

---

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

Maria SIEKLUCKA-DZIUBA, Zdzisław KLEINROK

**Wpływ agonistów i antagonistów cholinergicznych receptorów M i N  
na poziom GABA i aktywność GAD w mózdzku szczura**

**Влияние агонистов и антагонистов холинергических рецепторов M и N  
на уровень GABA и активность GAD в мозжечке крысы**

**The Influence of Agonists and Antagonists of Cholinergic M and N Receptors on  
the GABA Level and GAD Activity in Rat Cerebellum**

Kwas  $\gamma$ -aminomasłowy (GABA) znajduje się w dużych ilościach w OUN i jest głównym neuroprzekaźnikiem hamującym (3, 6, 9, 11, 17). Odpowiada on zarówno za hamowanie pre-, jak i postsynaptyczne (3). Największe ilości GABA, a także dekarboksylazy glutaminowej (GAD) stwierdzono w neuronach prążkowie, istoty czarnej, podwzgórza, kory mózgu oraz w mózdzku (5, 9, 13). W tej ostatniej strukturze neuronami GABA-ergicznymi są komórki Purkiniego, hamujące czynność głębokich jąder mózdzku oraz komórki pnia mózgu. Komórki Purkiniego są z kolei hamowane przez komórki koszyczkowate, będące również komórkami GABA-ergicznymi. Zmianie zawartości GABA w mózdzku towarzyszy zmiana zawartości c-GMP w kierunku odwrotnym do GABA (13). Równocześnie wykazano, że komórki Purkiniego reagują pobudzeniem na ACh. Badania ostatnich lat dostarczyły dowodów interakcji między układem cholinergicznym i GABA-ergicznym. Zjawisko to jest stosunkowo dobrze poznane w obrębie układu pozapiramidowego oraz w korze mózgu (5, 7, 8, 9, 11, 15, 17). Stwierdzono też, że mózdzek posiada przede wszystkim receptory cholinergiczne muskarynowe (M) i tylko niewielką ilość receptorów nikotynowych (N) (12). Aktywacja ośrodkowych receptorów M jest związana ze wzrostem c-GMP, co sugeruje, że c-GMP spełnia rolę pośrednika w funkcjonowaniu receptorów M (9, 13). Ponieważ zmiany aktywności neuronów GABA-ergicznych są również w ściślejszej korelacji z zawartością c-GMP, wydaje się interesujące zbadać wpływ ośrodkowej stymulacji cholinergicznej na poziom GABA i aktywność GAD w mózdzku szczura.

## MATERIAŁ I METODY

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach, samcach, szczepu Wistar, o masie ciała 160—220 g. Badane substancje rozpuszczano w wodzie *ex tempore* i podawano dootrzewnowo (i.p.) w różnym czasie przed dekapitacją. Jedynie d-tubokurarynę podawano dokomorowo (i.v.c.). Zwierzęta zabijano przez dekapitację i mózgi natychmiast umieszczano w zamrażarce w temp.  $-18^{\circ}\text{C}$ . Z zamrożonych mózgów pobierano mózdzek i oznaczano w nim poziom GABA i aktywność GAD metodą spektrofluorymetryczną Lowego i wsp. (10) w modyfikacji Suttona i Simmondsa (16). Uzyskane wyniki zestawiono w postaci średnich i opracowano statystycznie przy użyciu *t*-testu Studenta. Grupy doświadczalne liczyły po 12 zwierząt.

Stosowano następujące substancje i leki: siarczan atropiny (Polfa), chlorowodorek pilokarpiny (Polfa), salicylan fizostygminy (Sandoz), chlorowodorek lobeliny (Polfa), nikotynę (POCH), chlorowodorek mekamylaminy (Sandoz), d-tubokurarynę (Orion), chlorowodorek fentolaminy (Regityne-Ciba), chlorowodorek propranololu (Polfa).

## STYMULACJA I BŁOKOWANIE CHOLINERGICZNYCH RECEPTORÓW M

Pilokarpinę stosowano w dawkach 5 i 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  60 min. przed dekapitacją, a fizostyginę w dawce 1,5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  120 i 240 min. przed dekapitacją. Atropinę stosowano w dawkach 0,2, 1 i 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  60 min. przed dekapitacją. Stosowano też atropinę w dawce 1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , a po 30 min. stosowano pilokarpinę 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  lub fizostyginę 1,5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Zwierzęta dekapitowano odpowiednio 60 lub 240 min. od drugiej iniekcji.

## STYMULACJA I BŁOKOWANIE CHOLINERGICZNYCH RECEPTORÓW N

Lobelinę stosowano w dawkach 1 i 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  15 i 30 min., w dawkach 10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  15, 30, 60, 120 i 240 min. oraz w dawce 15  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  30 min. przed dekapitacją. Nikotynę stosowano w dawkach 0,1 i 1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  15, 30 i 60 min. przed dekapitacją. Mekamylaminę stosowano w dawkach 2 i 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  60 min. przed dekapitacją. D-tubokurarynę stosowano i.v.c. w dawkach 0,5 i 1  $\mu\text{g}/\text{szczura}$  20 min. przed dekapitacją. Następnie badano wpływ łącznego stosowania lobeliny lub nikotyny z mekamylaminą lub tubokuraryną. W tym celu stosowano mekamylaminę w dawce 2  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i po 45 min. podawano lobelinę (5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) lub nikotynę (1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Podobnie stosowano tubokurarynę i.v.c. w dawce 0,5  $\mu\text{g}/\text{szczura}$  i po 5 min. podawano lobelinę (5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) lub nikotynę (1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Zwierzęta te zabijano po 15 min. od drugiej iniekcji.

STYMULACJA CHOLINERGICZNYCH RECEPTORÓW N  
I BŁOKOWANIE CHOLINERGICZNYCH RECEPTORÓW M ORAZ NORADRENERGICZNYCH  $\alpha$  I  $\beta$ 

Atropinę stosowano w dawce 1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i po 45 min. podawano lobelinę 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  lub nikotynę (1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Fentolaminę stosowano w dawce 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i po 45 min. podawano lobelinę (5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) lub nikotynę (1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Propranolol stosowano w dawce 5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  i po 45 min. podawano lobelinę (5  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) lub nikotynę (1  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Zwierzęta te dekapitowano po 15 min. od drugiej iniekcji.

## WYNIKI I Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że pilokarpina zastosowana w dawkach 5 i 10 mg · kg<sup>-1</sup> obniża zawartość GABA w mózdzku. Zmiany te nie występują w przypadku wcześniejszego zablokowania receptorów M przez atropinę, mimo że sama atropina w żadnej ze stosowanych dawek nie wpływa na poziom tego neuroprzekaźnika. Fizostygmina natomiast pozostaje bez wpływu na poziom GABA w tej strukturze (tab. 1). Równocześnie wykazano brak wpływu obu tych substancji na aktywność GAD. Fakt, że atropina antagonizuje działanie pilokarpiny jest dowodem, że do obniżenia zawartości GABA dochodzi za pośrednictwem cholinergicznyc receptorów M. Należy sądzić, że w wyniku tej stymulacji dochodzi do zwiększenia aktywności neuronów GABA-ergicznyc. Przy puszczenie to potwierdzają dane literaturowe, że stymulacja receptorów M w mózdzku powoduje wzrost zawartości c-GMP, który z kolei znajduje się w odwrotnej korelacji z zawartością GABA (13). Brak działania fizostygminy można tłumaczyć jej różnym od pilokarpiny mechanizmem działania. Fizostygmina, jako inhibitor AChE, wywołuje stymulację receptorów, zarówno M, jak i N, i efekty przez nią wywoływane są wypadkową tego działania. Ponadto, jako związek o znacznie większej toksyczności, może wywierać działanie niespecyficzne, niecholinergiczne (8, 10).

Wpływ lobeliny i nikotyny na poziom GABA jest wyraźnie dwufazowy, zależny od dawki i czasu działania. Lobelina zastosowana w dawce

Tab. 1. Wpływ pilokarpiny, fizostygminy i atropiny na poziom GABA w mózdzku szczura  
Effect of pilocarpine, fizostigmine and atropine on the GABA level in the rat cerebellum

Stosowane związki mg · kg <sup>-1</sup> i.p.	Czas (min.)	Poziom GABA w µg/1 g tkanki ±SE	Kontrola %
Kontrola		317 ±12,6	100.
Pilokarpina 5	60	201 ±28,0*	64
Pilokarpina 10	60	233 ±21,0*	74
Fizostygmina 1,5	120	303 ±7,3	96
Fizostygmina 1,5	240	295 ±8,6	93
Atropina 1	60	298 ±24,7	91
Atropina 5	60	287 ±40,2	90
Atropina 1 +Pilokarpina 10	90 60	283 ±14,1**	89
Atropina 1 +Fizostygmina 1,5	180 240	321 ±16,5	101

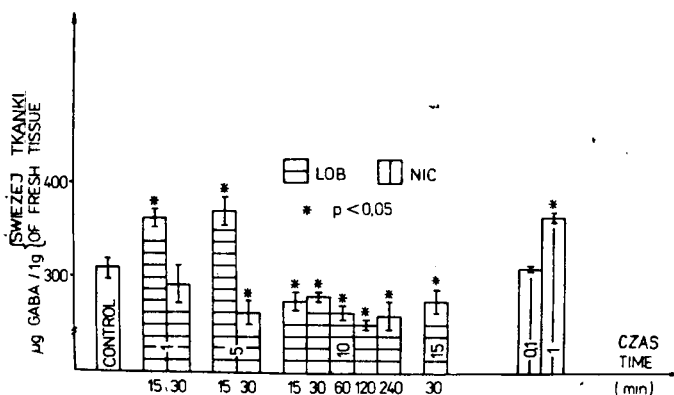
\*  $P < 0,05$  w porównaniu z kontrolą.

\*\*  $P < 0,05$  w porównaniu z pilokarpiną.

\*  $P < 0,05$  in comparison with control.

\*\*  $P < 0,05$  in comparison with pilocarpine.

1 i 5 mg · kg<sup>-1</sup> 15 min. przed dekapitacją zwiększa zawartość GABA, natomiast w dawkach większych (10 i 15 mg) oraz po dłuższym czasie (30 min. i więcej) zmniejsza tę zawartość. Analogiczne działanie wywiera nikotyna, która zastosowana w dawce 1 mg · kg<sup>-1</sup> 15 min. przed dekapitacją podnosi, a po 30 min. obniża poziom GABA w mózdzku (ryc. 1).



Ryc. 1. Wpływ lobeliny (LOB) i nikotyny (NIC) na poziom GABA w mózdzku  
Effect of lobeline (LOB) and nicotine (NIC) on the GABA level in the rat cerebellum

A więc związki te zastosowane w dawkach, w których wywierają działanie pobudzające receptory N, powodują wzrost zawartości GABA w mózdzku. Natomiast zniesienie impulsacji cholinergicznej przez zablokowanie receptorów N wywołuje efekty przeciwne. Mekamylamina zastosowana w dawce 2 mg · kg<sup>-1</sup> pozostaje bez wpływu, natomiast w dawce 5 mg · kg<sup>-1</sup> również obniża poziom GABA. Zastosowanie mekamylaminy w dawce 2 mg · kg<sup>-1</sup> 45 min. przed podaniem lobeliny zapobiega wywoływanych przez nią zmianom w poziomie GABA, pozostając bez wpływu na działanie nikotyny. Sugeruje to, że receptor cholinergiczny N w mózdzku wywiera podobny jak w prądkowiu wpływ na układ GABA-ergiczny (8). Stymulacja tego receptora prowadzi do zmniejszenia aktywności neuronów GABA-ergicznych, objawiającego się wzrostem jego zawartości, natomiast blokowanie tego receptora zmniejsza jego zawartość. Różnice w działaniu między lobeliną i nikotyną mogą wynikać z różnic toksyczności obu tych związków. Lobelina posiada bowiem czyste działanie nikotynowe, nikotyna natomiast poza działaniem na receptor N posiada swoje, niecholinergiczne miejsca wiązania w OUN. Efekty tego działania są

znoszone przez analogi nikotyny, a nie przez związki blokujące receptory cholinergiczne N (1, 2, 4). Tym też można tłumaczyć fakt, że mekamyamina zapobiega zmianom w poziomie GABA wywoływanych przez lobelinę, nie znosi natomiast wpływu nikotyny. Jednakże tubokuraryna, związek blokujący receptory N typu mięśniowego, zastosowana i.v.c. w dawce 0,5 µg/szczura 45 min. przed i.p. podaniem lobeliny lub nikotyny znosi działanie obu tych substancji, mimo że sama w żadnej ze stosowanych dawek nie wpływa na poziom tego neuroprzekaźnika (tab. 2).

Tab. 2. Wpływ lobeliny, nikotyny, mekamyminy i tubokuraryny na poziom GABA w mózdzku szczura  
Effect of lobeline, nicotine, mecamylamine and tubocurarine on the GABA level in the rat cerebellum

Stosowane związki	Droga podania	Czas (min.)	Poziom GABA w µg/1 g tkanki ±SE	Kontrola %
Kontrola			308 ±13,2	100
Lobelina 5 mg · kg <sup>-1</sup>	i.p.	15	370 ±15,6*	120
Nikotyna 1 mg · kg <sup>-1</sup>	i.p.	15	369 ±8,6*	119
Mekamyamina 2 mg · kg <sup>-1</sup>	i.p.	60	313 ±8,1	101
Mekamyamina 5 mg · kg <sup>-1</sup>	i.p.	60	268 ±8,8*	87
Mekamyamina 2 +Lobelina 5	i.p.	60 15	286 ±14,1**	93
Mekamyamina 2 +Nikotyna 1	i.p.	60 15	356 ±16,3*	115
Tubokuraryna 0,5 µg	i.v.c.	20	302 ±10,2	98
Tubokuraryna 1 µg	i.v.c.	20	296 ±8,3	96
Tubokuraryna 0,5 µg	i.v.c.	20	292 ±10,9**	95
+Lobelina 5 Tubokuraryna 0,5 µg	i.p. i.v.c.	15 20	304 ±9,0**	98
+Nikotyna 1	i.p.	15		

\*  $P < 0,05$  w porównaniu z kontrolą.

\*\*  $P < 0,05$  w porównaniu z lobeliną lub nikotyną.

\*  $P < 0,05$  in comparison with control.

\*\*  $P < 0,05$  in comparison with lobeline or nicotine.

Wydaje się więc, że receptory cholinergiczne N typów zwojowego i mięśniowego odgrywają podobną rolę w mózdzku, mimo różnej ich wrażliwości w stosunku do poszczególnych związków. Badania A b o o d a i wsp. (1) sugerują, że ośrodkowy receptor cholinergiczny N może, zależnie od konfiguracji przestrzennej, wiązać się z różnymi ago- i antagonistami swoistymi na obwodzie dla receptorów N typu zwojowego lub mięśniowego, a tylko stopień powinowactwa w tych wiązaniach może być różny.

Ponadto ago- i antagoniści receptora M, jak atropina czy oksotremoryna, mogą również, chociaż w mniejszym stopniu, ubiegać się o miejsce wiązania z tym receptorem (14). Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazały, że atropina, zastosowana w analogicznym układzie doświadczalnym jak mekamylamina, zapobiega zmianom w poziomie GABA wywołanym przez nikotynę, nie zmienia zaś wpływu lobeliny na ten poziom.

Zablokowanie receptorów noradrenergicznych  $\alpha$  przy użyciu fentolaminy ( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) nie zmienia wpływu lobeliny czy nikotyny na układ GABA-ergiczny, natomiast zablokowanie receptorów noradrenergicznych  $\beta$  przy użyciu propranololu ( $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) zapobiega zmianom wywołanym przez obydwie te związki. Wydaje się więc prawdopodobne, że stymulacja cholinergicznym receptorów N poza działaniem bezpośrednim może wywierać wpływ pośredni na poziom GABA poprzez receptory noradrenergiczne  $\beta$ .

Wpływ badanych związków na aktywność GAD jest mało charakterystyczny. Wykazano, że nikotyna w niewielkim stopniu zmniejsza aktywność tego enzymu, przy czym zmianom tym nie zapobiega wcześniejsze stosowanie mekamylaminy, tubokuraryny czy atropiny. Ponadto mekamylamina i tubokuraryna, stosowane same w dawkach odpowiednio  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  i  $1 \text{ } \mu\text{g/szczura}$ , również zmniejszają aktywność GAD, a w pozostałych dawkach pozostają bez wpływu na tę aktywność. Również związki pobudzające cholinergiczne receptory M, tj. pilokarpina i fizostygmina, nie zmieniają aktywności enzymu w stosowanych dawkach. Nie ma więc korelacji między aktywnością GAD a poziomem GABA pod wpływem badanych związków. Przyczyną tego mogą być zmiany aktywności GABA-T, enzymu odpowiedzialnego za rozkład GABA. Enzym ten jest bowiem bardzo labilny, ulega inaktywacji w warunkach hipoksji oraz pod wpływem licznych czynników toksycznych (5, 7).

## W n i o s k i

1. Stymulacja cholinergicznym receptorów M powoduje w mózdku zmniejszenie zawartości GABA, przy czym zmianom tym zapobiega atropina.
2. Stymulacja cholinergicznym receptorów N powoduje wzrost zawartości GABA, przy czym wpływ na układ GABA-ergiczny może odbywać się bezpośrednio oraz pośrednio z udziałem receptorów cholinergicznym M oraz noradrenergicznych  $\beta$ .
3. Poziom GABA nie zależy wyłącznie od aktywności GAD i stopnia nasilenia syntezy.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abood L. G. i wsp.: Evidence for a Noncholinergic Site for Nicotines Action in Brain: Psychopharmacological, Electrophysiological and Receptor Binding Studies. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **237**, 213, 1979.
2. Balfour D.: Studies on the Biochemical and Behavioural Effects of Oral Nicotine. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **245**, 95, 1980.
3. Bernasconi R. i wsp.: Determination of GABA Levels by a  $^3\text{H}$ -muscimol Radioreceptor Assay. *J. Neurochem.* **34**, 614, 1980.
4. Bryson R. i wsp.: Effects of Nicotine on Two Types of Motor Activity in Rats. *Psychopharmacology* **73**, 168, 1981.
5. Costa E. i wsp.: Action of Antischizophrenic Drugs on the Metabolism of  $\gamma$ -aminobutyric Acid and Acetylcholine in Brain. *Federation Proc.* **37**, 2408, 1978.
6. East J. i wsp.: Transport of GABA,  $\beta$ -alanine and Glutamate into Perikarya of Postnatal Rat Cerebellum. *J. Neurochem.* **34**, 523, 1981.
7. Giorguieff-Chesselet M. i wsp.: Regulation on Dopamine Release by Presynaptic Nicotinic Receptors in Rat Striatal Slices. Effect of Nicotine in Low Concentration. *Life Sci.* **25**, 1257, 1979.
8. Kleinrok Z., Sieklucka-Dziuba M.: The Influence of Drugs Stimulating and Inhibiting Cholinergic M and N Receptors on the GABA Level and GAD Activity in Rat Striatum. *Acta Physiol. Pol.* **33**, 567, 1982.
9. Ladinsky H. i wsp.: GABA-ergic-Dopaminergic Link in the Modulation of Cholinergic Activity. [w:] *Interaction between Putative Neurotransmitters in the Brain*. Ed. by Garattini S., Raven Press, New York 1978.
10. Lowe J. i wsp.: The Fluorometric Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase and Its Distribution in Brain. *J. Neurochem.* **3**, 8, 1958.
11. Meldrum B. i wsp.: Effects of the Bicyclic GABA Agonist, THIP, on Myoclonic and Seizure Response in Mice and Baboons with Reflex Epilepsy. *Eur. J. Pharmacol.* **61**, 231, 1980.
12. Morley B. i wsp.: Regional Distribution of Nicotine Acetylcholine Receptors in Rats Brain. *Brain Res.* **134**, 161, 1977.
13. Naik S. i wsp.: Central GABA Receptor Agonists: Comparison of Muscimol and Baclofen. *Neuropharmacology* **15**, 479, 1976.
14. Romano C., Goldstein A.: Stereospecific Nicotine Receptors on Rat Brain Membranes. *Science* **210**, 647, 1980.
15. Sieklucka-Dziuba M.: The Influence of Drugs Stimulating and Inhibiting Cholinergic M and N Receptors on the GABA Level and GAD Activity in Rat Cerebral Cortex. *Acta Physiol. Pol.* **33**, 577, 1982.
16. Sutton J., Simmonds M.: Effect of Acute and Chronic Pentobarbitone on the  $\gamma$ -aminobutyric Acid System in Rat Brain. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1801, 1974.
17. Wood P. i wsp.: Cortical Lesion Modulate Turnover Rates of Acetylcholine and  $\gamma$ -aminobutyric Acid. *Neuroscience Letters* **12**, 349, 1979.

Otrzymano 10 II 1982.

## РЕЗЮМЕ

В исследованиях проведенных на крысах штамма Вистар доказано, что стимуляция М холинергических рецепторов пилокарпином вызывает понижение уровня GABA в мозжечке. Эти изменения предотвращает атропин. Стимуляция N холинергических рецепторов лобелином и никотином вызывает повышение содержания GABA. Эти изменения предотвращают: мекамиламин, тубокурарин, и частично атропин и пропранолол.

Полученные результаты показывают, что стимуляция М холинергических рецепторов имеет непосредственное влияние на GABA-ергическую систему мозжечка, а стимуляция N холинергических рецепторов имеет непосредственное и посредственное влияние, если участвует рецептор М и адренергический рецептор  $\beta$ . Влияние исследованных средств на активность GAD является мало характеристическим. Не доказано отчетливой корреляции между активностью GAD и уровнем GABA в мозжечке.

## SUMMARY

The experiments with the rats of Vistar strain showed that the stimulation of central cholinergic M receptors by pilocarpine diminished the GABA level in the cerebellum. Atropine was found to prevent the effect of pilocarpine. The stimulation of cholinergic N receptors increased the GABA level in the cerebellum. The effects of lobeline and nicotine could be prevented by pre-treatment of mecamylamine, tubocurarine and, to a certain degree, by atropine and propranolol. The results of the examinations suggest that the stimulation of M receptors has a direct effect on the GABA-ergic system, while the stimulation of the N receptors has both direct and indirect effects with the participation of M receptor and  $\beta$ -adrenergic receptor. All the cholinergic stimulants have been shown to possess non-characteristic effects on the GAD activity. There was no strict correlation between the GAD activity and the GABA level.