
Zakład Farmakologii. Instytut Patologii Klinicznej. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. n. med. Zdzisław Kleinrok

Zdzisław KLEINROK,
Maria SIEKLUCKA-DZIUBA

Wpływ fluorostygminy na poziom kwasu γ -aminomasłowego i aktywność dekarboksylazy glutaminowej w mózgu szczura

Влияние флуоростигмина на уровень γ -аминомасляной кислоты и активность глутаминовой декарбоксилазы в мозге крысы

The Influence of Fluorostigmine on the γ -aminobutyric Acid Level and Glutamate Decarboxylase Activity in a Rat's Brain

Kwas γ -aminomasłowy (GABA) spełnia w OUN ssaków rolę neuroprzekaznika hamującego (9). Podany dokomorowo wywiera efekt ochronny w drgawkach pentetrazolowych i elektrycznych. Podobne efekty uzyskuje się po zastosowaniu hydroksylaminy i kwasu aminooksyoctowego (AOAA), substancji będących inhibitorami aminotrasferazy aminomasłowej (GABA-T, E.C.2.6.1.19) i podwyższających na tej drodze poziom endogennego GABA (2). Po podaniu obwodowym GABA nie obserwuje się działania przeciwdrgawkowego, występuje natomiast niedomoga mięśniowa, zaburzenia oddychania i sedacja (10). Te różnice w działaniu zależne od drogi podania wynikają ze słabej penetracji GABA przez barierę naczyniowo-mózgową.

Z jednej strony Svenneby i Roberts (13) stwierdzili, że bikukulina, znosząca ośrodkowe efekty GABA, jest jednocześnie kompetycyjnym inhibitorem esteraży acetylocholinowej (AChE, E.C.3.1.1.7) i że swój wpływ na układ GABA-ergiczny wywiera poprzez pobudzenie układu cholinergicznego. Z drugiej strony stwierdzono (5), że podanie GABA do komory bocznej mózgu szczura powoduje znaczny wzrost syntezy i poziomu acetylocholinyl (ACh). W świetle tych danych wydało się interesujące zbadanie wpływu fluorostygminy (DFP), będącej nieodwracalnym

inhibitorem AChE, a także toksogoniny — reaktywatora tego enzymu oraz atropiny, blokującej receptory cholinergiczne muksarynowe M, na poziom GABA i aktywność dekarboksylazy glutaminowej (GAD, E.C.4.1.1.15) w mózgu szczura.

MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzano na szczurach, samcach szczepu Wistar, o ciężarze ciała 180—220 g. Wykonano szereg badań.

1. Oznaczanie poziomu GABA w mózgu

DFP stosowano i.p. w roztworze wodnym w dawkach odpowiadających 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 i 1/40 jego LD_{50} . U części zwierząt stosowano samą atropinę ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.), samą toksogoninę ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.), atropinę łącznie z DFP (30 sek. przed podaniem DFP), toksogoninę łącznie z DFP (30 sek. po podaniu DFP) oraz wyżej wymienione 3 substancje łącznie. Zwierzęta grup kontrolnych otrzymywały iniekcje takich samych objętości rozpuszczalnika. Po 60 min. od podania DFP zwierzęta dekapitowano i mózgi natychmiast umieszczano w zamrażarce w temp. -18°C . Poziom GABA w całym mózgu oznaczano metodą spektrofлуorymetryczną wg Suttona i Simmondsa (12). Grupy doświadczalne liczyły 12 zwierząt.

2. Oznaczanie aktywności GAD w mózgu

DFP stosowano i.p. w roztworze wodnym w dawkach odpowiadających 1/2, 1/5 i 1/10 jego LD_{50} . Zastosowano poza tym analogiczny, jak w przypadku oznaczania GABA, układ doświadczenia. Aktywność GAD oznaczano metodą spektrofлуorymetryczną wg Suttona i Simmondsa (12). Grupy doświadczalne liczyły 12 zwierząt.

3. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki zestawiono w postaci średnich i opracowano statystycznie posługując się testem *t* Studenta.

4. Oznaczanie wpływu GABA na toksyczność ostrą DFP

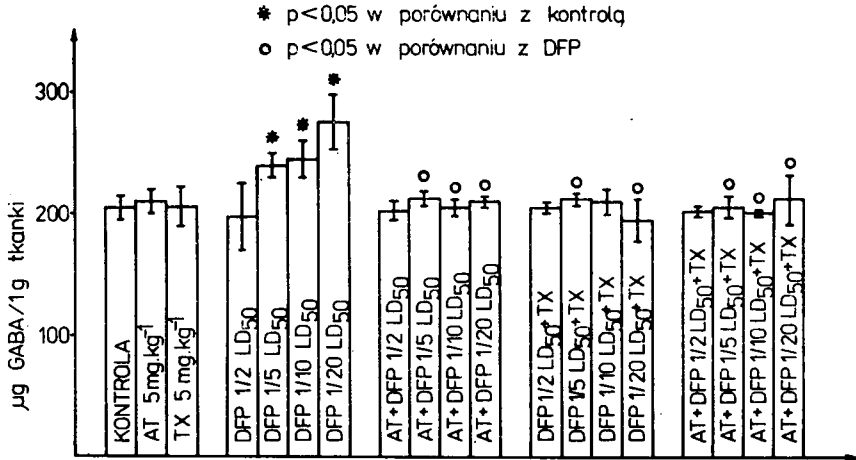
Grupom zwierząt, liczącym 6 sztuk, podawano i.p. różne dawki GABA ($0,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $1,4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, $3,0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ i $4,5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) i oznaczano jego wpływ na toksyczność ostrą (LD_{50}) DFP. LD_{50} określano metodą Litchfielda i Wilcoxon (8), a uzyskane wyniki porównywano z toksycznością ostrą samego DFP.

WYNIKI

DFP w dawkach odpowiadających 1/5, 1/10 i 1/20 jego LD_{50} statystycznie istotnie podnosi, a w dawkach odpowiadających 1/2 i 1/40 jego LD_{50} pozostaje bez wpływu na poziom endogennej GABA w mózgu szczura. Podanie samej atropiny ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) lub samej toksogoniny

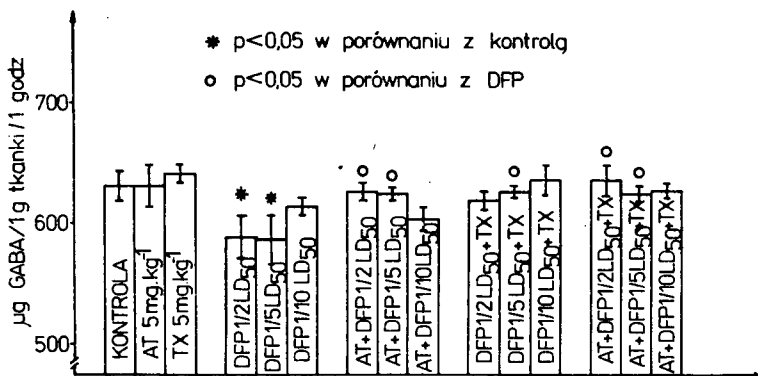
(5 mg \cdot kg $^{-1}$) nie wywołuje zmian w poziomie GABA, ale podanie ich łącznie z DFP zapobiega wywoływanych przez niego efektom (ryc. 1).

DFP w dawce 1/2 i 1/5 LD $_{50}$ obniża istotnie, natomiast w dawce 1/10 nie wpływa na aktywność GAD w mózgu. Atropina i toksogonina pozostają bez wpływu na aktywność GAD, ale zastosowane łącznie z DFP normalizują wywoływane przez niego zmiany (ryc. 2).



Ryc. 1. Wpływ DFP, atropiny (AT) i toksogoniny (TX) na poziom GABA w mózgu szczura

The influence of DFP, atropine (AT) and toxogonine (TX) on the GABA level in a rat's brain



Ryc. 2. Wpływ DFP, atropiny (AT) i toksogoniny (TX) na aktywność GAD w mózgu szczura

The influence of DFP, atropine (AT) and toxogonine (TX) on the GAD activity in a rat's brain

GABA w dawkach 0,5 i 1,5 g · kg⁻¹ stosowany i.p. 60 min. przed podaniem DFP nie wpływa na toksyczność ostrą DFP. Dawka 3,0 g · kg⁻¹ zmniejsza toksyczność ostrą DFP, natomiast dawka 4,5 g · kg⁻¹ wyraźnie nasila tę toksyczność (tab. 1).

Tab. 1. Wpływ GABA na toksyczność ostrą DFP
The influence of GABA on the acute toxicity of DFP

GABA w g/kg	LD ₅₀ DFP
—	1,9 (1,65—2,18)
0,5	2,35 (2,11—2,6)
1,5	2,55 (2,26—2,86)
3,0	3,05 (2,7 —3,44)
4,5	0,88 (0,71—1,09)

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z przeprowadzonych badań wynika, że DFP zastosowany w dawkach odpowiadających 1/5, 1/10 i 1/20 jego LD₅₀ powoduje statystycznie istotny wzrost zawartości GABA w mózgu szczura przy równoczesnym obniżeniu aktywności GAD. Atropina nie powoduje zmian w układzie GABA-ergicznym, jednakże zastosowana łącznie z DFP zapobiega zmianom wywoływanym przez ten związek. Atropina znosi też inne ośrodkowe i obwodowe objawy wywoływane przez DFP (4). Również toksogonina, reaktor AChE, normalizuje zmiany wywoływane przez DFP w układzie GABA-ergicznym, mimo że sama pozostaje bez wpływu, zarówno na poziom GABA, jak i na aktywność GAD. Jest to dowodem, że wpływ DFP na układ GABA-ergiczny odbywa się za pośrednictwem układu cholinergicznego.

GABA w układzie nerwowym kręgowców tworzony jest podczas nieodwracalnej reakcji dekarboksylacji z kwasu glutaminowego z udziałem GAD. Transaminacja GABA do semialdehydu bursztynowego i kwasu glutaminowego odbywa się z udziałem GABA-T (9). GAD jest enzymem trwałym *post mortem*, co zostało wykorzystane do oznaczania rozmieszczenia GABA w neuronach metodami histochemicznymi (11). Natomiast GABA-T wykazuje aktywność jedynie w warunkach tlenowych. W stanach hipoksji i *post mortem* aktywność tego enzymu gwałtownie spada (7). Z tego względu w warunkach zatrucia DFP poziom GABA może się zwiększać, mimo równoczesnego zmniejszenia aktywności GAD, nie tylko w wyniku nadmiernej stymulacji układu cholinergicznego, ale również w wyniku inaktywacji bardzo wrażliwej na działanie czynników toksycznych GABA-T. Jak wynika z wcześniejszych naszych badań, DFP wy-

wiera wpływ na inne poza AChE enzymy. Hamuje aktywność MAO i zmniejsza zużycie tlenu przez homogenaty tkanki mózgowej (6).

Wzajemne powiązanie układów cholinergicznego i GABA-ergicznego zostały najlepiej poznane w drodze nigro-striatalnej. Neurony dopaminowe istoty czarnej są pod kontrolą neuronów GABA-ergicznym pochodzących z gałki bladej i jądra ogoniastego. Neurony GABA-ergiczne tych struktur są z kolei kontrolowane transsynaptycznie przez interneurony cholinergiczne prążkowania (3). Wykazano też obecność presynaptycznych receptorów cholinergicznym M i N, zlokalizowanych na neuronach prążkowania (1). DFP, nieodwracalny inhibitor AChE, nasila transmisję cholinergiczną, zarówno receptorów M, jak i N, i na tej drodze moduluje funkcję innych układów neuroprzekaźnikowych, w tym również układu GABA-ergicznego. Wzrost zawartości GABA w mózgu w wyniku działania DFP może stanowić odpowiedź na zaburzoną równowagę dynamiczną między układem cholinergicznym i GABA-ergicznym. Przemawia za tym działanie atropiny, która znosząc zwiększoną aktywność układu cholinergicznego zapobiega występowaniu zmian w układzie GABA-ergicznym pod wpływem DFP. Z kolei GABA zastosowany i.p. w dawkach do $3,0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ zmniejsza toksyczność ostrą DFP. Większe dawki nie wywierają tego działania, a nawet nasilają toksyczność DFP, co można tłumaczyć toksycznością własną GABA, którego LD_{50} wynosi $5,4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (10).

PIŚMIENNICTWO

1. Belleruche J., Bradford H. F.: Biochemical Evidence of the Presence of Presynaptic Receptors on Dopaminergic Nerve Terminals. *Brain Res.* **142**, 53, 1978.
2. Da Vanzo J. P., Sydow M.: Inhibition of Isolation-Induced Aggressive Behaviour with GABA-transaminase Inhibitors. *Psychopharmacology* **62**, 23, 1979.
3. Dray A., Straughan D. W.: Synaptic Mechanisms in the Substantia Nigra. *J. Pharm. Pharmacol.* **28**, 400, 1976.
4. Haubrich D. R., Reid W. D.: Effects of Pilocarpine or Arecoline Administration on Acetylcholine Level and Serotonin Turnover in Rat Brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **181**, 19, 1972.
5. Kleinrok A.: The Effect of γ -aminobutyric Acid on the Content and Metabolism of Acetylcholine in the Rat Striatum. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **31**, 481, 1979.
6. Kleinrok Z. i wsp.: Effects of Fluorostigmine, Toxogonine and Atropine on Monoamine Oxidase Activity and the Level of Biogenic Amines in Mouse Brain. *Acta Physiol. Pol.* **30**, 4, 1979.
7. Lajtha A., Toth J.: Postmortem Changes in the Cerebral Free Amino Acid Pool. *Brain Res.* **76**, 546, 1974.
8. Litchfield J. T., Wilcoxon F.: A Simplified Method of Evaluating Dose-Effect Experiments. *J. Pharmacol.* **96**, 99, 1949.

9. Roberts E.: Gamma-aminobutyric Acid and Nervous System Function — a Perspective. Commentary. *Bioch. Pharmacol.* **23**, 2637, 1974.
10. Sierosławska J.: Właściwości farmakologiczne GABA i jego pochodnych. *Arch. Immunol.* **13**, 70, 1965.
11. Straughan D. W.: Drug Action and the GABA System. *Neurotransmitters*, Tins-October, 1978, 97.
12. Sutton I., Simmonds M. A.: Effects of Acute and Chronic Pentobarbitone on the γ -aminobutyric Acid System in Rat Brain. *Bioch. Pharmacol.* **23**, 1801, 1974.
13. Svenneby G., Roberts E.: Bicuculine and N-methylbicuculine — Competitive Inhibitors of Brain Acetylcholinesterase. *J. Neurochem.* **21**, 1025, 1973.

Otrzymano 2 X 1980.

РЕЗЮМЕ

В исследованиях проведенных на самцах крыс рода Вистар доказано, что DFP применяемый внутривенно в дозах отвечающих 1/5, 1/10 и 1/20 LD₅₀ повышает уровень ГАМК в мозге, а в дозах 1/2 и 1/40 LD₅₀ не влияет на уровень этого невромедиатора. Этот эффект антагонизирует атропин (5 мг/кг в/б) и токсогонин (5 мг/кг в/б), хотя атропин и токсогонин применяемые отдельно не влияют на уровень ГАМК. DFP применяемый в/б в дозах отвечающих 1/2 и 1/5 LD₅₀ понижает активность глутаминовой декарбоксилазы. Этот эффект нормализует атропин и токсогонин, которые самые лишены влияния на активность фермента.

Предполагается, что стимуляция центральных холинергических рецепторов влияет на ГАМК-ергическую систему мозга.

SUMMARY

In the experiments carried out on Wistar male rats it was found that DFP administered i.p. in doses corresponding to 1/5, 1/10 and 1/20 LD₅₀ increased the GABA level in a rat's brain. In doses of 1/2 and 1/40 LD₅₀ it did not change this neurotransmitter's level. This effect was antagonized by atropine (5 mg/kg i.p.) and toxogonine (5 mg/kg i.p.), while atropine or toxogonine administered separately did not influence on the GABA level. DFP administered i.p. in doses corresponding to 1/2 or 1/5 LD₅₀ decreased the activity of GAD. This effect was reversed by atropine and toxogonine, while given alone these compounds did not change the activity of this enzyme.

The result suggested that the stimulation of the central cholinergic receptors may have an influence on the GABA-ergic system.