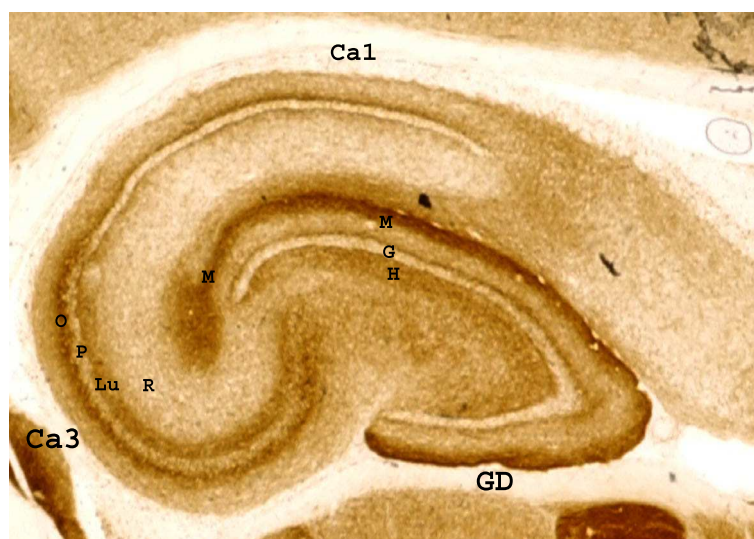
endogene aminosyrer) var mellom 0,5 og 5,5 % av AChE-aktiviteten i skiver perfundert uten soman i buffer (kontroll). For BuChE var den tilsvarende restaktiviteten mellom 0 og 10 % . Dette er en hemmingsgrad som kan anses som en tilnærmet fullstendig inhibering av kolinesteraseaktiviteten i hippokampusskivene. Ved bestemmelse av ACh-frisetting ble alle skivene preinkubert i 1 μ M soman i 30 minutter før forsøkets start. Sammenlikning med en kontroll uten soman var derfor ikke mulig. Også i disse forsøkene kan vi anta omtrent fullstendig hemming av kolinesteraseaktiviteten, ettersom aktiviteten av enzymene er svært lav (0,7 og 0,1 pmol ACh/mg protein x min) for henholdsvis AChE- og BuChE-aktiviteten.

Kolinesteraseaktivitet (pmol ACh/mg protein x min)						
Forsøk	Kontroll		Soman ekponert		% av kontroll	
	AChE	BuChE	AChE	BuChE	AChE	BuChE
(1)	27,4 \pm 16,1	2,2 \pm 1,2	1,5 \pm 0,8	0,1 \pm 0,1	5,5	4,5
(2)	-	-	0,7 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	-	-
(3)	24,3 \pm 4,9	1,0 \pm 0,8	0,7 \pm 0,5	0,1 \pm 0,1	2,9	10,0
(4)	21,5 \pm 4,3	0,9 \pm 0,5	0,3 \pm 0,2	0,0 \pm 0,1	1,4	0,0
(5)	19,6 \pm 2,9	1,2 \pm 0,7	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,3	0,5	8,3

Tabell 3.10: Kolinesteraseaktivitet i marsvin hippokampusskiver. Målinger utført på hippokampusskiver fra følgende forsøk: (1): Effekt av soman på 3 H-glutamatfrisetting ved elektrisk stimulering (n=6 for Kontroll, og n=12 for somanekspont). (2): Endogen ACh-frisetting fra marsvin hippokampusskiver (n=12 for somanekspont). (3): Frisetting av endogene aminosyrer ved elektrisk stimulering i fraksjonene A, B og C (n=2 for Kontroll, og n=4 for somanekspont). (4): Frisetting av endogene aminosyrer ved kjemisk stimulering i fraksjonene A, B og C (n=4 for Kontroll, og n=8 for somanekspont). (5): Frisetting av endogene aminosyrer ved kjemisk stimulering kun i A (n=5 for Kontroll, og n=12 for somanekspont). Verdiene er presentert som hydrolysert ACh (pmol/mg protein x min) ($\bar{x} \pm SD$).

3.5 Histokjemisk farging av marsvin hippokampus

Figur 3.17 viser horisontalsnitt av hippokampus fra marsvin farget med acetylthio-kolinjodid som farger spesifikt AChE. I GD ble det distale molekylærlaget kraftig farget og det var noe mindre intens farging i det polymorfecellelaget. I CA3 ble stratum oriens og mosefiberlaget tydelig farget. Molekylærlaget i CA3 ble også farget, mens CA1 ble svært lite farget sammenliknet med GD og CA3. Afferente kolinerge nevroner ser dermed ut til å innervere hippokampus hovedsakelig i områder over og under pyramidecellelaget i CA3 og korncellelaget i GD.



Figur 3.17: Horisontalsnitt av marsvin hippokampus farget med acetylthiokolinjodid. Merking: **Hippokampus:** M=stratum lacunosum moleculare (molekylære laget), R=stratum radiatum, Lu=stratum lucidum (mosefi ber laget), P=stratum pyramidale (pyramide celledaget), O=stratum oriens. **Gyrus dentatus (GD):** M=stratum moleculare (molekylære laget), G=stratum granulosum (granulære celledag), H=Hilus gyrus dentatus (polymorfe celledag).

3.6 *In vivo* mikroinjeksjon av soman i GD området i rottehippokampus

Det ble målt endringer i hippokampal thetafrekvens og amplitude, samt LIA-amplitude, før og etter mikroinjeksjon av 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl sammenliknet med mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll). Thetaaktivitet forekom ikke like ofte i CA1 som i GD i rotter implantert med bipolar elektrode i hippokampus. Av den grunn er totalt antall registreringer av thetafrekvens og amplitude ofte lavere i CA1 enn for tilsvarende måling i GD. Generelt er totalt antall registreringer av theta (frekvens og amplitude) og LIA (amplitude) både i GD og CA1 ved hvert tidsintervall lavere enn det totale antall dyr i hver av gruppene (0,9 % NaCl (n=6), 1 nmol soman (n=9) og 10 nmol soman (n=2)). Årsaken til dette var at signaler fra den bipolare elektroden ble avlest på en kanal, så det var ikke mulig å utføre avlesning av theta- og LIA-aktivitet fra begge elektrodene på samme tid. I tillegg ble rottene, uavhengig av hvilken løsning som ble injisert, ofte inaktive etter 10-15 min. Etersom forekomst av thetaaktivitet er avhengig av "frivillig" motoriske bevegelser (type 1 adferd) gjorde denne inaktiviteten det vanskelig å avlese thetaamplitude og frekvens. For all registrering av theta og LIA-aktivitet etter injeksjon av 10 nmol soman i hippokampus er n=1, ettersom en av de totalt to dyrene som ble injisert med 10 nmol soman fikk kontinuerlig

epileptiformt EEG som gjorde det umulig å avlese theta- og LIA-aktivitet. I tillegg til theta- og LIA-aktivitet ble det registrert generelle EEG og adferdsendringer i rotter mikroinjisert med 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman. Forsøkene ble utført som beskrevet i avsnitt 2.5.

3.6.1 Adferdsregistrering og EEG

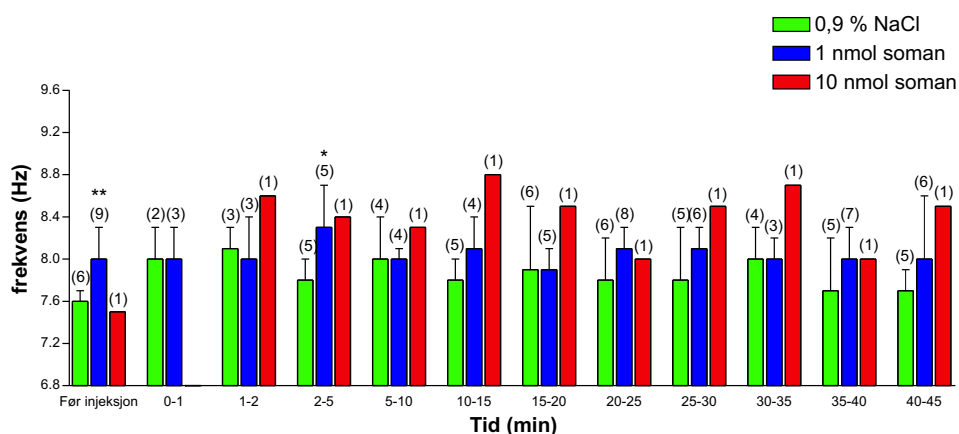
Tabell 3.11 viser EEG og adferdsendringer i rottene etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Ingen av rottene mikroinjisert med 1 μ l 0,9 % NaCl fikk kramper eller epileptiformt EEG. I tre (33 %) av dyrene injisert med 1 nmol soman, ble det observert kortvarige muskelkramper eller muskelrykninger kort tid etter injeksjon i hippokampus. Ansiktsrykninger var den mest hyppige observerte responsen etter injeksjon av 1 nmol soman, men kramper i ekstremitetene forekom også. Det var karakteristisk for forsøkene at kramper og epileptiformt EEG alltid oppsto parallelt og symptomene på somanforgiftning var i alle tilfellene borte etter 10-15 minutter etter injeksjon av soman. I forsøkene hvor rottene ble injisert med 10 nmol soman fikk ett av to dyr kraftig vedvarende muskelkramper og epileptiformt EEG ca 1 minutt etter injeksjon. Det epileptiforme EEG var gjennom hele måleperioden (30 min) avbrutt av korte pauser med lav EEG-aktivitet. Krampene varierte i styrke parallelt med intensiteten på det epileptiforme EEG.

Adferd	0,9 % NaCl	1 nmol soman	10 nmol soman
(1)	6	6	1
(2)	-	3	-
(3)	-	-	1
n total	6	9	2

Tabell 3.11: EEG og adferdsregistrering. Tabellen angir adferdsendringer i rottene etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl-løsning med eller uten soman (1 og 10 nmol). (1): Ingen epileptiform EEG eller muskelkramper observert. (2): Sporadiske muskelkramper/rykninger og epileptiformt EEG observert. (3): Kontinuerlige muskelkramper og epileptiformt EEG observert under store deler av registreringsperioden. Verdiene er oppgitt i antall dyr.

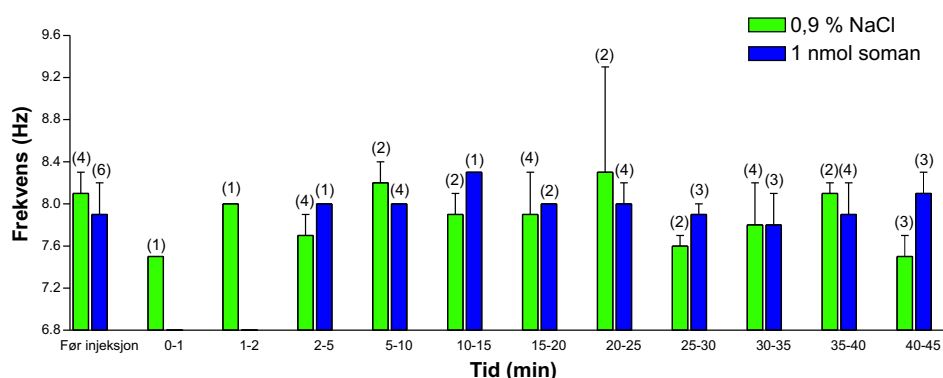
3.6.2 Thetafrekvens

Figur 3.18 viser thetafrekvens i GD registrert i tidsintervaller opptil 45 minutter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μl 0,9 % NaCl (kontroll, n=6) eller 1 (n=9) og 10 (n=1) nmol soman løst i 1 μl 0,9 % NaCl. Thetafrekvensen i gruppen av rotter injisert med 1 μl 0,9 % NaCl og 1 eller 10 nmol soman varierte mellom 7,5 og 9,0 Hz gjennom hele forsøket. Det ble påvist signifikant økning i thetafrekvensen etter injeksjon av 1 nmol soman i forhold til kontrolldyr, før injeksjon ($p < 0.01$) og i tidsintervallet 2-5 minutter etter injeksjon ($p < 0.05$). Etter injeksjon av 10 nmol soman økte thetafrekvensen i en del tidsintervaller sammenliknet med thetafrekvensen etter injeksjon av 1 μl 0,9 % NaCl i kontrolldyrene.



Figur 3.18: Thetafrekvens i GD hos rotter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μl 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μl 0,9 % NaCl. Tidsintervallene er oppgitt i minutter etter mikroinjeksjon. Verdiene er presentert som frekvens (Hz) ($\bar{x} \pm \text{SD}$). Tall i parentes over stolpe angir antall dyr per tidsintervall som det ble observert thetafrekvens i. Ved signifikante forskjeller * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figur 3.19 viser thetafrekvens i CA1 registrert i tidsintervaller opptil 45 minutter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μl 0,9 % NaCl (kontroll, n=6) eller 1 nmol soman løst i 1 μl 0,9 % NaCl (n=6). Det ble ikke registrert thetafrekvens etter injeksjon av 10 nmol soman (n=1) i noen av tidsintervallene. Thetafrekvensen i gruppen av rotter injisert med 1 μl 0,9 % NaCl og 1 nmol soman varierte mellom 7,5 og 8,4 Hz gjennom hele forsøket. Det ble ikke påvist signifikante endringer i thetafrekvensen mellom rotter injisert med 1 nmol soman og kontrolldyr. Det ble ikke registrert thetafrekvens etter injeksjon av 1 nmol soman i tidsintervallet 0-2 min.



Figur 3.19: Thetafrekvens i CA1 hos rotter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Det var ingen registrering av thetaaktivitet i CA1 fra rotte injisert med 10 nmol soman. Tidsintervallene er oppgitt i minutter etter mikroinjeksjon. Verdiene er presentert som frekvens (Hz) ($\bar{x} \pm SD$). Tall i parantes over stolpe angir antall dyr per tidsintervall som det ble observert thetafrekvens i.

3.6.3 Theta og LIA-amplitude

Det ble generelt utført færre registreringer av EEG aktiviteten i CA1 enn i GD ettersom thetaaktivitet ikke forekom like ofte i CA1 som i GD. Det ble derfor lite data tilgjengelig for å sammenlikne effekten av mikroinjeksjon i GD med 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman i 1 μ l 0,9 % NaCl, på theta- og LIA-aktiviteten i CA1.

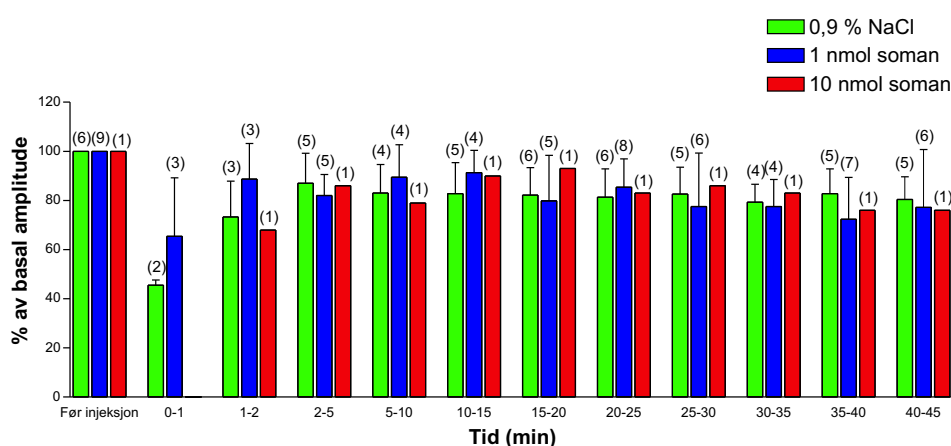
Thetaamplitude i GD

Figur 3.20 viser thetaamplitude i GD registrert i tidsintervaller opptil 45 minutter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll, n=6) eller 1 (n=9) og 10 (n=1) nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Thetaamplitude ble øyeblikkelig (0-1 min) redusert etter injeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 nmol soman. Det ble ikke registrert thetaamplitude etter injeksjon med 10 nmol soman i tidsintervallet 0-1 min. Thetaamplituden ble redusert til 46 % av basalamplituden (før injeksjon) ved injeksjon av 0,9 % NaCl, og til 65 % av basalamplitude ved injeksjon av 1 nmol soman. Etter ca 2 minutt var thetaamplituden ved alle injeksjoner stabilisert på et nivå som var noe lavere enn basalamplituden før injeksjon (80-90 %). Det ble ikke påvist signifikante endringer i thetaamplitude mellom gruppen av rotter injisert med soman og kontrolldyr.

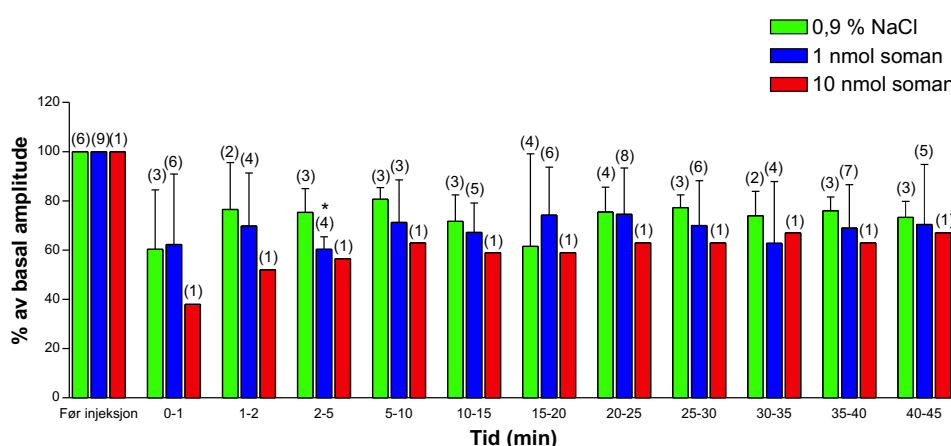
LIA i GD

Figur 3.21 viser LIA i GD registrert i tidsintervaller opptil 45 minutter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll, n=6) eller 1 (n=9) og 10 (n=1)

nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. LIA ble øyeblikkelig (0-1 min) redusert etter injeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman. LIA ble redusert til 60 % av basalamplitude (før injeksjon) ved injeksjon av 0,9 % NaCl, 62 % ved injeksjon av 1 nmol soman, og til 38 % ved injeksjon av 10 nmol soman. Etter ca 2 minutter var LIA stabilisert på ett nivå som var lavere enn basalamplituden før injeksjon (60-80 %). Det ble påvist en signifikant reduksjon i LIA etter injeksjon av 1 nmol soman i forhold til kontrolldyr i tidsintervallet 2-5 minutter ($p < 0.05$).



Figur 3.20: Thetaamplitude i GD hos rotter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Tidsintervallene er oppgitt i minutter etter mikroinjeksjon. Verdiene er presentert som frekvens (Hz) ($\bar{x} \pm SD$). Tall i parantes over stolpe angir antall dyr per tidsintervall som det ble observert thetaamplitude i.



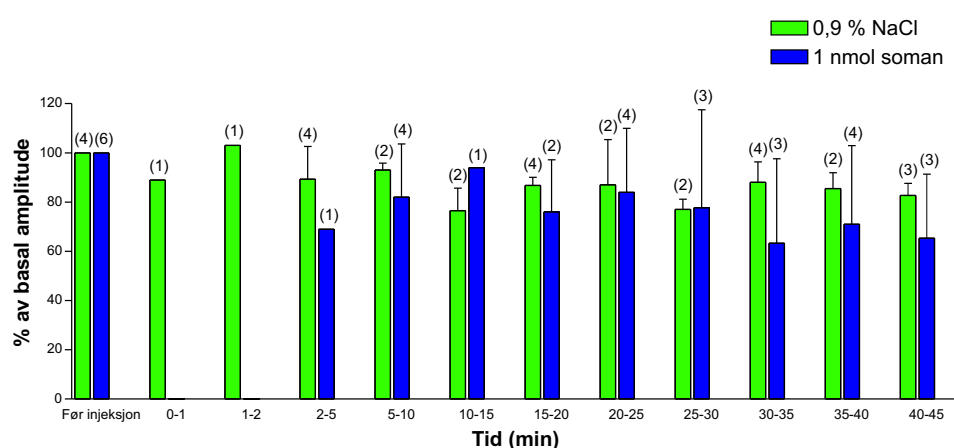
Figur 3.21: LIA i GD hos rotter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Det var ingen registrering av thetaaktivitet i CA1 fra rotte injisert med 10 nmol soman. Tidsintervallene er oppgitt i minutter etter mikroinjeksjon. Verdiene er presentert som frekvens (Hz) ($\bar{x} \pm SD$). Tall i parantes over stolpe angir antall dyr per tidsintervall som det ble observert LIA i. Ved signifi kante forskjeller * $p < 0.05$.

Thetaamplitude i CA1

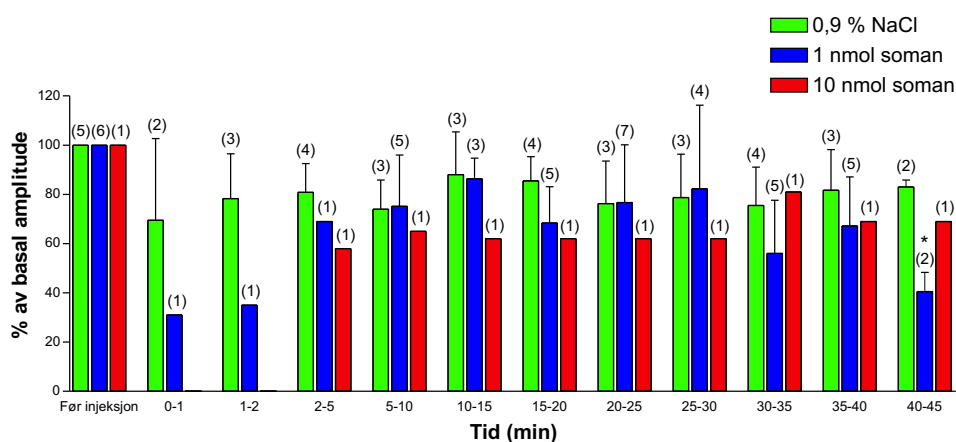
Figur 3.22 viser thetaamplitude i CA1 registrert i tidsintervaller opptil 45 minutter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll, n=6) eller 1 (n=9) og 10 (n=1) nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Etter mikroinjeksjon av 0,9 % NaCl og 1 nmol soman var det små endringer i thetaamplituden gjennom hele måleperioden. Det ble ikke registrert thetaamplitude etter injeksjon av 10 nmol soman i noen av tidsintervallene. Det ble ikke påvist signifikante endringer i thetaamplituden mellom gruppen av rotter injisert med 1 nmol soman og kontrolldyr. Det ble ikke registrert thetaamplitude etter injeksjon av 1 nmol soman i tidsintervallet 0-2 min.

LIA i CA1

Figur 3.23 viser LIA i CA1 registrert i tidsintervaller opptil 45 minutter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll, n=6) eller 1 (n=9) og 10 (n=1) nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Ved injeksjon av 0,9 % NaCl ble LIA øyeblikkelig redusert til 70 % av basalamplitude (før injeksjon) og stabilisert på et nivå mellom 75-90 % av basalamplitude etter ca 2 min. Ved injeksjon av 1 nmol soman ble LIA øyeblikkelig redusert til 31 % av basalamplituden og stabilisert på et nivå mellom 70-90 % av basalamplitude i perioden 2-30 minutter etter injeksjon, før LIA ble signifikant redusert ($p < 0.05$) i forhold til kontrolldyr til 41 % av basalamplitude. I tidsrommet 0-2 minutter etter injeksjon av 10 nmol soman ble det ikke registrert LIA, men etter 2 minutter var LIA blitt stabilisert mellom 60-80 % av basalamplitude. Theta amplituden etter injeksjon av 10 nmol soman var redusert i en del tidsintervaller, sammenliknet med thetaamplituden i kontrolldyr.



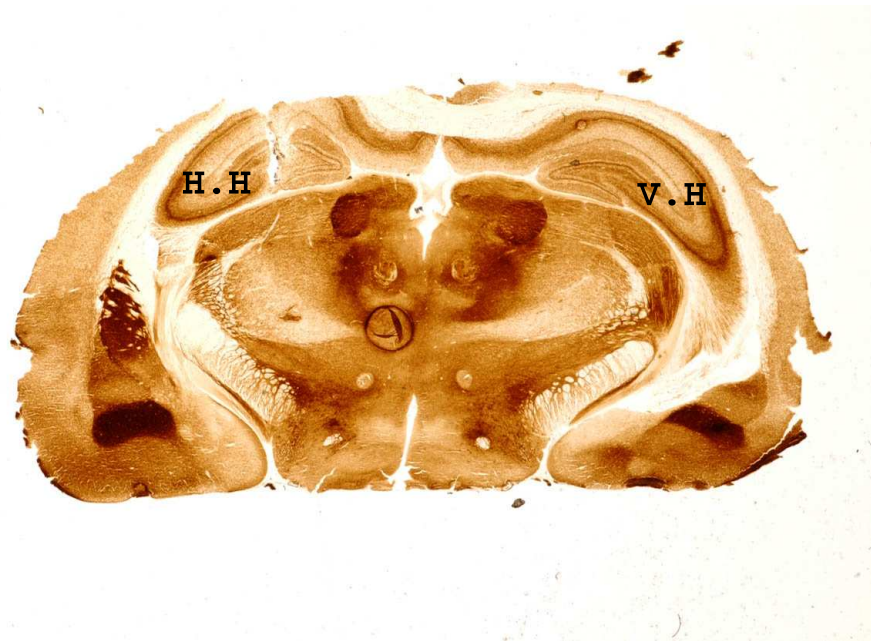
Figur 3.22: Thetaamplitude i CA1 hos rotter etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Tidsintervallene er oppgitt i minutter etter mikroinjeksjon. Verdiene er presentert som frekvens (Hz) ($\bar{x} \pm SD$). Tall i parentes over stolpe angir antall dyr per tidsintervall som det ble observert thetaamplitude i.



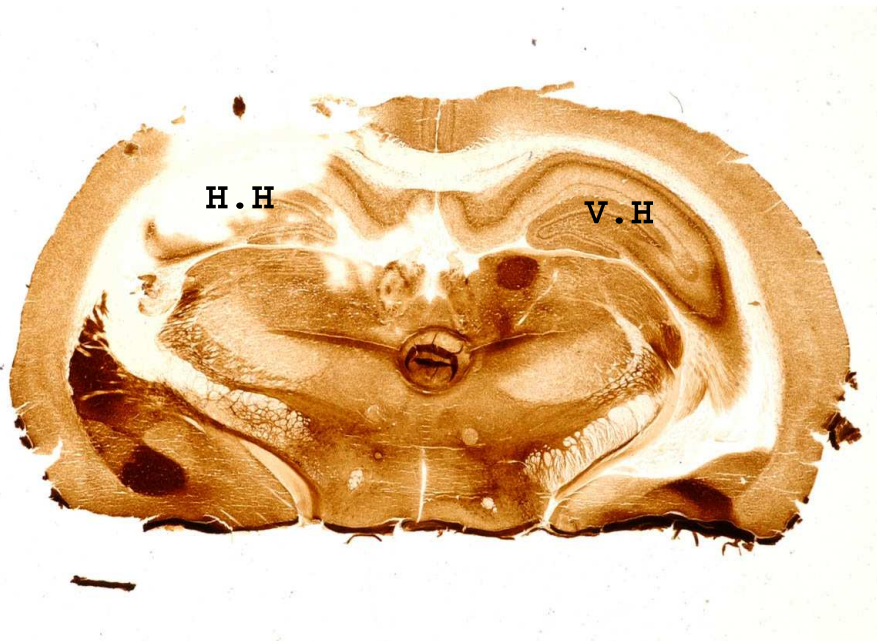
Figur 3.23: LIA i CA1 hos rotter etter mikroinjeksjon i GDav 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Tidsintervallene er oppgitt i minutter etter mikroinjeksjon. Verdiene er presentert som frekvens (Hz) ($\bar{x} \pm SD$). Tall i parentes over stolpe angir antall dyr per tidsintervall som det ble observert LIA i. Ved signifi kante forskjeller * $p < 0.05$.

3.6.4 Histokjemisk farging av rottehjerne

Figur 3.24 og 3.25 viser koronalsnitt av rottehjerne etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl (figur 3.24) og 1 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl (figur 3.25) etter farging med acetylthiokolinjodid. Ved injeksjon av 0,9 % NaCl kunne vi se skader etter injeksjonskanylen i høyre hippokampus. Ved injeksjon av 1 nmol soman var AChE-aktiviteten i store deler av høyre hippokampus kraftig redusert. Hemming av AChE var hovedsakelig lokalisert i områder rundt injeksjonskanylen i høyre hippokampus, men hjerneregioner rundt høyre hippokampus var også berørt. Spesielt frontal parietalkorteks over høyre hippokampus, høyre habenularkjerne og deler av høyre fimbria hadde en tydelig reduksjon i AChE-aktiviteten etter injeksjon av 1 nmol soman.



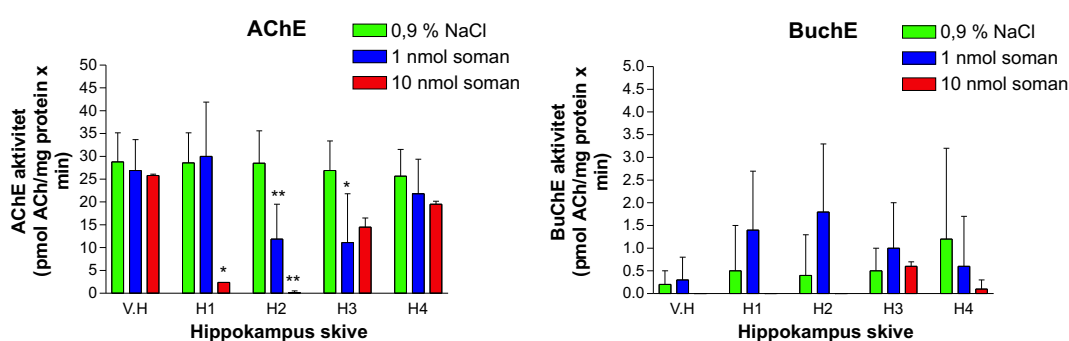
Figur 3.24: Koronasnitt av rottehjerne etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl i hippocampus. H.H=høyre hippocampus, V.H=venstre hippocampus.



Figur 3.25: Koronasnitt av rottehjerne etter mikroinjeksjon av 1 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl i hippocampus. H.H=høyre hippocampus, V.H=venstre hippocampus.

3.6.5 AChE- og BuChE-aktivitet

Figur 3.26 viser AChE- og BuChE-aktiviteten i hippokampusskiver fra rotte etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. For kontrolldyrene injisert med 1 μ l 0,9 % NaCl var AChE-aktiviteten uendret i alle hippokampusprøvene. Injeksjon av 1 nmol soman gav signifikant reduksjon i AChE-aktiviteten i hippokampusprøvene H2 ($p < 0.01$) og H3 ($p < 0.05$) til henholdsvis 42 og 41 % av AChE-aktiviteten i H2 og H3 i kontrolldyr. I rottene injisert med 10 nmol soman var det en signifikant reduksjon i AChE-aktiviteten i hippokampusprøvene H1 ($p < 0.05$) og H2 ($p < 0.01$) til henholdsvis 8 og 1 % av AChE-aktiviteten i H1 og H2 fra kontrolldyr. AChE-aktiviteten i venstre hippokampus var uendret i alle forsøkene og tilsynelatende uavhengig av somanmengden injisert i høyre hippokampus. BuChE-aktiviteten var lav i alle prøvene og utgjorde under 10 % av den totale esteraseaktiviteten for de fleste prøvene som ble analysert.

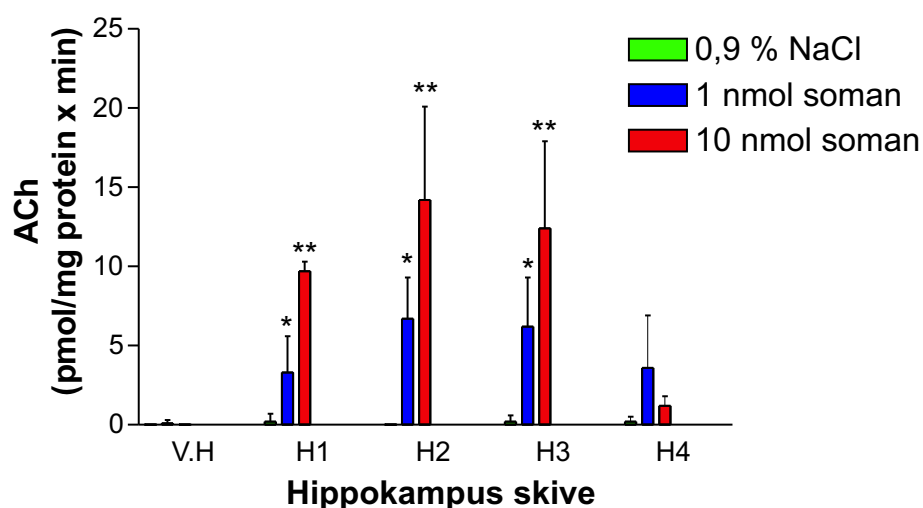


Figur 3.26: AChE- og BuChE-aktivitet i hippokampusskiver fra rotte etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. V.H=prøver fra midtre del av venstre hippokampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippokampus. Verdiene er presentert som hydrolysert ACh (pmol/mg protein x minutt). $n=5$ for 0,9 % NaCl, $n=8$ for 1 nmol soman, og $n=2$ for 10 nmol soman. Ved signifi kante forskjeller * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

3.6.6 *In vitro* frisetting av endogen ACh

Figur 3.27 viser *in vitro* frisetting av endogen ACh fra hippokampusskiver fra rotte etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Frisetting av ACh fra hippokampusskiver etter injeksjon av 0,9 % NaCl var ubetydelig eller under deteksjonsgrensen ved kjemisk stimulering med 66 mM KCl. Etter injeksjon av 1 og 10 nmol soman var mengden ACh signifikant høyere i perfusjonsbuffer fra hippokampusskivene H1 til H3 i forhold til kontrollforsøk ved kjemisk stimulering. Ved injeksjon av 10 nmol soman var mengden ACh betydelig høyere enn ved injeksjon av 1 nmol soman i skivene H1 til H3 ved kjemisk stimulering. ACh mengden i buffer fra stimulerte skiver fra

venstre hippokampus var meget lav (0,1 pmol/mg protein x min) etter injeksjon av 1 nmol soman og under deteksjonsgrensen hos dyr injisert med 0,9 % NaCl og 10 nmol soman. Basalfrisetting av ACh var under deteksjonsgrensen for alle prøvene.

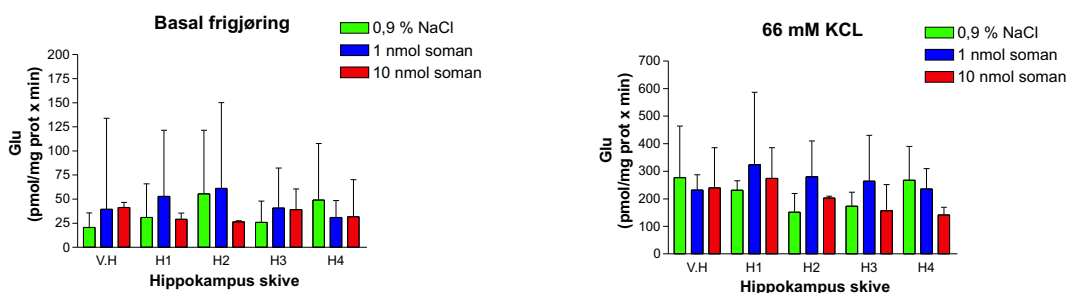


Figur 3.27: Frisetting av endogen ACh fra rotte hippokampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Skivene ble kjemisk stimulert med 66 mM KCl-buffer. V.H=prøver fra midtre del av venstre hippokampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippokampus. Verdiene er presentert som pmol ACh/mg protein x minutt ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman. Ved signifi kante forskjeller *p<0.05, **p<0.01.

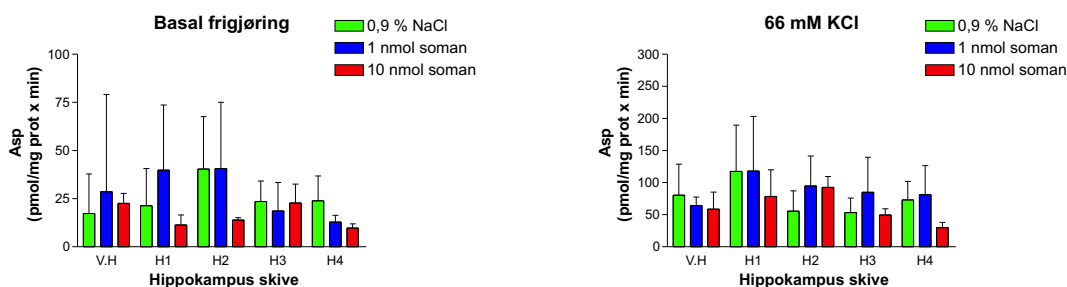
3.6.7 *In vitro* frisetting av endogene aminosyrer

In vitro basalfrisetting og frisetting ved kjemisk stimulering med 66 mM KCl-buffer av aminosyrene glutamat, aspartat, GABA, glutamin og alanin fra hippokampusskiver fra rotte etter mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll) er vist i figurene 3.28-3.32. Kjemisk stimulering med 60 mM KCl-buffer økte klart frisettingen av aminosyrene glutamat, aspartat og GABA i forhold til basalfrisettingen fra alle hippokampusskivene. Økningen i frisetting var uavhengig av somaninjeksjon. For aminosyrene glutamin og alanin var økningen i frisettingen ved kjemisk stimulering lav i forhold til basalfrisettingen. Injeksjon av 1 og 10 nmol soman gav kun signifikante endringer i basalfrisetting av aminosyren GABA i skiver fra venstre hippokampus i forhold til kontrolldyr. Det ble ikke påvist signifikante endringer i frisettingen av de øvrige aminosyrene fra hippokampusskiver etter injeksjon av 1 og 10 nmol soman, i forhold til kontrollgruppen injisert med 0,9 % NaCl. Til tross for dette var det en tendens til reduksjon i basalfrisettingen av

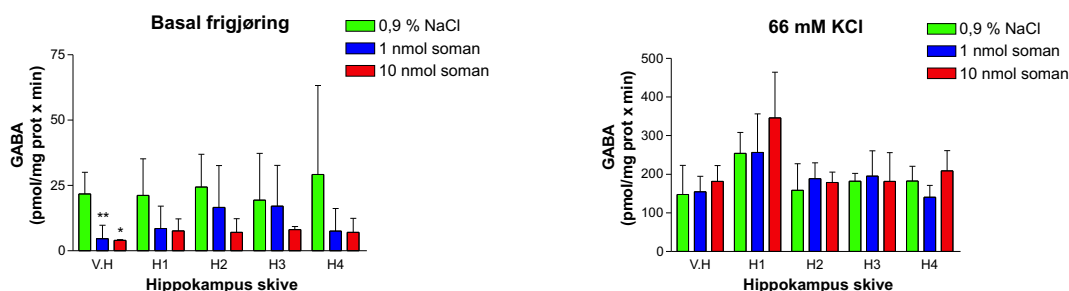
aminosyrene glutamat, aspartat og GABA etter injeksjon av 10 nmol soman i forhold til kontroll fra hippocampusskiver nært injeksjonsstedet (H2 for basalfrisetting av glutamat og aspartat, og alle hippocampusskivene ved basalfrisetting av GABA).



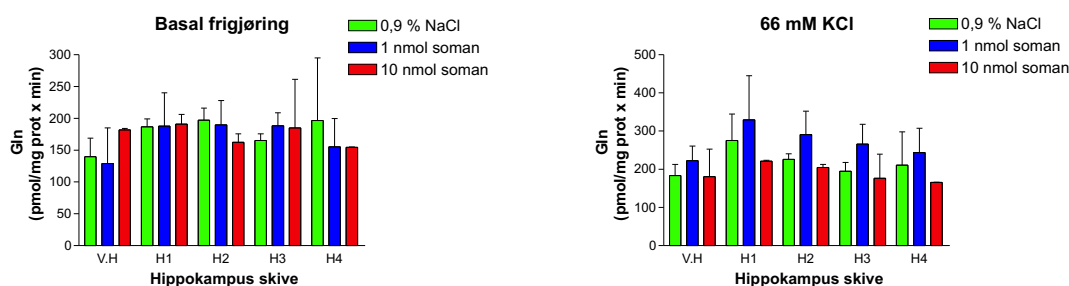
Figur 3.28: Frisetting av endogen glutamat fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Frisettingen ble målt ved perfusjon med normalbuffer (basalfrisetting, fraksjon X) og med 66 mM KCl-buffer (kjemisk stimulering, fraksjon A). V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol glu/mg protein x minutt ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman.



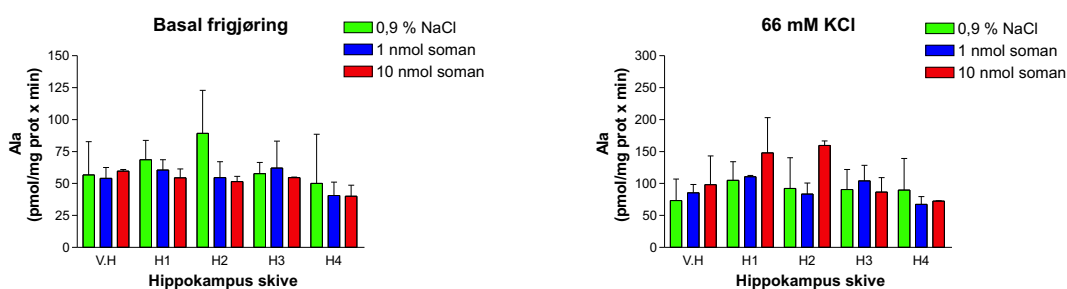
Figur 3.29: Frisetting av endogen aspartat fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Frisettingen ble målt ved perfusjon med normalbuffer (basalfrisetting, fraksjon X) og med 66 mM KCl-buffer (kjemisk stimulering, fraksjon A). V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol glu/mg protein x minutt ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman.



Figur 3.30: Frisetting av endogen GABA fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Frisettingen ble målt ved perfusjon med normalbuffer (basalfrisetting, fraksjon X) og med 66 mM KCl-buffer (kjemisk stimulering, fraksjon A). V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol GABA/mg protein x minutt ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman. Ved signifi kante forskjeller: *p<0.05, **p<0.01.



Figur 3.31: Frisetting av endogen glutamin fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Frisettingen ble målt ved perfusjon med normalbuffer (basalfrisetting, fraksjon X) og med 66 mM KCl-buffer (kjemisk stimulering, fraksjon A). V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol gln x mg⁻¹ x minutt⁻¹ ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman.



Figur 3.32: Frisetting av endogen alanin fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. Frisettingen ble målt ved perfusjon med normalbuffer (basalfrisetting, fraksjon X) og med 66 mM KCl-buffer (kjemisk stimulering, fraksjon A). V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol ala/mg x minutt ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman.

3.6.8 Totalt aminosyreinnhold i hippocampus

Figurene 3.33-3.37 viser totalinnhold av de endogene aminosyrene glutamat, aspartat, GABA, glutamin og alanin i hippocampusskiver fra rotte etter *in vivo* mikroinjeksjon i GD av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl, etterfulgt av *in vitro* frisetting av endogen ACh og aminosyrer.

Glutamat (figur 3.33): Glutamatinnholdet i alle hippocampusprøvene (V.H og H1-H4) fra rottene injisert med 1 og 10 nmol soman i GD var høyere enn for rottene injisert med 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll). Økningen i totalt glutamatinnhold etter injeksjon av 1 og 10 nmol soman var signifikant i hippocampusprøvene H1 og H2 i forhold til kontroll ($p < 0.05$). Injeksjon av 1 og 10 nmol soman ga omtrent samme økning i glutamatinnhold i hippocampusskivene i forhold til kontrolldyr.

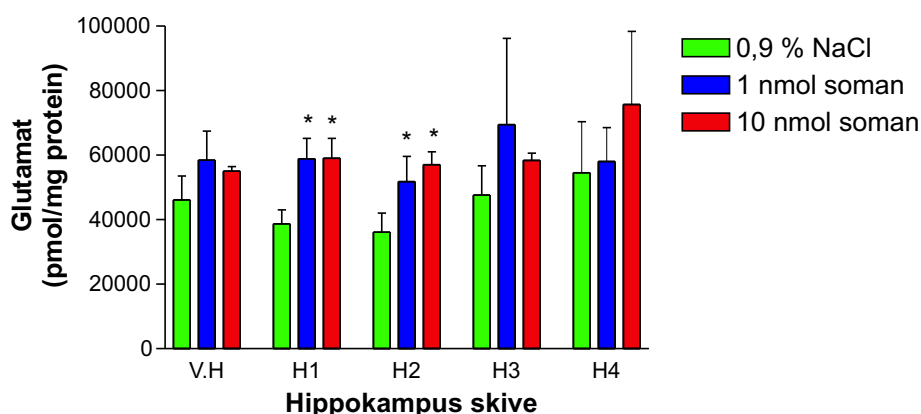
Aspartat (figur 3.34): Aspartatinnholdet i hippocampusprøvene V.H, H1, H2 og H4 fra rottene mikroinjisert med 1 og 10 nmol soman i GD var høyere enn for rottene injisert med 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll). Økningen i totalt aspartatinnhold etter injeksjon av 1 nmol soman var signifikant i hippocampusprøvene V.H og H2. I hippocampusprøve H3 var aspartatinnholdet etter injeksjon av 1 nmol soman høyere i forhold til kontroll, mens aspartatinnholdet i H3 etter tilsvarende injeksjon av 10 nmol soman var lavere i forhold til kontroll. Økning i totalt aspartat innhold etter injeksjon av 1 nmol soman var signifikant i hippocampusprøvene V.H og H1 i forhold til kontroll ($p < 0.05$).

GABA (figur 3.35): GABA-innholdet i alle hippocampusprøvene (V.H og H1-H4) fra rottene injisert med 1 og 10 nmol soman i GD var høyere enn

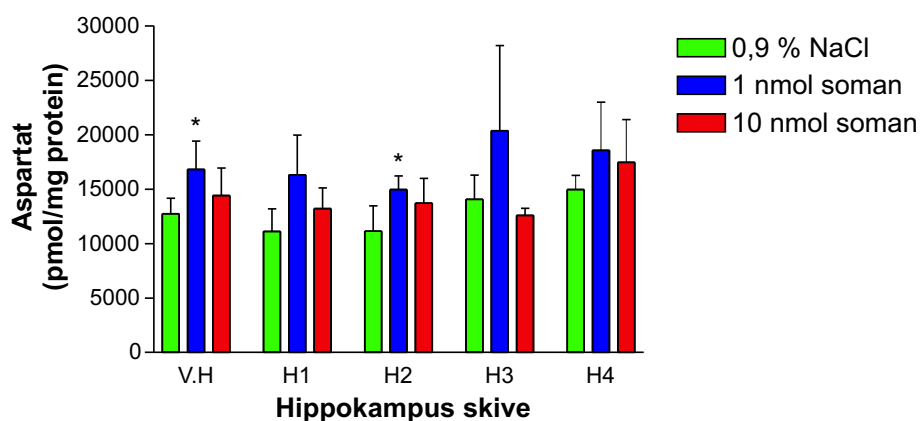
for rottene mikroinjisert med 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll). Økningen i totalt GABA-innhold etter injeksjon av 1 og 10 nmol soman var ikke signifikant for noen av prøvene. Injeksjon av 1 og 10 nmol soman ga omtrent samme økning i GABA-innholdet i hippokampusskivene i forhold til kontroll, med unntak av H4 etter injeksjon av 10 nmol soman, som var høyere enn de øvrige verdiene.

Glutamin (figur 3.36): Glutamininnholdet i alle hippokampusprøvene (V.H og H1-H4) fra rottene injisert med 1 og 10 nmol soman i GD var høyere enn for rottene injisert med 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll). Økningen i totalt glutamininnhold etter injeksjon av 1 nmol soman var signifikant i hippokampusprøvene H1 ($p < 0.05$) og H3 ($p < 0.05$), og i H1 ($p < 0.01$) og H2 ($p < 0.05$) etter injeksjon av 10 nmol soman i forhold til kontroll. Økningen i totalt glutamininnhold var størst etter injeksjon av 10 nmol soman i prøvene V.H, H1, H2 og H4. I H3 var økningen størst etter injeksjon av 1 nmol soman.

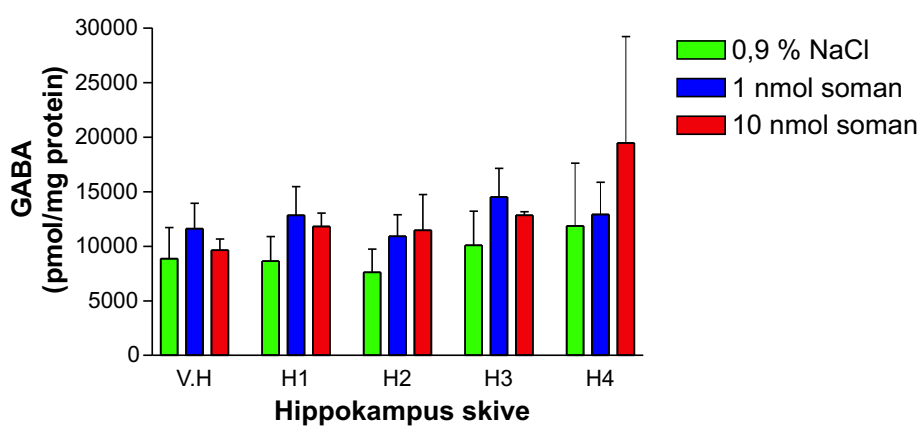
Alanin (figur 3.37): Alanininnholdet i alle hippokampusprøvene (V.H og H1-H4) fra rottene injisert med 1 og 10 nmol soman i GD var høyere enn for rottene injisert med 1 μ l 0,9 % NaCl (kontroll). Økningen i totalt alanininnhold etter injeksjon av 1 nmol soman var signifikant i hippokampusprøvene H1 og H3, og i H1 og H2 etter injeksjon av 10 nmol soman i forhold til kontroll ($p < 0.05$). Injeksjon av 1 og 10 nmol soman ga omtrent samme økning i alanininnhold i hippokampusskivene i forhold til kontrolldyr.



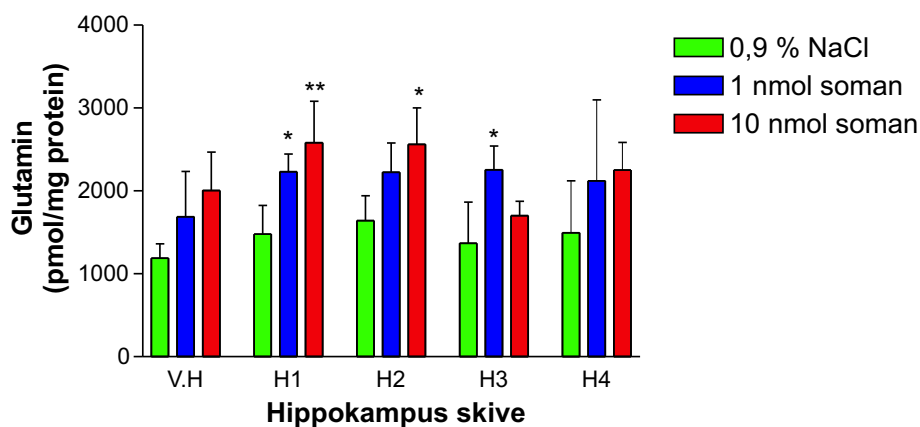
Figur 3.33: Totalinnhold av endogen glutamat fra rotte hippokampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. V.H=prøver fra midtre del av venstre hippokampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippokampus. Verdiene er presentert som pmol glu/mg protein ($\bar{x} \pm SD$). $n=4$ for 0,9 % NaCl, $n=5$ for 1 nmol soman, og $n=2$ for 10 nmol soman. Ved signifi kante forskjeller * $p < 0.05$.



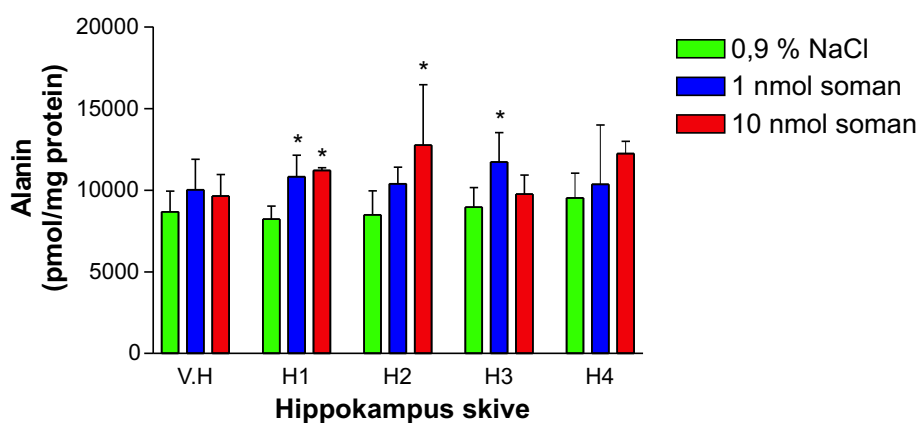
Figur 3.34: Totalinnhold av endogen aspartat fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol asp/mg protein ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman. Ved signifi kante forskjeller *p<0.05.



Figur 3.35: Totalinnhold av endogen GABA fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol GABA/mg protein ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman.



Figur 3.36: Totalinnhold av endogen glutamin fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol gln/mg protein ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman. Ved signifi kante forskjeller *p<0.05, **p<0.01.



Figur 3.37: Totalinnhold av endogen alanin fra rotte hippocampusskiver etter mikroinjeksjon av 1 μ l 0,9 % NaCl eller 1 og 10 nmol soman løst i 1 μ l 0,9 % NaCl. V.H=prøver fra midtre del av venstre hippocampus. H1-H4=prøve 1-4 fra høyre hippocampus. Verdiene er presentert som pmol ala/mg protein ($\bar{x} \pm SD$). n=4 for 0,9 % NaCl, n=5 for 1 nmol soman, og n=2 for 10 nmol soman. Ved signifi kante forskjeller *p<0.05.

Kapittel 4

Diskusjon

Hippokampusskiver *in vitro* er tidligere benyttet i en rekke ulike studier av aminosyre nevrotransmitter frisetting (Szerb, 1988; Muzzolini *et al.*, 1997; Hadjiivanova & Georgiev, 1998; Øydvin, 1998; Savage *et al.*, 2001). Det er gjennomført mange studier for å undersøke effekten av organofosfater på ekstracellulærnivå og totalinnhold av aminosyrer og ACh *in vivo* i hippokampus etter systemisk administrering av organofosfater, men få studier har undersøkt effekter av organofosfater på *in vitro* frisetting av aminosyrer fra hippokampusskiver. Denne oppgaven har som målsetting å beskrive effektene av soman på frisetting av den eksitatoriske aminosyren glutamat og aminosyrer generelt ved eksponering direkte på hippokampusskiver *in vitro*, for å vurdere om slike metoder kan brukes for å studere interaksjonen mellom kolinerge og glutamaterge nevroner ved organofosfatforgiftninger. Siden denne metoden viste seg ikke å gi endringer i frisetting av nevrotransmitteren glutamat eller andre aminosyrer, besluttet jeg å etablere en metode for å studere effekter av nervegass ved direkte injeksjon i hippokampus *in vivo*. I dette eksperimentelle oppsettet etablerte jeg en metode for parallelt å kunne registrere elektrisk aktivitet i hippokampus samtidig med injeksjon av soman. Målsetningen var å undersøke om *in vivo* mikroinjeksjon av soman kunne gi grunnlag for studier av adferd, EEG, thetaaktivitet og *in vitro* studier av aminosyrefrisetting fra hippokampusskiver.

4.1 Metode diskusjon

Stimulering av hippokampusskiver med KCl og elektrisk felt

I denne oppgaven ble det benyttet to ulike typer stimuleringsparametre for å aktivere frisetting av ³H-glutamat og endogene aminosyrer fra hippokampusskiver. Både kjemisk stimulering med KCl-buffer (Blaustein & Goldring, 1975; Scott & Nicholls, 1980) og elektrisk felt stimulering (Savage *et al.*, 2001) resulterer i

depolarisering av nevroner og påfølgende frisetting av neurotransmittere fra ulike typer synapser (Muzzolini *et al.*, 1997; Savage *et al.*, 2001). Frisetting av ^3H -glutamat ved både kjemisk og elektrisk stimulering viste seg i mine forsøk å være direkte korrelert til henholdsvis KCl-konsentrasjon og frekvens av elektrisk felt stimulering. Ulike KCl-konsentrasjoner og frekvens stimuleringer ble benyttet for å studere ^3H -glutamat og frisetting av endogene aminosyrer ved perfusjon med buffer med soman, ettersom frisettings-kinetikken for de ulike aminosyrene ikke var kjent. I tillegg var det ikke fastlagt hvor sterk aktivering (frekvens eller KCl-konsentrasjon) som var nødvendig for å detektere en eventuell sekundær effekt av soman på frisetting av ^3H -glutamat og endogene aminosyrer, som følge av en primær effekt via inhibering av AChE.

Stimulering med KCl er tidligere vist å kunne føre til en betydelig Ca^{2+} -uavhengig frisetting av aminosyre neurotransmittere i tillegg til den Ca^{2+} -avhengige nevronale frisettingen (Carvalho *et al.*, 1986; Ikeda *et al.*, 1988; Nicholls, 1989; Adam-Vizi, 1992; Bernath, 1992), mens frisetting av glutamat ved elektrisk felt stimulering tidligere er vist å kunne være opptil 90 % Ca^{2+} -avhengig (Savage *et al.*, 2001). Stimulering med KCl kan reversere aminosyretransportører i nevroner og astrocytter ved reduksjon av Na^+ -gradienten over cellemembranen, og dermed bidra til Ca^{2+} -uavhengig aminosyrefrisetting (Szatkowski *et al.*, 1990; Attwell *et al.*, 1993; Patterson *et al.*, 1994). Av den grunn valgte jeg å undersøke effekten av soman på frisettingen av ^3H -glutamat ved elektrisk stimulering, til tross for at egne data fra Ca^{2+} -avhengighetsforsøket indikerte at det ikke var noen differanse mellom Ca^{2+} -avhengig frisetting av ^3H -glutamat ved kjemisk og elektrisk stimulering. I tillegg til dette var elektrisk stimulering rent praktisk enklere å gjennomføre. Siden resultatene viste at elektrisk feltstimulering ikke økte frisetting av endogene aminosyrer i forhold til basalfrisetting, ble effekten av soman på frisetting av endogene aminosyrer *in vitro* undersøkt ved kjemisk stimulering med KCl-buffer.

Valg av forsøksdyr

Mange studier av nevrokjemiske forandringer *in vivo* etter organofosfatforgiftning er blitt utført på rotte. Tidligere studier har imidlertid vist at marsvin er en bedre ikke-primat-modell for å forutsi effekten av ulike behandlinger ved organofosfat-forgiftning i primater (Berry & Davies, 1970; Gordon *et al.*, 1978; Dirnhuber *et al.*, 1979; Inns & Leadbeater, 1983). Hippokampusskiver fra marsvin ble derfor valgt som modell i *in vitro* studiene av effektene av soman. For *in vivo* studiene valgte jeg derimot å benytte hippokampus fra rotte som modell. Bakgrunnen for dette valget er at hjerneanatomien hos rotte er veldefinert (Paxinos & Watson, 1982) og det foreligger kjente eksperimentelle modeller for registrering av elektrisk aktivitet i hippokampus og modellen er etablert i forskningsgruppen.

Det er dessuten enklere å registrere adferdsendringer hos rotte enn hos marsvin. For videre studier innen dette feltet bør det vurderes om hvorvidt en *in vivo* modell også for marsvin bør etableres, på bakgrunn av at marsvin er ansett for å være en bedre model for studier av effekter av organofosfater i primater.

Frisetting av ^3H -glutamat kontra frisetting av endogene aminosyrer

Konsentrasjonsendring av ACh eller aminosyrer i perfusatet etter kjemisk eller elektrisk stimulering og/eller perfusjon med soman i buffer, kan skyldes flere årsaker; økt frisetting av neurotransmittere fra nevroner (Ca^{2+} -avhengig frisetting) eller uspesifikk frisetting fra nevroner og astrocytter (Ca^{2+} -uavhengig frisetting) (Nicholls & Attwell, 1990), eller endringer i re-opptak eller nedbrytning av neurotransmittorer (for ACh ved f.eks inhibering av AChE).

Måling av neurotransmitter frisetting med radioaktive analoger er ansett å være en sensitiv metode for registrering av små endringer i frisetting. Sannsynligvis er forskjellen mellom basal og elektrisk stimulert frisetting av endogene aminosyrer i frekvensområdet 1-20 Hz for liten til å kunne detekteres ved HPLC-analyse i mine studier. Resultatene mine viste at frisetting av endogene aminosyrer fra marsvin hippocampusskiver ved elektrisk stimulering ikke førte til signifikante endringer i forhold til basalfrisetting. Dette er i motsetning til resultatene hvor jeg viste at ^3H -glutamat frisettes ved økende elektrisk stimulering (1-20 Hz). Resultatene mine er derimot i samsvar med tidligere studier hvor det er vist at en økning i frisetting av endogene aminosyrer (glutamat og aspartat) ved elektrisk felt stimulering først kunne detekteres ved stimulering med frekvenser som var høyere enn det som ble benyttet i mine forsøk (Szerb, 1988; Orrego & Villanueva, 1993; Muzzolini *et al.*, 1997). Perfusjon av hippocampusskiver med glutamattransportør hemmeren t-PDC (Bridges *et al.*, 1991) har vist å øke konsentrasjonene av endogent glutamat i perfusat ved elektrisk stimulering (Waldmeier *et al.*, 1993; Muzzolini *et al.*, 1997), så årsaken til den manglende frisetting av aminosyrer ved stimulering i frekvensområdet 1-20 Hz kan skyldes effektivt re-opptak av aminosyrer i nevroner og astrocytter etter frisetting (Hertz, 1979; Kanai *et al.*, 1993; Danbolt, 1994).

Resultatene fra mine studier viste også at frisetting av neurotransmittere glutamat, aspartat og GABA økte ved kjemisk stimulering i forhold til basalfrisetting, mens tilsvarende økning i frisetting av aminosyrene glutamin og alanin, som ikke antas å ha en neurotransmitter rolle i hippocampus, var liten. Dette kan tyde på at effekten av KCl-stimulering ikke generelt øker frisetting av endogene aminosyrer ved Ca^{2+} -uavhengig mekanismer.

In vitro KCl-stimulering har også i tidligere studier vist å øke frisetting av glutamat, aspartat og GABA fra hippocampusskiver (Muzzolini *et al.*, 1997; Hadjiivanova & Georgiev, 1998). Ved stimulering med 100 mM KCl var frisetting av aminosyrene glutamat, GABA og glutamin i mange tilfeller redusert i for-

hold til stimulering med 75 mM KCl. En hypotese for denne reduksjonen ved høy grad KCl-stimulering, er at høy ekstracellulær konsentrasjon av K^+ -ioner kan indusere ødemdannelse i nevroner forårsaket av en forsyrrelse i den osmotiske balansen (Lund-Andersen & Hertz, 1970; Pasantés-Morales & Schousboe, 1989; Schousboe *et al.*, 1990). Ødemdannelse vil redusere det intercellulære rommet mellom nevronene (Hrabetova *et al.*, 2002), og dermed kunne hindre frisetting av aminosyrer fra nevronene ut i perfusjonsbufferen. På bakgrunn av disse resultatene bør eventuelle studier av effekter av organofosfater på neurotransmitter frisetting fra hippokampusskiver, studeres ved perfusjon med KCl-buffer lavere enn 100 mM KCl.

4.2 Resultat diskusjon

Tidligere studier utført ved systemisk administrasjon av soman *in vivo* har påvist en vedvarende økning i den ekstracellulære konsentrasjonen av glutamat i limbiske strukturer, som oppstår ca 5-10 minutter etter start av somaninduserte sentrallnervøse anfall (Wade *et al.*, 1987; Lallement *et al.*, 1991a; Lallement *et al.*, 1991b). Lallement *et al.* (1992a) har vist at økningen i den ekstracellulære konsentrasjonen av glutamat i hippokampus ved somanforgiftning er sterkt influert av kolinerge aktivering fra nevroner i MS og BD. Den kolinerge aktiveringen kan enten virke direkte i hippokampus eller via aktivering av glutamaterge projeksjoner fra EC (PP). Det foreligger informasjon som tyder på en direkte interaksjon mellom kolinerge og glutamaterge systemer i hippokampus ved organofosfat intoksikasjon. Under slike forgiftninger hemmes AChE mer eller mindre reversibelt slik at høye lokale konsentrasjoner av ACh kan modulere frisettingen av glutamat ved binding til muskarine og nikotine reseptorer lokalisert på glutamaterge nerveterminaler (Marchi & Raiteri, 1989; Gray *et al.*, 1996). Videre har muskarine agonister i flere tidligere studier vist å kunne aktivere glutamatreseptorer i hippokampus (Burgard & Sarvey, 1990; Markram & Segal, 1990). Studier av cellulære mekanismer i koplingen mellom kolinerge og glutamaterge nerveceller kan derfor være viktig for utviklingen av fremtidige legemidler mot organofosfat-forgiftning og påfølgende skader i hjernen. Spesielt bør effekter av antagonist til sub-seter i neurotransmitter reseptorer studeres nærmere.

4.2.1 Ca^{2+} -avhengig frisetting

Studiene mine viser at frisettingen av 3H -glutamat reduseres med ca 40-50 % både ved elektrisk og kjemisk stimulering når Ca^{2+} -konsentrasjon i buffer reduseres fra 2 mM til 0,1 mM. Tidligere studier utført med KCl-stimulering på

hippokampusskiver har vist en Ca^{2+} -avhengighet på mellom 40-80 % ved frisetting av endogen glutamat (Ikeda *et al.*, 1988; Muzzolini *et al.*, 1997), mens frisetting ved elektrisk stimulering er vist å være opptil 90 % Ca^{2+} -avhengig (Savage *et al.*, 2001). Frisetting av neurotransmittorer er Ca^{2+} -avhengig (Katz & Miledi, 1965; Katz, 1969), og den andelen av den totale frisettingen som ikke frisettes ved perfusjon med lav Ca^{2+} buffer (40-50 %) antas å bli frisatt synaptisk fra nevronale lager (Bernath, 1992). Den resterende frisettingen av ^3H -glutamat ved kjemisk og elektrisk stimulering (50-60 %) har sannsynligvis sitt opphav fra uspesifikk frisetting fra astrocyter og nevroner ved bl.a. reversering av glutamattransportører (Szatkowski *et al.*, 1990; Attwell *et al.*, 1993). Den høye Ca^{2+} -uavhengige frisettingen av ^3H -glutamat fra hippocampusskivene ved elektrisk feltstimulering kan ha bidratt til å kamuflere en eventuell økning i synaptisk frisatt ^3H -glutamat fra nevronale lager, som en følge av kolinerg aktivering av glutamaterge nevroner etter *in vitro* perfusjon av hippocampusskiver med soman. Dette fenomenet bør kartlegges nærmere hvis slike metoder skal benyttes i studier av organofosfat induisert hjerneskade.

4.2.2 *In vitro* perfusjon av hippocampusskiver med soman i perfusjonsbuffer

Tidligere studier utført ved FFI har vist at *in vitro* perfusjon av hippocampusskiver med 1 μM soman i buffer øker frisettingen av ACh i forhold til kontroll (Øydvin, 1998). Derfor var målsetningen å undersøke om perfusjon av hippocampusskiver med soman i buffer kunne modulere frisetting av den eksitatoriske aminosyren glutamat og andre endogene aminosyrer som en følge av økt kolinerg aktivering av glutamaterge nevroner.

Effekten av soman på ^3H -glutamatfrisetting fra marsvin hippocampusskiver

Resultatene viste ingen signifikante forskjeller i frisettingen av ^3H -glutamat ved perfusjon med 10 μM soman og elektrisk stimulering i forhold til kontrollstimulering uten soman perfusjon. Det var heller ikke signifikant forskjell i frisettingen ved elektrisk stimulering 40 minutter etter soman perfusjon. Dette kan være et resultat av at soman ikke modulerer frisetting av glutamat fra hippocampusskiver *in vitro*, verken direkte eller indirekte gjennom hemming av AChE, eller at metoden som brukes for å måle somaninduserte endringer med ^3H -glutamat ikke er sensitiv nok for slike studier. Re-opptaket av ekstracellulært glutamat i nevroner og astrocytter kan være tilstrekkelig effektivt (Hertz, 1979; Kanai *et al.*, 1993; Danbolt, 1994), slik at en eventuell økning i ^3H -glutamatfrisetting ved soman perfusjon blir kamuflert. Jeg benyttet ikke glutamat opptakshemmere men effekten av slike hemmere på glutamat frisettingen ved soman perfusjon bør studeres i

videre arbeid.

Tidligere studier som indikerer en økt frisetting av glutamat i hippocampus er i motsetning til våre studier utført ved systemisk administrasjon av soman *in vivo* og målinger utført med mikrodialyse i CA1 og CA3 (Lallement *et al.*, 1991a; Lallement *et al.*, 1992a). Ved start av nervegass-indusert anfall er en økning i ekstracellulært ACh-nivå den eneste merkbare forandringen i nivået av eksitatoriske og inhibitoriske neurotransmittere i hjernen *in vivo* (Shih, 1982; Shih *et al.*, 1986; Fosbraey *et al.*, 1990; Lallement *et al.*, 1992b). Den ekstracellulære glutamatkonsentrasjonen i hippocampus øker først etter 5-10 minutter etter start av somanindusert anfall (Lallement *et al.*, 1991a; Lallement *et al.*, 1992a). I tillegg har Lallement *et al.* (1991a) vist at en økning i det ekstracellulære nivået av aminosyrene glutamat og glutamin i hippocampus ved somanforgiftning var sterkt relatert til forekomst av sentralnervøse anfall. Det er av den grunn mulig at hippocampus er avhengig av intakte forbindelser til MS, BD og eventuelt andre kolinerge forbindelser, for å kunne aktivere glutamaterge nevroner og derved forårsake økt glutamatfrisetting ved somanforgiftning. Det er derfor mulig at *in vitro* metoder generelt er mindre velegnet for slike studier enn *in vivo* studier. Videre har McDonough *et al.* (1993) vist at mange hjernestrukturer, som f.eks amygdala og piriform korteks, har en lavere terskel for initiering av nervegass indusert anfall en hippocampus. Den økte ekstracellulære glutamatkonsentrasjonen observert ved mikrodialyse i hippocampus kan derfor ha blitt forårsaket av aktivering via ikke-kolinerge fibre fra andre hjerneområder. Tidligere studier som har undersøkt aminosyrenivået i homogenisater av hippocampus etter initiering av somaninduserte anfall, har imotsetning til studier utført med mikrodialyse ikke kunne påvise en endring i glutamatinholdet (Fosbraey *et al.*, 1990; Shih & McDonough, 1997). I tillegg er det vist at ACh kan ha både eksitatorisk og inhibitorisk effekt på glutamaterge nevroner i hippocampus (se innledning avsnitt 1.4.3). Det er derfor en mulighet for at årsaken til de små forskjellene i resultatene som jeg har observert, er at summen av den stimulerende og inhibitoriske effekten av kolinerg innervering på glutamaterge nevroner ved somanforgiftning utjevner hverandre.

ACh-frisetting

Den forventete økningen i frisettingen av ^3H -glutamat fra hippocampuskiver etter perfusjon med soman i buffer ved elektrisk stimulering kunne ikke påvises i *in vitro* forsøkene mine. Tidligere studier har vist at den økte ekstracellulære glutamatkonsentrasjonen i hippocampus ved *in vivo* somanforgiftning er avhengig av en økt kolinerg aktivering (Lallement *et al.*, 1992a). På bakgrunn av dette ville jeg undersøke om ACh ble frisatt i samme frekvensområdet som ble benyttet for å måle frisetting av ^3H -glutamat ved elektrisk stimulering (0-30 Hz). Ved elektrisk stimulering fulgte frisetting av endogen ACh og ^3H -glutamat et svært

likt forløp ved elektrisk stimulering, og i begge tilfellene ble maksimal frisetting oppnådd ved ca 10 Hz. Det var derfor ikke indikasjoner på utilstrekkelig aktivering av de eksisterende kolinerge nevronene ved de frekvenser som ble benyttet til å studere frisetting av ^3H -glutamat fra hippokampusskiver under soman perfusjon.

Effekten av soman på *in vitro* frisetting av endogene aminosyrer fra marsvin hippokampusskiver

Frisetting av aminosyrene glutamat, aspartat, GABA, glutamin og alanin ble målt etter *in vitro* eksponering til soman. Aminosyrene glutamat og aspartat er eksitotoksiske (Olney *et al.*, 1974) og antas å spille en viktig rolle i utviklingen av somanindusert hjerneskade (Braitman & Sparsborg, 1989; Lallement *et al.*, 1991a; Lallement *et al.*, 1993a). Glutamin dannes fra glutamat som er akkumulert i astrocytter (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Sisjö, 1978; Nicholls & Attwell, 1990), og ble målt fordi den er en forløper for neurotransmitteren glutamat. GABA er en inhibitorisk neurotransmitter i CNS, og studier utført av Fosbraey *et al.* (1990) og Shih & McDonough (1997) har vist at GABA konsentrasjonen i homogenat fra CNS øker i tiden mellom 20-60 minutter etter initiering av somaninduserte sentralnervøse anfall i hjernen. Aminosyren alanin ble i disse studiene benyttet som en markør på uspesifikk ikke-nevrontal frisetting av endogene aminosyrer ved KCl-stimulering, siden alanin ikke er en neurotransmitter i CNS.

Ved stimulering med 75 mM KCl-buffer med soman var frisettingen av aminosyrene glutamat, GABA og glutamin redusert i forhold til perfusjon med kontrollbuffer, både i forsøksserien stimulert i fraksjonene **A**, **B** og **C** og ved stimulering kun i fraksjon **A**. Dette indikerer at soman kan redusere frisetting av aminosyrene glutamat, GABA og glutamin, og at effekten av soman først er synlig ved stimulering med 75 mM KCl, som er en stimulering nær det som gir 50 % av maksimal frisetting av ^3H -glutamat. Tidligere *in vivo* studier har ikke kunnet påvise en reduksjon i verken glutamat, glutamin eller GABA-nivået i hippokampus eller andre hjerneområder ved somanforgiftning, verken i ekstracellulær væske (Lallement *et al.*, 1991a; Lallement *et al.*, 1992a; Lallement *et al.*, 1993b) eller i homogenat (Fosbraey *et al.*, 1990; Shih & McDonough, 1997). Reduksjonen i aminosyrefrisetting ved stimulering med 75 mM KCl kan derfor enten være et resultat av en ukjent effekt av soman på glutamat, GABA og glutaminfrisetting, eller et resultat av tilfeldige variasjoner i analysen og eventuelle metodiske unøyaktigheter ettersom antall forsøk var relativt lavt (n=2-4). Flere årsaker peker mot at resultatene gir grunn til å konkludere at soman *ikke* gir en reduksjon i frisetting av aminosyrene glutamat, GABA og glutamin. I de forsøkene hvor jeg benyttet stimulering med 100 mM KCl kun i fraksjon **A** var frisetting ved perfusjon med soman høyere eller lik kontroll for de tre aminosyrene. I tillegg var forholdet mellom frisetting av aminosyrene glutamat, glutamin og

GABA svært lik ved økende KCl-stimulering ved både soman perfusjon og perfusjon med kontrollbuffer, til tross for at de spiller svært ulike nevrokjemiske roller i hjernen. Ved stimulering med 75 mM KCl i forsøksserien hvor jeg stimulerte i fraksjon **A,B** og **C**, var frisettingen av aminosyren alanin ved soman perfusjon signifikant redusert i forhold til kontroll. Årsaken til denne reduksjonen er ikke kjent, men alanin er ikke en neurotransmitter i hjernen og det er ikke rapportert noen effekter av soman på frisettingen av denne aminosyren tidligere. På bakgrunn av dette forventet jeg ikke å finne en endring i frisetting av alanin ved KCl-stimulering eller soman perfusjon. Ettersom reduksjonen i alaninfrisetting var sammenfallende med reduksjonen i glutamat, glutamin og GABA-frisetting ved soman perfusjon og stimulering med 75 mM KCl, gir dette økt grunn til å tro at de observerte reduksjonene i glutamat, glutamin og GABA-frisettingen ved soman perfusjon ikke er et en effekt av soman, men et resultat av tilfeldig variasjon og eventuelt metodiske unøyaktigheter p.g.a. få forsøk.

Ved å sammenlikne med tidligere *in vivo* studier utført ved systemisk administrasjon av soman indikerer disse resultatene at aminosyrefrisetting ved *in vitro* soman perfusjon, i likhet med frisetting av ³H-glutamat, ikke gir et representativt bilde av nevrokjemiske forandringer i hippokampus ved somanforgiftning.

AChE- og BuChE-aktiviteten

AChE- og BuChE-aktiviteten i alle hippokampusskivene var tilnærmet fullstendig hemmet etter perfusjon med soman (10 µM) i buffer. Etter soman perfusjon var restaktiviteten av AChE mellom 0,5-5,5 % og tilsvarende verdier for BuChE-aktiviteten var mellom 0-10 % i forhold til kontroll. Til tross for at AChE- og BuChE-aktiviteten var lav i homogenatet, er dette ingen garanti for at AChE lokalisert i de kolinerge synapsene blir tilstrekkelig hemmet *in vivo*. AChE i hjernen er lokalisert i kolinerge synapser (Siegel *et al.*, 1999) og AChE-aktiviteten utgjør den kvantitativt viktigste kolinesterasen i hippokampus. I tillegg til det nevronale AChE foreligger det, som vist i mine forsøk, en lav konsentrasjon av BuChE i hjernen. BuChE-aktiviteten er svært lav i forhold til AChE-aktiviteten og spiller antakelig ingen vesentlig rolle for hydrolyse av ACh i synapsene i vevet. BuChE fra plasma og AChE fra røde blodlegemer i hippokampusskivene vil også kunne bidra til hydrolyse av ACh i homogenater av hjernen. Restaktivitetene av AChE og BuChE i homogenater av hippokampus etter enzyminhibering med soman gir av den grunn ikke et direkte mål på den synaptiske AChE-aktiviteten. Det er interessant å merke seg at tidligere studier har vist at AChE-aktiviteten i blodlegemer kan være hemmet opptil 90 % med karbamater parallelt med at AChE-aktiviteten i hjernen er hemmet opptil 50 % uten at observerbare symptomer har forekommet hos marsvin (Personlig kontakt, Dr. Janet Wetherell, Dstl, Porton Down, Storbritannia). Videre er det vist at kolinesteraseaktiviteten i

plasma hos rotte kan være hemmet opptil 70 % før toksiske effekter av somanforgiftning er observert (Walday *et al.*, 1993). Manglende økning i frisetting av ³H-glutamat og endogene aminosyrer ved *in vitro* soman perfusjon kan av den grunn ikke utelukkes å være forårsaket av en lav grad av inhibering av synaptisk AChE.

4.2.3 Effekten av *in vivo* mikroinjeksjon av soman på hippokampal EEG og thetaaktivitet

Adferdsregistrering og EEG

Forsøkene hvor rotter fikk injisert 1 nmol soman direkte i hippokampus resulterte i at 33 % av dyrene fikk sporadiske kramper og epileptiformt EEG, og ett av to dyr injisert med 10 nmol soman fikk kontinuerlige kramper og epileptiformt EEG. Anfallet utløst av injeksjon av 10 nmol soman var adferdsmessig svært likt sentralnervøse anfall observert i rotter etter systemisk administrasjon av toksiske doser soman (personlig observasjon). Dette kan tyde på at inhibering av AChE-aktiviteten i hippokampus er tilstrekkelig til å utløse sentralnervøse anfall i CNS. Selv om det ikke ble gjennomført histokjemisk farging av hjernesliver etter injeksjon av 10 nmol soman for å kartlegge diffusjonene av soman fra injeksjonsstedet, er det grunn til å anta at injeksjon av 10 nmol soman vil resultere i hemming av AChE-aktiviteten i et større område enn ved injeksjon av 1 nmol soman. Injeksjon av 1 og 10 nmol soman inhiberte AChE i hippokampussliver i nærheten av injeksjonsstedet (H1-H3). Ved injeksjon av 1 nmol soman ble AChE både i hippokampus og hjernestrukturer i nærheten av høyre hippokampus også inhibert, spesielt i korteks, høyre habenularkjerne og deler av fimbria (figur 3.25). Det er derfor usikkert om de observerte adferdsendringene etter injeksjon av 1 og 10 nmol soman skyldes effekter av AChE-inhibering utelukkende i hippokampus, eller om endringene var et resultat av AChE-inhibering i hippokampus og i andre hjerne strukturer som en følge av diffusjon av soman fra injeksjonsstedet. Spredning av soman til andre hjernestrukturer enn hippokampus kunne antakelig vært unngått hvis soman løst i 1 µl 0,9 % NaCl hadde blitt injisert over en noe lengre tidsperiode på f.eks ti minutter isteden for ett minutt. Den korte tiden fra injeksjon av soman til initiering av anfallet (1-2 min) tyder på at anfallet induseres av øyeblikkelige nevrokjemiske forandringer som et resultat av reduksjonen i AChE-aktiviteten, sannsynligvis som en følge av økt ACh-nivå i hippokampus. Tidligere studier har viste lignende adferdsendringer ved mikroinjeksjon av 11 nmol soman i amygdala, men ikke i hippokampus (McDonough *et al.*, 1987).

Theta- og LIA-aktivitet

Dannelse av thetarytme i hippokampus er avhengig av kolinerg og GABAerg input fra mediale septum, og balansen mellom det kolinerge og det GABAerge systemet avgjør om synkron (theta) eller asynkron (LIA) aktivitet oppstår (Bland & Oddie, 2001). Mikroinjeksjon av soman i hippokampus ble derfor antatt å kunne gi endringer i theta aktiviten, via inhibering av AChE som resulterer i økt kolinerg effekt gjennom høyere aktivering fra nevroner i MS og BD. I andre studier er det vist at systemisk administrasjon av organofosfatet paroxon har kunnet indusere en lav-frekvent (3-7 Hz) atropin-sensitiv thetarytme i hippokampus (Lamanche *et al.*, 1980).

Thetafrekvensen i GD og CA1 varierte mellom ca 7,5 og 9,0 Hz gjennom hele måleperioden etter injeksjon av 0,9 % NaCl og 1 og 10 nmol soman. Det var ingen klar effekt av somaninjeksjon, men etter injeksjon av 10 nmol soman var thetafrekvensen i GD høyere i forhold til kontroll i de fleste tidsintervaller. Registrering i ett dyr gir likevel ikke grunnlag for å konkludere om frekvensøkningen var en tilfeldighet eller en reell effekt av somaninjeksjon. Tidligere studier utført av Vanderwolf (1969) har vist at theta frekvensen er knyttet til hvor raskt en type 1 adferd gjennomføres. Jo raskere en bevegelse gjennomføres, jo høyere blir frekvensen på theta-aktiviteten. Dette kan forklare den store variasjonen i thetafrekvensen som ble observert over tid i forsøkene mine. Av samme grunn er dermed endringer i theta frekvensen sannsynligvis et dårlig mål for graden av organofosfatforgiftning i hippokampus ved mikroinjeksjon i GD.

Reduksjonene i theta og LIA-amplituden i GD og CA1 0-1 minutter etter injeksjon var sannsynligvis ikke en effekt av AChE-inhiberingen som følge av soman eksponering, men en direkte effekt av selve injeksjonen ettersom reduksjonen ble registrert etter injeksjon av både soman og 0,9 % NaCl. Reduksjonene i theta og LIA-amplituden i både GD og CA1 varierte fra dyr til dyr tilsynelatende uavhengig av hvilken løsning som ble injisert og stabiliserte seg etter ca 2 minutter på samme nivå for de fleste injeksjonen. Reduksjonen i LIA-amplituden i tidsintervallet 0-2 minutt i CA1 etter injeksjon av 1 nmol soman var betydelig større enn kontroll, men registrering i ett dyr gir ikke grunnlag for å konkludere om amplitudereduksjonen var en reell effekt av somaninjeksjon eller en tilfeldighet. Mikroinjeksjon av soman og inhibisjon av AChE i hippokampus ser derfor ikke ut til å påvirke theta eller LIA-aktiviteten i forhold til kontrolldyr injisert med 0,9 % NaCl. Disse resultatene er i samsvar med et tidligere forsøk som viste at effekten av organofosfater på thetarytmen ved systemisk administrasjon ikke hovedsakelig styres av effekter direkte på hippokampus, men av effekter på pacemakerceller i MS (Nio & Breton, 1994).

4.2.4 Effekten av *in vivo* mikroinjeksjon av soman på *in vitro* frisetting av ACh og endogene aminosyrer

Ved *in vivo* mikroinjeksjon av soman vil den kolinerge innerveringen fra MS og BD være intakt, noe som ville gi bedre forutsetninger for kolinerg aktivering av glutamaterge nevroner i hippokampus enn ved *in vitro* perfusjon av hippokampus-skiver med soman. Jeg undersøkte derfor om *in vitro* frisetting av ACh og aminosyrer og totalinnhold av aminosyrer var endret i forhold til kontroll etter mikroinjeksjon av soman.

AChE- og BuChE-aktivitet og frisetting av endogen ACh

Frisetting av ACh ved kjemisk stimulering var signifikant høyere i hippokampus-skivene H1-H3 etter mikroinjeksjon av 1 og 10 nmol soman i forhold til kontroll forsøk. Disse resultatene er i samsvar med reduksjonen av AChE-aktiviteten observert i skiver fra samme område, med unntak av H1 mikroinjisert med 1 nmol soman. Diffusjon av soman ut fra injeksjonsstedet i høye nok konsentrasjoner for å inhiberte AChE-aktiviteten, var dermed begrenset i hippokampus til et område med en radius på ca 1,2-2,0 mm rundt injeksjonskanylen. Resultatene viser at ACh-nivået øker i takt med økende inhibering av AChE og er i samsvar med tidligere publiserte data som viser at inhibering av AChE og en økning i det ekstracellulære ACh-nivået er den tidligste detekterbare forandringen i CNS etter systemisk administrering av toksiske doser soman (Shih, 1982; Shih *et al.*, 1986; Fosbraey *et al.*, 1990; Lallement *et al.*, 1992b). Resultatene indikerer derfor at *in vitro* ACh-frisetting og AChE-aktivitet etter *in vivo* mikroinjeksjon av soman gjenspeiler effektene av soman på AChE-aktivitet og ACh-nivå i CNS etter systemisk administrasjon av toksiske doser soman.

Aminosyrefrisetting

Det ble ikke påvist signifikante endringer i basal eller KCl-indusert frisetting av endogen glutamat, aspartat, glutamin eller alanin i noen av de ulike hippokampus-skivene etter *in vivo* mikroinjeksjon av 1 og 10 nmol soman i forhold til kontroll. Den basale GABA-frisettingen etter injeksjon av soman var redusert for en del av skivene, men GABA-nivået i perfusjonsbuffer ved basalfrisetting var i flere tilfeller lavere enn deteksjonsgrensen for analyse med HPLC. Ettersom et GABA-nivå like under deteksjonsgrensen vil bli avlest som 0 pmol, og dermed bidra til en lavere gjennomsnittsverdi enn hva som faktisk er tilfelle, kan differansen i basal frisetting av GABA mellom soman perfunderede og kontrollskiver forklares som et resultat av et metodisk analyse problem. Resultatene viser at *in vivo* mikroinjeksjon av 1 og 10 nmol soman i hippokampus hos rotte ikke gir noen klar

effekt på *in vitro* frisetting av aminosyrene glutamat, aspartat, GABA, glutamin og alanin. For sammenlikning har tidligere *in vivo* studier utført av andre grupper etter systemisk administrasjon av soman, vist en økning i den ekstracellulære konsentrasjonen av glutamat og glutamin, men ingen endring i aspartat og GABA nivået i hippokampus (Lallement *et al.*, 1991a; Lallement *et al.*, 1993b). Mikrodialyse av striatum med 10 mM soman har tidligere vist å gi økt ekstracellulær konsentrasjon av aminosyrene glutamat, aspartat og GABA (Jacobsson *et al.*, 1997).

Totalt aminosyreinnhold i hippokampus

Endringer i aminosyreinnholdet i homogenat av hippokampus kan være en indikator på forandringer i frisetting, opptak eller metabolisme av aminosyrene. Forsøkene hvor frisetting av aminosyrer ble målt i perfusat er mer representative for ekstracellulære forandringer av aminosyrer som forekommer i vevet, slik som effekten av *in vivo* somaninjeksjon på *in vitro* frisettingen av ACh fra hippokampusskiver.

Totalinnholdet av glutamat og glutamin var signifikant høyere etter injeksjon av 1 og 10 nmol soman i forhold til kontroll i en del hippokampusskiver rundt injeksjonsstedet (H1-H3). Nivået av aminosyrene aspartat og GABA økte også noe i en del av skivene etter somaninjeksjon, men økningen var ikke dose-avhengig og kan av den grunn ikke antas å være en reell effekt av somaninjeksjon. Den parallelle økningen i glutamat og glutamininnholdet kan tyde på at somaninjeksjon i hippokampus har påvirket metabolismen av glutamat, ettersom nevrontalt glutamat kan metaboliseres til glutamin i astrocytter (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977; Sisjö, 1978; Nicholls & Attwell, 1990). En eventuell økning i *in vitro* frisetting av glutamat og andre aminosyrer i hippokampusskiver etter somaninjeksjon kan ha blitt maskert ved effektivt re-opptak via aminosyretransportører i nevroner og astrocytter (Hertz, 1979; Kanai *et al.*, 1993; Danbolt, 1994). I tillegg er organofosfater tidligere vist å også ha effekter på ulike ikke-kolinerge enzymer (Somani & Husain, 2001). Dette kan påvirke metabolismen av ulike aminosyrer og kan antakelig påvirke toatalinnholdet av aminosyrer i hippokampus homogenat etter mikroinjeksjon av soman. En annen mulighet er at økningen ikke skyldes somaninjeksjonen, men var et resultat av tilfeldige variasjoner i analysen og eventuelle metodiske unøyaktigheter. Den signifikant økning i alanininnholdet i hippokampusskivene H1-H3 er et resultat som tyder på dette. Alanin er ikke kjent å være en neurotransmitter i CNS, og det er ikke rapportert noen effekter av soman på denne aminosyren tidligere. I tillegg var forholdet mellom de ulike aminosyrene i de tre forskjellige forsøksgruppene svært like, til tross for at de spiller ulike nevrokjemiske roller i hjernen. Til sammenlikning har tidligere studier hvor totalinnholdet av aminosyrer er målt i hippokampushomogenat etter

systemisk administrasjon av soman, vist et uendret nivå av glutamat, reduksjon i aspartatnivået, økt eller uendret glutaminnivå, og økt nivå av GABA (Fosbraey *et al.*, 1990; Shih & McDonough, 1997). Flere forsøk bør gjennomføres for å få bekreftet om soman virkelig øker innholdet av noen av aminosyrene etter *in vivo* mikroinjeksjon i hippokampus, og om dette skyldes hemming av viktige enzymer i energimetabolismen, eller er en effekt av redusert AChE-aktivitet.

Nervegass-induserte endringer i aminosyrenivået i hippokampus varierer mye mellom studier som måler totalt aminosyreinnhold i vevshomogenat og studier som måler ekstracellulært nivå av aminosyrer med mikrodialyse (McDonough & Shih, 1997). Mine resultater indikerer at totalinnhold og *in vitro* frisetting av aminosyrer etter *in vivo* mikroinjeksjon av soman ikke gir et tilsvarende bilde av nevrokjemiske forandringer i hippokampus ved somanforgiftning, som ved sammenlikning med endringer observert i andre studier etter systemisk administrasjon av soman *in vivo* (Fosbraey *et al.*, 1990; Lallement *et al.*, 1991a; Lallement *et al.*, 1993b; Shih & McDonough, 1997).

Resultatene viser også at *in vivo* mikroinjeksjon og *in vitro* eksponering til soman gir et forskjellig grunnlag for å detektere en forandring i sammensetningen av aminosyrer i hippokampuskiver i forhold til *in vivo* studier utført med mikrodialyse av ekstracellulærvæske eller homogensering av hippokampusvev. Alle tidligere kjente studier av aminosyreforandringer i hippokampus etter somanforgiftning er utført *in vivo*. Svært lite er derimot kjent om effektene av soman på aminosyrefrisetting ved eksponering direkte i hippokampus, slik som denne studien har hatt som mål å undersøke, hvor man unngår en rekke uheldige perifere effekter av soman.

4.2.5 Konklusjon

In vitro perfusjon av hippokampuskiver med soman må ut i fra våre resultater vurderes å være en mindre egnet modell for å studere av effekten av soman på eksitatoriske aminosyrer i hippokampus. Resultatene samsvarer ikke med resultater fra *in vivo* studier av nevrokjemiske forandringer etter systemisk administrasjon av soman utført av andre grupper, noe som gjenspeiler hvor vanskelig det kan være å ekstrapolere data fra *in vitro* studier til *in vivo* forhold og vise versa. Selv om resultatene mine ikke gir entydige svar, er antakelig *in vivo* metoder mer velegnet for å studere nevronale effekter av organofosfater. Sentralnervøse effekter av organofosfat-forgiftninger involverer mange hjernestrukturer samtidig og toksisitetens forløpet endrer karakter over tid (Fosbraey *et al.*, 1990; Shih & McDonough, 1997; McDonough & Shih, 1997). Av den grunn bør framtidige studier for å utforske nevrokjemiske mekanismer og effekter av potensielle medikamenter for beskyttelse mot toksiske effekter av organofosfater utføres *in vivo*. Lokale injeksjoner av nervegasser, enten ved mikrodialyse eller mikro-

injeksjon, kan bli et nyttig redskap for å kartlegge betydningen av ulike hjerne-strukturer for utviklingen av nevrokjemiske forandringer og nevronale skader ved organofosfat-forgiftning. I tillegg gir slik administrering av organofosfater færre perifere symptomer på forgiftning enn ved systemisk administrasjon. De sentral-nervøse effektene av organofosfater er svært komplekse, og nevrokjemiske forandringer og nevronale skader i senere faser av forgiftningen er ofte avhengig av høy nevronal aktivitet i CNS (McDonough & Shih, 1997; Carpentier *et al.*, 2000). Derfor bør den terapeutiske effekten av potensielle farmaka som f.eks antagonister til den glutamaterge NMDA reseptoren undersøkes etter *in vivo* administrasjon av organofosfater i doser som gir *status epilepticus* og kramper.

4.3 Videre arbeid

For å kartlegge betydningen av kolinerg fibre fra MS og BD på glutamaterge systemer i hippokampus ved somanforgiftning bør forsøk med mikrodialyse og EEG-registrering i hippokampus hos fritt-bevegelige dyr gjennomføres. Ekstra-cellulær konsentrasjon av ACh og endogene aminosyrer, og endringer i EEG-aktivitet ved administrasjon med konvulsive doser med soman, bør sammenliknes hos dyr med intakte nervebaner (kontroll) og hos dyr med lesjoner i septum-kjernene.

Referanser

- Adam-Vizi, V. (1992). External Ca^{2+} -independent release of neurotransmitters. *J Neurochem*, **58**, 395–405.
- Amaral, D. G. & Kurz, J. (1985). An analysis of the origins of the cholinergic and noncholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol*, **240**, 37–59.
- Andersen, P. (1975). *Organization of the hippocampal neurons and their interconnections*, kapittel: The Hippocampus: Structure and development, side: 155–175. New York: Plenum Press.
- Andersen, P., Bliss, T. V. P., & Skrede, K. K. (1971). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Exp Brain Res*, **13**(2), 222–238.
- Andersen, P., Bland, B. H., & Dudar, J. D. (1973). Organization of the hippocampal output. *Exp Brain Res*, **17**, 152–168.
- Attwell, D., Barbour, B., & Szatkowski, M. (1993). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*, **11**, 401–407.
- Augustinsson, K. B. (1948). Cholinesterases; study in comparative enzymology. *Acta physiol Scand Suppl*, **52**, 1–182.
- Benardo, L. S. & Prince, D. A. (1982). Cholinergic excitation of mammalian hippocampal pyramidal cells. *Brain Res*, **249**(2), 315–331.
- Bernath, S. (1992). Calcium independent release of amino acid neurotransmitters: fact or artifact? *Prog Neurobiol*, **38**, 57–91.
- Berry, W. K. & Davies, D. R. (1970). The use of carbamates and atropine in the protection of animals against poisoning by 1,2,2-trimethylpropylmethylphosphorofluoridate. *Biochem Pharm*, **19**, 927–934.

- Blackstad, T. W., Brink, K., Hem, J., & Jeune, B. (1970). Distribution of hippocampal mossy fibers in the rat, An experimental study with silver impregnation methods. *J Comp Neurol*, **138**, 433–450.
- Bland, B. H. (1986). The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms. *Prog Neurobiol*, **26**(1), 1–54.
- Bland, B. H. (2000). *The behavioral neuroscience of the septal region*, volum 6, kapittel: The medial septum: node of the ascending brainstem hippocampal synchronizing, side: 115–145. Springer Verlag: New York.
- Bland, B. H. & Oddie, S. D. (2001). Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav Brain Research*, **127**, 119–136.
- Blaustein, M. P. & Goldring, J. M. (1975). Membrane potentials in pinched-off presynaptic nerve terminals monitored with fluorescent probe. *J Physiol*, **247**, 617–655.
- Braitman, D. J. & Sparensborg, S. (1989). MK-801 protects against seizure induced by the cholinesterase inhibitor soman. *Brain Res Bull*, **23**, 145–148.
- Bridges, R. J., Stanley, M. S., Anderson, M. W., Cotman, C. W., & Chamberlin, A. R. (1991). Conformationally defined neurotransmitter analogues. Selective inhibition of glutamate uptake by one pyrrolidine-2,4-dicarboxylate diastereomer. *J Med Chem*, **34**, 717–725.
- Brown, A. W., Aldrige, W. N., Street, B. W., & Verschoyle, R. D. (1979). The behavioral and neuropathologic sequelae of intoxication by trimethyltin compounds in the rat. *Am J Pathol*, **97**, 59–82.
- Brown, D. A. & Adams, P. R. (1980). Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K^+ current in vertebrate neurone. *Nature*, **283**, 673–676.
- Brown, D. A., Gahwiler, B. H., Griffith, W. H., & Halliwell, J. V. (1990). Membrane currents in hippocampal neurons. *Prog Brain Res*, **83**, 141–160.
- Brunner, H. & Misgeld, U. (1988). Muscarinic inhibitory effect in the guinea pig dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett*, **88**(1), 63–68.
- Burgard, E. C. & Sarvey, J. M. (1990). Muscarinic receptor activation facilitates the induction of long-term potentiation (LTP) in the rat dentate gyrus. *Neurosci Lett*, **116**, 34–39.

- Carpentier, P., Foquin, A., Rondouin, G., Lerner-Natoli, M., de Groot, D. M., & Lallement, G. (2000). Effects of atropine sulphate on seizure activity and brain damage produced by soman in guinea-pigs: ECoG correlates of neuropathology. *Neurotoxicology*, **21**(4), 521–540.
- Carvalho, C. M., Santos, S. V., & Carvalho, A. P. (1986). γ -Aminobutyric acid release from synaptosomes as influenced by Ca^{2+} and Ca^{2+} channel blockers. *Eur J Pharmacol*, **16**, 415–419.
- Caulfield, M. D. (1993). Muscarinic receptors, coupling and function. *Pharmacol Ther*, **58**, 319–379.
- Clement, J. G. & Broxup, B. (1993). Efficacy og diazepam and avizafone against soman-induced neuropathology in brain of rats. *Neurotoxicology*, **14**(4), 485–504.
- Clothier, B., Johnson, M. K., & Reiner, E. (1981). Interaction of some trialkyl phosphorothiolates with acetylcholinesterase: Characterization of inhibition, aging and reactivation. *Biochim Biophys Acta*, **660**, 306–316.
- Cogeshall, R. E. & MacLean, P. D. (1958). Hippocampal lesion following administration of 3-acetylpyridine. *Proc Soc Exp Biol Med*, **98**, 687–689.
- Danbolt, N. C. (1994). The high affinity uptake system for excitatory amino acids in the brain. *Prog Neurobiol*, **44**, 377–396.
- Dirnhuber, P., French, M. C., Green, D. M., Leadbeater, L., & Stratton, J. A. (1979). The protection of promates against soman poisonin by pretreatment with pyridostigmine. *J Pharm Pharmacol*, **31**, 295–299.
- Dunant, Y. & Israel, M. (2000). Neurotransmitter release at rapid synapses. *Soc Fran Biochime Bio Molécul*, **82**, 289–302.
- Eichenbaum, H. & Cohen, N. J. (2001). *From conditioning to conscious recollection: memory systems of the brain*. Oxford university press.
- Elliot, T. R. (1905). The action of adrenalin. *J. Physiol.*, **32**, 401–467.
- Erecinska, M. (1987). The neurotransmitter amino acid transport systems. A fresh outlook on an old problem. *Biochem Pharmacol*, **21**, 3547–3555.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem*, **42**(1), 1–11.
- Fonnum, F. (1998). Exitotoxicity in the brain. *Arch Toxicol Suppl*, **20**, 387–395.

- Fosbraey, P., Wetherell, J. R., & French, M. C. (1990). Neurotransmitter changes in guinea-pig brain regions following soman intoxication. *J Neurochem*, **54**(1), 72–79.
- Gasic, G. & Hollmann, M. (1992). Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol*, **54**, 507–536.
- Gaykema, R. P. A., Luiten, P. G. M., Nyakas, C., & Traber, J. (1990). Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J Comp Neurol*, **293**, 103–124.
- Gordon, J. J., Leadbeater, L., & Midement, M. P. (1978). The protection of animals against organophosphate poisoning by pretreatment with carbamate. *Tox Appl Pharmacol*, **43**, 207–216.
- Gray, R., Rajan, A. S., Radcliffe, K. A., Yakehiro, M., & Dani, J. A. (1996). Hippocampal synaptic transmission enhanced by low concentration of nicotine. *Nature*, **383**, 713–716.
- Green, J. D. (1964). The hippocampus. *Physiol Rev*, **44**, 561–608.
- Hadjiivanova, C. H. & Georgiev, V. (1998). In vitro effect of angiotensin on GABA release in rat hippocampus. *Neuropeptides*, **5**, 431–434.
- Halliwel, J. V. & Adams, P. R. (1982). Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res*, **250**, 71–92.
- Hertz, L. (1979). Functional interaction between neurons and astrocytes. I. Turnover and metabolism of putative amino acid transmitters. *Prog Neurobiol*, **13**, 277–323.
- Hjort-Simonsen, A. (1972). Projection of the lateral part of the enthorinal area to the hippocampus an fascia dentata. *J Comp Neurol*, **146**, 219–231.
- Holz, R. W. & Fisher, S. K. (1999). *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, kapittel: Synaptic transmission and cellular signaling: an overview, side: 191–212. Lippincott-Raven, New York, 6 utgave.
- Hrabetova, S., Chen, K. C., Masri, D., & Nicholson, C. (2002). Water compartmentalization and spread of ischemic injury thick-slice ischemia model. *J Cerebral Blood Flow Metab*, **22**(1), 80–88.
- Ikeda, M., Nakazawa, T., Kouichi, A., Kaneko, T., & Yamatsu, K. (1988). Extracellular accumulation of glutamate in the hippocampus induced by ishchemia is not calcium dependent-in vitro and in vivo evidence. *Neurosci Lett*, **96**, 202–206.

- Inns, R. H. & Leadbeater, L. (1983). The efficacy of bispyridinium derivates in the treatment of organophosphate poisoning in the guinea-pig. *J Pharm Pharmacol*, **35**, 427–433.
- Israel, M. & Dunant, Y. (1996). A unifying hypothesis for acetylcholine release. *Neurochem Int*, **28**(1), 1–9.
- Ivarsson, U., Nilsson, H., & Santesson, J. (1992). *FOA orienterer om kemiska vapen - hot, verkan och skydd*. Forsvarets forskningsanstalt(FOA).
- Jacobsson, S. O. P., Cassel, G. E., Karlsson, B. M., Sellström, ., & Persson, S. . (1997). Release of dopamin, GABA and EAA in rats during intrastriatal perfusion with kainic acid, NMDA and soman: a comparative microdialysis study. *Organ Tox and Mech*, **71**, 756–765.
- Johnston, D. & Amaral, D. G. (1998). *The Synaptic Organization of the Brain*, kapittel: Hippocampus, side: 417–458. New York: Oxford University Press, 4 utgave.
- Kanai, Y., Smith, C. P., & Hediger, M. A. (1993). The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *Trends Neurosci*, **16**, 365–370.
- Kar, P. P. & Martin, M. A. (1972). Possible role of gamma-aminobutyric acid in paraoxon induced convulsions. *J Pharm Pharmacology*, **24**, 996–997.
- Kaspar, E. V. & Wade, G. R. (2001). Cholinergic modulation of excitatory synaptic transmission in the CA3 area of the hippocampus. *J Neurosci*, **21**(1), 75–83.
- Katz, B. (1969). *The release of neural transmitter substances*. Liverpool University Press.
- Katz, B. & Miledi, R. (1965). The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. *Proc R Soc B*, **161**, 496–503.
- Koelle, G. B. & Fridenwald, J. S. (1949). A histochemical metod for localizing cholinesterase activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, **70**, 617–622.
- Koplovitz, I. & Skvorak, J. P. (1998). Electrographic changes during generalized convulsive status epilepticus in soman intoxicated rats. *Epilepsy Res*, **30**, 159–164.
- Lallement, G., Carpentier, P., Collet, A., Pernot-Marino, I., Baubichon, D., & Blanchet, G. (1991a). Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus. *Brain Res*, **563**(1-2), 234–240.

- Lallement, G., Carpentier, P., Collet, A., Pernot-Marino, I., Baubichon, D., Sentenac-Roumanou, H., & Blanchet, G. (1991b). Involvement of glutamatergic system of amygdala in generalized seizures induced by soman: comparison with the hippocampus. *C R Acad Sci III*, **313**(9), 421–426.
- Lallement, G., Denoyer, M., Collet, A., Pernot-Marino, I., Baubichon, D., Monmaur, P., & Blanchet, G. (1992a). Changes in hippocampal acetylcholine and glutamate extracellular levels during soman-induced seizures: influence of septal cholinceptive cells. *Neurosci Lett*, **139**(1), 104–107.
- Lallement, G., Carpentier, P., Collet, A., Baubichon, D., Pernot-Marino, I., & Blanchet, G. (1992b). Extracellular acetylcholine changes in rat limbic structures during soman-induced seizures. *Neurotoxicology*, **13**(3), 557–567.
- Lallement, G., Delamanche, I. S., Pernot-Marino, I., Baubichon, D., Denoyer, M., Carpentier, P., & Blanchet, G. (1993a). Neuroprotective activity of glutamate receptor antagonists against soman-induced hippocampal damage: quantification with an omega 3 site ligand. *Brain Res*, **618**(2), 227–237.
- Lallement, G., Carpentier, P., Pernot-Marino, I., Baubichon, D., Collet, A., & Blanchet, G. (1993b). Transient impairment of the GABA-ergic function during initiation of soman induced seizure. *Brain Res*, **629**, 239–244.
- Lallement, G., Dorandeu, F., Filliat, P., Carpentier, P., Baille, V., & Blanchet, G. (1998). Medical management of organophosphate-induced seizures. *J Physiol Paris*, **92**(5-6), 369–373.
- Lamanche, I. D., Desroches, A. M., Bouchaud, C., & Laget, P. (1980). Electrocor-ticograms and histochemical effects appearing in the rat during the restoration of cholinesterase activities after administration of an organophosphate inhibitor. *C R Acad Sci*, **291**(3), 401–403.
- Laube, B., Kuhse, J., & Betz, H. (1998). Evidence for a tetrameric structure of recombinant NMDA receptors. *J Neuroscience*, **18**(8), 2954–61.
- Lia, B., Hegghammer, T., Andersen, R. I. V., Kjøk, A., & Bokhari, L. (2001). *Atommateriale, gass og mikrober som terrorvåpen? En undersøkelse av terrorgruppers interesse for og bruk av ikke-konvensjonelle våpen*. FFI/rapport-2001/02930.
- Lorente de Nó, R. (1934). Studies on the structure of cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system. *J Psychol Nerol*, **46**, 113–177.

- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265–275.
- Lund-Andersen, H. & Hertz, L. (1970). Effects of potassium and glutamate on swelling and on sodium and potassium content in brain-cortex slices from adult rats. *Exp Brain Res*, **11**, 199–212.
- Marchi, M. & Raiteri, M. (1989). Interaction acetylcholine-glutamate in rat hippocampus: involvement of two subtypes of M-2 muscarinic receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **248**(3), 1255–1260.
- Markram, H. & Segal, M. (1990). Long-lasting facilitation of excitatory post-synaptic potentials in the rat hippocampus by acetylcholine. *J Physiol*, **427**, 1255–1260.
- Martinez-Hernandez, A., Bell, K. P., & Norenberg, M. D. (1977). Glutamine synthetase: Glial localization in brain. *Science*, **195**(4284), 1356–1358.
- McDonough, J. H., J. & Shih, T. M. (1993). Pharmacological modulation of soman-induced seizures. *Neurosci Biobehav Rev*, **17**(2), 203–215.
- McDonough, J. H., J. & Shih, T. M. (1997). Neuropharmacological mechanisms of nerve agent-induced seizure and neuropathology. *Neurosci Biobehav Rev*, **21**(5), 559–579.
- McDonough, J. H., J., McLeod, C. G., J., & Nipwoda, M. T. (1987). Direct microinjection of soman or VX into the amygdala produces repetitive limbic convulsions and neuropathology. *Brain Res*, **435**(1-2), 123–137.
- McDonough, J. H., J., Clark, T. R., Slone, T. W., J., Zoefel, D., Brown, K., Kim, S., & Smith, C. D. (1998). Neural lesions in the rat and their relationship to EEG delta activity following seizures induced by the nerve agent soman. *Neurotoxicology*, **19**(3), 381–391.
- McDonough, J. H., Jaax, N. K., Crowley, R. A., Crowley, M. Z., & Modroe, H. E. (1989). Atropin and/or Diazepam therapy protection against soman-induced neural and cardiac pathology. *Fund Appl Tox*, **13**, 256–276.
- McDonough, J. H., Shih, T. M., & Adams, N. (1993). Forebrain areas sensitive to the convulsant effects of the anticholinesterase agent VX. *Neurosci Abs*, **19**, 1630.
- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, **130**(4), 1007–1015.

- Miles, R., Toth, K., Gulyas, A. I., Hajos, H., & Freund, T. F. (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron*, **16**, 815–823.
- Muzzolini, A., Bregola, G., Bianchi, C. Beani, L., & Simonato, M. (1997). Characterization of glutamate and [³H]D-aspartate outflow from various *in vitro* preparations of the rat hippocampus. *Neurochem Int*, **31**(1), 113–124.
- Myhrer, T. (1997). *Some fundamentals of neurochemistry and behavior*. FFI/rapport-97/00534.
- Naalsund, L. U. (1986). *Chemically induced damage to the hippocampal formation*. Ph.D. thesis, Forsvarets forsknings institutt, avd for miljøtoxikologi.
- Nachmansohn, D. (1940). On the physiological significance of cholinesterase. *Yale J Biol Med*, **12**, 565–589.
- Nadler, J. V., Vaca, K. W., White, W. F., Lynch, G. S., & Cotman, C. W. (1976). Aspartate and glutamate as possible neurotransmitters of excitatory hippocampal afferents. *Nature*, **260**, 238–540.
- Nicholls, D. & Attwell, D. (1990). The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends in pharmacological sciences*, **11**(11), 462–468.
- Nicholls, D. G. (1989). Release of glutamate, aspartate and γ -aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem*, **52**, 331–334.
- Nicholls, D. G. (1994). *Proteins, transmitters and synapses*. Blackwell science, Oxford, England.
- Nio, J. & Breton, P. (1994). Effects of organophosphates on rabbit pyramidal cells firing pattern and hippocampal theta rhythm. *Brain Res Bull*, **33**, 241–248.
- Nyakas, C., Luiten, P. G., Spencer, D. G., & Traber, J. (1987). Detailed projection patterns of septal and diagonal band efferents to the hippocampus in the rat with emphasis on innervation of CA1 and dentate gyrus. *Brain Res Bull*, **18**(4), 533–45.
- Oldendorf, W. H. (1971). Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol*, **221**(6), 1629–1639.
- Olney, J. W., Rhee, V., & Ho, O. L. (1974). Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res*, **77**, 507–512.

- Orrego, F. & Villanueva, S. (1993). The chemical nature of the main central excitatory transmitter: a critical appraisal based upon release studies and synaptic vesicle localization. *Neuroscience*, **56**, 539–555.
- Parsons, C. G., Danysz, W., & Quack, G. (1998). Glutamate in CNS disorders as a target for drug development. An update. *Drug. News. Perspect.*, **11**, 523–569.
- Pasantes-Morales, H. & Schousboe, A. (1989). Release of taurine from astrocytes during potassium-evoked swelling. *Glia*, **2**, 45–50.
- Patterson, T. A., Eun-Kyung, K., Meldrum, M. J., & Dawson, R. (1994). Glutamate efflux from rat brain slices and cultures: a comparison of three depolarizing agents potassium, 4-aminopyridine, and veratrine. *Neurochem Res*, **20**(2), 225–232.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic press, Sydney.
- Petras, J. M. (1994). Neurology and neuropathology of soman-induced brain injury: an overview. *J exp anal behav*, **61**, 319–329.
- Philippens, I., Melchers, B., DeGroot, D., & Wolthius, O. L. (1992). Behavioral performance, brain histology and EEG sequela after immediate combined atropine/diazepam treatment of soman-intoxicated rats. *Pharm Biochem Behav*, **42**, 711–719.
- Roberts, E., Chase, T. N., & Tower, D. B. (1976). *GABA in nervous system function*. New York: Raven Press.
- Roberts, P. J., Storm-Mathisen, J., & Jhoston, G. A. R. (1981). *Glutamate transmission in the central nervous system*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Sapolsky, R. M. (1985). Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: temporal aspects of neuronal vulnerability. *Brain Res*, **359**, 300–305.
- Savage, D. D., Galindo, R., Queen, S. A., Paxton, L. L., & Allan, A. M. (2001). Characterization of electrically evoked 3H-D-aspartate release. *Neurochem Int*, side: 255–267.
- Schousboe, A., Morán, J., & Pasantes-Morales, H. (1990). Potassium-stimulated release of taurine from cultured cerebellar granule neurons is associated with cell swelling. *J Neurosci Res*, **27**, 71–77.

- Scott, I. D. & Nicholls, D. G. (1980). Energy transduction in intact synaptosomes: influence of plasma-membrane depolarization on the respiration and membrane potential of internal mitochondrial determined in situ. *Biochem J*, **186**, 21–33.
- Shih, T. M. (1982). Time course effects of soman on acetylcholine and choline levels in six discrete areas of the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*, **78**(2), 170–175.
- Shih, T. M. & McDonough, J. H., J. (1997). Neurochemical mechanisms in soman-induced seizures. *J Appl Toxicol*, **17**(4), 255–264.
- Shih, T. M., Harris, S., Henry, K., Koviak, T., & Jimmerson, V. R. (1986). Relationship between soman-induced elevation of brain regional acetylcholine concentrations and lethality. *Soc Neurosci Abs*, **12**, 891.
- Shih, T. M., McDonough, J. H., & Koplovitz, I. (1990). Evaluation of anticonvulsant drugs for soma-induced seizure activity. *J Am Coll Toxicol*, **15**, 72–79.
- Shute, C. C. D. & Lewis, P. R. (1961). Histochemistry of cholinesterases, i: The use of cholinesterase techniques combined with operative procedures to follow nervous pathways in the brain. *Bib Anat Basel*, **2**, 34–39.
- Siegel, G. J., Agranoff, B., Albers, R., Fisher, S. K., & Uhler, M. (1999). *Basic neurochemistry: Molecular, cellular an medical aspects*. Lippincott Williams & Wilkins, 6 utgave.
- Sisjö, B. K. (1978). *Brain energy metabolism*. John Wiley & sons, Chichester.
- Somani, M. S. & Husain, K. (2001). *Chemical warfare agents: Toxicity at low levels*, kapittel: Low-level nerve agent toxicity under normal and stressful conditions, side: 83–109. CrC Press LLC, Washington, D.C.
- Stadler, H. & Nesselhutt, T. (1986). Simple and rapid measurement of acetylcholine and choline by HPLC and enzymatic electrochemical detection. *Neurochem int*, **9**(1), 127–129.
- Sterri, S. H. & Fonnum, F. (1978). Isolation of organic anions by extraction with liquid anion exchangers and its application to micromethods for acetylcholinesterase and 4-aminobutyrate aminotransferase. *Eur J Biochem*, **91**, 215–222.
- Storm-Mathisen, J. (1977). Localization of transmitter candidates in the brain: The hippocampal formation as a model. *Prog Neurobiol*, **8**, 119–181.
- Storm-Mathisen, J. (1990). Potassium currents in hippocampal pyramidal cells. *Prog Brain Res*, **83**, 161–187.

- Sultatos, L. (1994). Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. *J Tox Env Health*, **43**(3), 271–289.
- Szatkowski, M., Barbour, B., & Attwell, D. (1990). Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*, **348**, 443–445.
- Szerb, J. C. (1988). Changes in the relative amounts of aspartate and glutamate released and retained in hippocampal slices during stimulation. *J neurochem*, **50**, 219–224.
- Vanderwolf, C. H. (1969). Hippocampal electrical activity and voluntary movement in the rat. *Electroenceph Clin Neurophysiol*, **26**, 407–418.
- Wade, J. V., Samson, F. E., Nelson, S. R., & Pazdernik, T. L. (1987). Changes in extracellular amino acids during soman- and kainic acid-induced seizures. *J Neurochem*, **49**(2), 645–650.
- Wainer, B. H., Levy, A. I., Rye, D. B., Mesulam, M. M., & Mufson, E. J. (1985). Cholinergic and non-cholinergic septohippocampal pathways. *Neurosci Lett*, **54**, 54.52.
- Walday, P., Aas, P., Haider, T., & Fonnum, F. (1993). Effect of pyridostigmin pretreatment, Hi-6 and toxogonin treatment on rat tracheal smooth muscle response to cholinergic stimulation after organophosphorus inhalation exposure. *Arch Toxicol*, **67**, 212–219.
- Waldmeier, P. C., Wicki, P., & Feldtrauer, J. J. (1993). Release of endogenous glutamate from rat cortical slices in presence of glutamate uptake inhibitor L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid. *Nunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol*, **348**, 478–485.
- Watkins, J., Krosgaard-Larsen, P., & Honore, T. (1990). Structure activity relationships in the development of excitatory amino acid receptor agonist and competitiv antagonist. *Trends Pharmacol Sci*, **11**, 25–33.
- Whittaker, V. (1990). The cell and molecular biology of the cholinergic synapse: twenty years of progress. *Prog Brain Research*, **84**, 419–436.
- Whittaker, V. P. (1951). Specificity, mode of action and distribution of cholinesterases. *Physiol Rev*, **31**, 312–343.
- Williams, S. H. & Johnston, D. (1993). *Muscarinic cholinergic inhibition of glutamatergic transmission*, kapittel: Presynaptic Receptors in the Mammalian Brain. Boston: Burkhauser.

- Wolthuis, O. L., van Helden, H. P., Melchers, B. P., Busker, R. W., & de Groot, D. M. (1994). Search for a therapy against soman-intoxication. *Neurosci Biobehav Rev*, **18**(4), 469–486.
- Wolf, N. J., Eckenstein, F., & Butcher, L. L. (1984). Cholinergic systems in the rat brain: projections to the limbic telencephalon. *Brain Res Bull*, **13**, 751–784.
- Øydvin, O. K. (1998). *Several oximes (Toxogonin, HI-6, HLo-7, P2S and 2-pam) effect on potassium evoked release of [³H]-acetylcholine and liberation of [³H]-choline from rat hippocampii*. FFI/rapport-98/04243.
- Zigmond, M. J., Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L., & Squire, L. R. (1999). *Fundamental neuroscience*. Academic press.
- Zimmermann, H. (1993). *Synaptic transmission, cellular and molecular basis*. Georg Thieme verlag, Stuttgart, Tyskland.

FORDELINGSLISTE

FFIBM
Dato: 20. juni 2003

RAPPORTTYPE (KRYSS AV) <input checked="" type="checkbox"/> RAPP <input type="checkbox"/> NOTAT <input type="checkbox"/> RR	RAPPORT NR. 2003/02395	REFERANSE FFIBM/812/137	RAPPORTENS DATO 20. juni 2003
RAPPORTENS BESKYTTELSESGRAD UGRADERT	ANTALL TRYKTE UTSTEDT 30	ANTALL SIDER 99	
RAPPORTENS TITTEL KARTLEGGING AV INTERAKSJONER MELLOM KOLINERG OG GLUTAMATERG NEVROTRANSMISJON I HIPPOKAMPUS VED ORGANOFOSFATFORGIFTNING		FORFATTER(E) BORGE Bengt Åge Sørby	
FORDELING GODKJENT AV FORSKNINGSSJEF Bjørn A Johnsen		FORDELING GODKJENT AV AVDELINGSSJEF: Jan Ivar Botnan	

EKSTERN FORDELING
INTERN FORDELING

ANTALL	EKS NR	TIL	ANTALL	EKS NR	TIL
			9		FFI-Bibl
			1		FFI-ledelse
			1		FFIE
			1		FFISYS
			1		FFIBM
			1		FFIN
			16		Forfattereksemplar(er) Restopplag til Biblioteket
					Elektronisk fordeling:
					FFI-veven
					Pål Aas (PAa)
					Avi Ring (ARi)
					Trond Myhrer (TMy)
					Bjørnar Hassel (BHl)

Benytt ny side om nødvendig.