

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 N
na poziom GABA i aktywność GAD w podwzgórzu szczura**

Влияние агонистов и антагонистов холинергических N-рецепторов на уровень
GABA и активность GAD в гипоталамусе крысы

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

Badania ostatnich lat przyniosły wiele danych na temat funkcji poszczególnych struktur OUN oraz roli neuroprzekaźników chemicznych. Liczne pracownie zajmują się badaniem procesów hamowania w OUN. Głównym neuroprzekaźnikiem hamującym w układzie nerwowym kręgowców jest kwas γ -aminomasłowy (GABA) — 8, 11. Jest on odpowiedzialny zarówno za hamowanie pre-, jak i postsynaptyczne. Wykazano obecność swoistych receptorów GABA-ergicznych zlokalizowanych na różnych neuronach, np. na neuronach cholinergicznych, dopaminergicznych, adrenergicznych i serotonergicznych (3, 4, 5, 8, 14). W obrębie prążkowania wykazano istnienie ścisłej zależności funkcjonalnej między układem cholinergicznym, dopaminowym i GABA-ergicznym (11, 15). W korze mózgowej układ cholinergiczny odpowiedzialny jest za zwiększanie aktywności drgawkowej, natomiast układ GABA-ergiczny hamuje tę aktywność (11, 14). W podwzgórzu wykazano obecność neuronów GABA-ergicznych oraz stwierdzono, że poziom GABA w tej strukturze jest zmienny, uzależniony od cyklu dobowego (7). Wykazano też, że GABA odgrywa znaczną rolę w neurosekrecji w tej strukturze (4, 17).

Podwzgórze nie jest strukturą jednorodną. Uważa się, że w przedniej części podwzgórza znajdują się ośrodki przywspółczulne, a w części tylnej — ośrodki współczulne. Jądra podwzgórza mają doniosłe znaczenie w regulacji czynności układu autonomicznego, przy czym części przednia i tylna mogą wywierać działanie antagonistyczne (17). Istnieją też dane sugerujące obecność interneuronów cholinergicznych w części guzowej podwzgórza (9), a także obecność dróg łączących jądro niskowzgórzowe z istotą czarną (SN) i za jej pośrednictwem — z prążkowiem. Destrukcja neuronów jądra niskowzgórzowego wywołana kwasem kainowym czy elektrolityczną leżą przednio-boczną powoduje zmniejszenie zawartości GABA w SN, a po 7 dniach także w przedniej części jądra ogoniastego (4). Z kolei podanie karba-

cholu bezpośrednio do podwzgórza powoduje natychmiastowe wygaszenie wyuczonych odruchów warunkowych wzmacnianych podawaniem pożywienia (1).

W świetle tych danych wydaje się interesujące zbadanie wpływu agonistów i antagonistów cholinergicznycy receptorów N na poziom GABA w podwzgórzu 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 stałej objętości 5 ml/kg, 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°C . Z zamrożonych mózgów pobierano podwzgórze, oznaczano w nim poziom GABA i aktywność GAD metodą spektrofluorymetryczną Lowego i wsp. (10) w modyfikacji Suttona i Simmondsa (13). Uzyskane wyniki zestawiono w postaci średnich i opracowano statystycznie przy użyciu testu *t*-Studenta. Grupy doświadczalne liczyły po 12 zwierząt.

Stosowano lobelinę (chlorowodorek lobeliny, Polfa) w dawkach 1, 5, 10 i 15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 15, 30, 60, 120 i 240 min. przed dekapitacją. Nikotyne (nikotyna, POCH) stosowano w dawkach 0,1 i 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 15 i 30 min. przed dekapitacją. Mekamylaminę (chlorowodorek mekamylaminy, Sandoz) stosowano w dawkach 2, 5 i 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 30, 60 i 120 min. przed dekapitacją. D-tubokurarynę (chlorek d-tubokuraryny, Orion) stosowano i.v.c. w dawkach 0,5 i 1 $\mu\text{g}/\text{szczura}$ w objętości 10 μl 20 min. przed dekapitacją. Następnie badano wpływ łącznego stosowania lobeliny lub nikotyiny z mekamylaminą lub tubokuraryną. W tym celu stosowano mekamylaminę (2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), a po 45 min. podawano lobelinę (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) lub nikotyne (1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Podobnie stosowano d-tubokurarynę (0,5 $\mu\text{g}/\text{szczura}$ i.v.c.) i po 45 min. podawano lobelinę lub nikotyne. Zwierzęta te dekapitowano po 15 min. od drugiej iniekcji. Badano też wpływ lobeliny i nikotyiny na poziom GABA po zablokowaniu receptorów M, α i β . W tym celu stosowano atropinę (1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i po 45 min. podawano lobelinę lub nikotyne. Podobnie stosowano fentolaminę (20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i po 45 min. podawano lobelinę lub nikotyne. Propranolol (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) stosowano również 45 min. przed podaniem lobeliny lub nikotyiny. Zwierzęta te dekapitowano po 15 min. od drugiej iniekcji.

WYNIKI I DISKUSJA

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że lobelina zastosowana w dawkach 1, 5, 10 i 15 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 15, 30, 60, 120, 240 i 480 min. przed dekapitacją zwiększa zawartość GABA w podwzgórzu szczura. Działanie takie wywiera też nikotyna zastosowana w dawkach 0,1 i 1 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 15 i 30 min. przed dekapitacją (tab. 1). W innych strukturach, jak kora mózgowa, prądkowie czy mózdzek wykazano dwufazowy wpływ lobeliny i nikotyiny na poziom GABA (14, 15, 16), zależny od ich dwufazowego — stymulującego i blokującego — działania na receptory cholinergiczne N.

Wykazano też, że mekamylamina (1, 2, 5 i 10 mg·kg⁻¹ 30, 60, 120 i 240 min. przed dekapitacją), antagonistą receptora N typu zwojowego i d-tubokuraryna (0,5 i 1 µg/szczura i.v.c. 20 min. przed dekapitacją), antagonistą receptora N typu mięśniowego, również zwiększają zawartość GABA w podwzgórzu (tab. 2). Poziom GABA pozostawał podwyższony po łącznym stosowaniu ago- i antagonistów receptorów N (mekamylamina + lobelina, mekamylamina + niktotylna, d-tubokuraryna + lobelina, d-tubokuraryna + niktotylna — tab. 3). Przytoczone dane pozwalają przypuszczać, że w podwzgórzu dochodzi do blokowania cholinergicznyc re-

Tab. 1. Wpływ lobeliny i nikotyny na poziom GABA w podwzgórzu szczura
Effect of lobeline and nicotine on the GABA level in the rat hypothalamus

Stosowano w mg·kg ⁻¹ i.p.	Czas (min.)	Poziom GABA w µg/1 g tkanki ±SE	Kontrola %
Kontrola	—	429 ±7,1	100
Lobelina 1	15	483 ±30,2*	112
Lobelina 5	15	497 ±23,4*	116
Lobelina 5	30	452 ±21,1*	105
Lobelina 10	30	486 ±15,0*	113
Lobelina 10	60	478 ±16,9*	111
Lobelina 10	120	503 ±24,6*	117
Lobelina 10	240	491 ±9,2*	114
Lobelina 10	480	512 ±26,8*	119
Lobelina 15	30	497 ±11,8*	116
Nikotylna 0,1	15	472 ±14,9*	110
Nikotylna 1	15	499 ±13,8*	116
Nikotylna 1	30	481 ±14,2*	112

* $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą.

* $P < 0.05$ in comparison with the control.

Tab. 2. Wpływ mekamylaminy mg·kg⁻¹ i.p. i d-tubokuraryny (µg/szczura i.v.c.) na poziom GABA w podwzgórzu szczura
Effect of mecamylamine mg·kg⁻¹ i.p. and d-tubocurarine (µg/rat i.v.c.) on the GABA level in the rat hypothalamus

Stosowano	Czas (min.)	Poziom GABA w µg/1 g tkanki ±SE	Kontrola %
Kontrola		429 ±7,1	100
Mekamylamina 1	60	516 ±11,8*	120
Mekamylamina 2	60	493 ±14,5*	115
Mekamylamina 5	30	523 ±12,0*	124
Mekamylamina 5	60	577 ±24,0*	134
Mekamylamina 5	120	601 ±32,0*	140
Mekamylamina 5	240	596 ±15,5*	138
Mekamylamina 10	60	541 ±19,3*	126
Tubokuraryna 0,5	20	437 ±18,2	102
Tubokuraryna 1	20	497 ±19,8*	116

* $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą.

* $P < 0.05$ in comparison with the control.

Tab. 3. Wpływ łącznego stosowania mekamylaminy ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) i d-tubokuraryny ($\mu\text{g}/\text{szczura}$ i.v.c.) z lobeliną ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) lub nikotyną ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) na poziom GABA w podwzgórzu szczura

Effect of simultaneous administration of mecamylamine ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) and d-tubocurarine ($\mu\text{g}/\text{rat}$ i.v.c.) with lobeline ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) or nicotine ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ i.p.) on the GABA level in the rat hypothalamus

Stosowano	Czas (min.)	Poziom GABA w $\mu\text{g}/1$ g tkanki $\pm\text{SE}$	Kontrola %
Kontrola		429 $\pm 7,1$	100
Lobelina 5	15	497 $\pm 23,4^*$	116
Nikotyna 1	15	499 $\pm 13,8^*$	116
Mekamylamina 2	60	463 $\pm 11,8^*$	108
Mekamylamina 2	60	490 $\pm 17,6^*$	114
+Lobelina 5	15		
Mekamylamina 2	60	500 $\pm 18,3^*$	116
+Nikotyna 1	15		
Tubokuraryna 0,5	20	437 $\pm 18,2$	102
Tubokuraryna 0,5	20		
+Lobelina 5	15	498 $\pm 16,4^*$	116
Tubokuraryna 0,5	20		
+Nikotyna 1	15	502 $\pm 19,9^*$	117

* $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą.

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

ceptorów N przez lobelinę i nikotynę już w dawkach, w których w innych strukturach związki te wywołują ich pobudzenie. Wydaje się, że receptory nikotynowe wywierają w tej strukturze toniczny wpływ na układ GABA-ergiczny (6), a ich zablokowanie prowadzi do wzrostu zawartości GABA w wyniku przewagi impulsacji innych układów neuroprzekaznikowych (12). Zablokowanie receptorów M przy użyciu atropiny ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 min. przed dekapitacją) pozostaje bez wpływu na poziom GABA. Ale atropina zastosowana 45 min. przed lobeliną lub nikotyną zapobiega zwiększaniu zawartości GABA pod wpływem tych związków (tab. 4). Podobne wyniki uzyskano po podaniu propranololu ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 min. przed dekapitacją), antagonisty receptora adrenergicznego β . Natomiast fentolamina ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 60 min. przed dekapitacją) nie zmieniała wpływu lobeliny i nikotyny na poziom GABA w tej strukturze (tab. 5). Fakty te pozwalają wnioskować, że receptory cholinergiczne M oraz adrenergiczne β biorą udział w zwiększaniu poziomu GABA w podwzgórzu po zablokowaniu receptorów N. Zniesienie neurotransmisji w tych receptorach przy równoczesnym zablokowaniu receptorów N uniemożliwia wzrost zawartości GABA.

Zarówno lobelina, jak i nikotyna, a także mekamylamina zmniejszają aktywność dekarboksylazy glutaminowej (GAD) w podwzgórzu. Pozostałe związki, tj. d-tubokuraryna, atropina i propranolol, nie zmieniają aktywności tego enzymu. Tak więc wzrost poziomu GABA nie jest spowo-

Tab. 4. Wpływ atropiny zastosowanej łącznie z lobeliną lub nikotyną na poziom GABA w podwzgórzu szczura
Effect of atropine administered with lobeline or nicotine on the GABA level in the rat hypothalamus

Stosowano w mg · kg ⁻¹ i.p.	Czas (min.)	Poziom GABA w µg/1 g tkanki ±SE	Kontrola %
Kontrola		429 ±7,1	100
Lobelina 5	15	497 ±23,4*	116
Nikotyna 1	15	499 ±13,8*	116
Atropina 1	60	430 ±8,8	100
Atropina 1 +Lobelina 5	60 15	442 ±9,5**	103
Atropina 1 +Nikotyna 1	60 15	456 ±14,1**	106

- * $P < 0,05$ 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 and nicotine.

Tab. 5. Wpływ lobeliny i nikotyny na poziom GABA w podwzgórzu szczurów podanych działaniu fentolaminy lub propranololu
Effect of lobeline and nicotine on the GABA level in the hypothalamus of the rats which previously were given fentolamine or propranolol

Stosowano w mg · kg ⁻¹ i.p.	Czas (min.)	Poziom GABA w µg/1 g tkanki ±SE	Kontrola %
Kontrola		429 ±7,1	100
Lobelina 5	15	497 ±23,4*	116
Nikotyna 1	15	499 ±13,8*	116
Propranolol 5	60	428 ±9,6	100
Fentolamina 20	60	433 ±13,4	101
Propranolol 5 +Lobelina 5	60 15	443 ±11,5**	103
Propranolol 5 +Nikotyna 1	60 15	436 ±13,4**	101
Fentolamina 20 +Lobelina 5	60 15	508 ±14,5*	118
Fentolamina 20 +Nikotyna 1	60 15	497 ±14,3*	116

- * $P < 0,05$ 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 and nicotine.

dowany nasileniem syntezy, a może jedynie wynikać z jego zmniejszonego katabolizmu (2, 11).

Podsumowując uzyskane wyniki można stwierdzić, że receptory N w podwzgórzu ulegają blokowaniu przez lobelinę i nikotynę bez wstępnej fazy pobudzenia. Zablockowanie tych receptorów prowadzi do wzrostu zawartości GABA, co przemawia za bezpośrednim wpływem receptorów N

na układ GABA-ergiczny w tej strukturze. Ponadto receptory cholinergiczne M oraz adrenergiczne β biorą udział w zwiększaniu zawartości GABA po zniesieniu tonicznego wpływu receptorów N na układ GABA-ergiczny. Zablokowanie receptorów M lub β przy równoczesnym zablokowaniu receptorów N normalizuje zawartość GABA w podwzgórzu. Może to świadczyć o pośrednim wpływie receptorów N na układ GABA-ergiczny poprzez receptory M i β .

Lobelina, nikotyna i mekamylamina nieznacznie hamują aktywność GAD, co jest dowodem, że wzrost zawartości GABA nie jest spowodowany nasileniem jego syntezy, a może jedynie wynikać ze zmniejszonego katabolizmu.

PIŚMIENNICTWO

1. Abood L. C. i wsp.: Evidence for a Noncholinergic Site for Nicotine's Action in Brain: Psychopharmacological, Electrophysiological and Receptor Binding Studies. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **237**, 213, 1979.
2. Balfour D. J.: Studies on the Biochemical and Behavioural Effects on Oral Nicotine. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **245**, 95, 1980.
3. Bernasconi R. i wsp.: Determination of GABA Levels by a ^3H -muscimol Assay. *J. Neurochem.* **34**, 614, 1980.
4. Block G., Billiar R.: Properties and Regional Distribution of Nicotinic Cholinergic Receptors in the Rat Hypothalamus. *Brain Res.* **212**, 152, 1981.
5. Braestrup C.: Partial Agonists for Brain GABA/Benzodiazepine Receptor Complex. *Nature* **280**, 331, 1979.
6. Bryson R. i wsp.: Effects of Nicotine on Two Types of Motor Activity in Rats. *Psychopharmacology* **73**, 168, 1981.
7. Cattabeni F. i wsp.: Circadian Fluctuations in Rat Hypothalamus. *J. Neurochem.* **31**, 565, 1978.
8. Costa E.: Some New Vistas of Neuronal Communication Mechanisms: Impact on the Neuropharmacology of GABA Transmission. Ed. Garattini S., Pujol J., Samanin R., Raven Press, New York 1978.
9. Increase in Striatal Acetylcholine by Picrotoxine in the Rat: Evidence for GABA-ergic-Dopaminergic-Cholinergic Link. *Brain Res.* **108**, 351, 1976.
10. Lowe J. i wsp.: The Fluorometric Measurement of Glutamic Acid Decarboxylase and Its Distribution in Brain. *J. Neurochem.* **3**, 8, 1958.
11. Roberts E.: γ -aminobutyric Acid and Nervous System Function — a Perspective. *Commentary. Biochem. Pharmacol.* **23**, 2637, 1974.
12. Romano C., Goldstein A.: Stereospecific Nicotine Receptors on Rat Brain Membranes. *Science* **210**, 647, 1980.
13. Sutton J., Simmonds M.: Effect of Acute and Chronic Pentobarbitone on the γ -aminobutyric Acid System in Rat Brain. *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1801, 1974.
14. 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.

15. Sieklucka-Dziuba M., Kleinrok Z.: 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.
16. Sieklucka-Dziuba M., Kleinrok Z.: Wpływ agonistów i antagonistów cholinergicznych receptorów M i N na poziom GABA i aktywność GAD w mózdku szczura. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin, Sectio D* **37**, 293, 1982.
17. Yoshida K., Imura H.: Nicotinic Cholinergic Receptors in Brain Synaptosomes. *Brain Res.* **172**, 453, 1979.

Otrzymano 10 II 1982.

РЕЗЮМЕ

В исследованиях проведенных на крысах штамма Вистар доказано, что лобелин и никотин, а также мекамиламин и d-тубокурарин повышают содержание GABA в гипоталамусе. После совместного применения лобелина или никотина с мекамиламином или d-тубокурарином уровень GABA в гипоталамусе повышается. Полученные результаты показывают, что лобелин и никотин обладают блокирующим, без вступительной стимулирующей фазы, действием на холинергические N-рецепторы этой мозговой структуры. Действие лобелина и никотина частично тормозит применение атропина и пропранолола. Это свидетельствует о участии M-холинергических и β -адренергических рецепторов в повышении уровня GABA после блокады тонического влияния холинергических N-рецепторов на GABA-эргическую систему гипоталамуса.

Торможение активности GAD лобелином, никотином, а также мекамиламином свидетельствует, что увеличение содержания GABA в гипоталамусе может происходить только через блокаду катаболизма этого нейромедиатора.

SUMMARY

Experiments with Wistar rats showed that lobeline and nicotine or mecamlamine and d-tubocurarine increased the GABA level in the hypothalamus. The GABA level also increased following simultaneous administration of lobeline and nicotine with mecamlamine or d-tubocurarine. The results showed that lobeline and nicotine exerted inhibitory effect on the N receptors in this structure without primary stimulation. The effects of lobeline and nicotine were partly prevented by pretreatment with atropine or propranolol. This fact may suggest an indirect role of M cholinergic and β -adrenergic receptors in increasing the GABA level after abolishing tonic action of N-cholinergic receptors on the GABA-ergic system. The inhibition of the GAD activity by lobeline, nicotine and mecamlamine suggests that an increase in the GABA content may be a result of inhibited catabolism of this neurotransmitter.

