

NAUČNO DRUŠTVO SR BOSNE I HERCEGOVINE

# RADOVI

KNJIGA XXIII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 10.

Urednik  
NEDO ZEC,  
redovni član Naučnog društva SR BiH



SARAJEVO  
1964

BOGDAN BOŠKOVIĆ, OLGA DARVAŠ i PAVEL ŠTERN

## UTICAJ NEUROFARMAKA NA KOLIČINU HOLINA U MOZGU

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka održanoj 19. V 1964. g.)

Opće biološko značenje acetilholina (AcH) pobudilo je tako ogroman interes da postoji gotovo nepregledna literatura o toj problematici. Međutim dok se o samom acetilholinu, tj. njegovom metabolizmu, fiziološkoj i patofiziološkoj funkciji, zna veoma mnogo, kao i o njegovoj očnoj komponenti, ne možemo to isto reći za njegovu holinsku (Ch) komponentu.<sup>1</sup>

Doduše, poznato je prilično mnogo o postanku Ch i o njegovoj ulozi kao vitamina. Znamo da Ch ima važnu ulogu kao metilni donator i u CNS-u.<sup>2</sup> Mnogo se manje zna, za razliku od AcH, kako farmaci utiču na metabolizam i količinu Ch u nervnom sistemu. Budući da je Ch sastavni dio molekula AcH i na njega se veže očena komponenta, smatramo da je od interesa da se jednom sistematski prostudira utjecaj specijalno neurofarmaka na količinu Ch u CNS-u. Ovo je postalo utoliko interesantnije što je Mathews<sup>3</sup> pokazao da povećanje Ch u nervnom tkivu dovodi do povećanja AcH. Mnogi od tih farmaka koje smo mi ispitali utiču na holinesterazu (ChE) ili holinacetilazu, pa je problem zbog toga još interesantniji.

### METODIKA

Mi smo određivali Ch metodom papirnatih kromatografija Char-gaffa i Levina<sup>4</sup> modificiranom po Košaku.<sup>5</sup> Time se određuje ukupan Ch, onaj iz lipida i drugih izvora, pa i iz AcH. Pokusi su bili izvedeni na bijelim miševima oba spola, težine oko 20 gr. U svakoj grupi bilo je najmanje 10 miševa. Supstancije su davane uvijek intraperitonealno, osim u slučaju strihnina, a otapane su u vodi. Jedino u slučaju morina kao otapalo je služio propilen-glikol. Životinje su žrtvovane 1 h poslije primanja supstancije, ukoliko nije drukčije naglašeno. Mozak je izvađen što je brže bilo moguće i procedura određivanja holina sprovedena po citiranoj metodi. Statistička obrada vršena je prema »Principles of biological Assay«, Chapman and Hall itd., London, 1948.

Ispitana su kako se vidi iz priložene tabele, 33 različita spoja sa efektima više ili manje ispoljenim na CNS-u. Tako je upotrijebljen acetilholin, grupa centralnih relaksancija, jedan barbiturat, trankvi-

lancija, antidepresivi, konvulzantna sredstva, antihistaminici, blokatori holinesteraze, pa supstancije za koje znamo iz vlastitog iskustva ili literature da utiču na aktivitet holinacetilaze. Isto tako ispitali smo 5-hidroksi-triptofan i L-dopu, te  $\alpha$ -metil-dopu, jedan inhibitor dekarboksilaze, koja pretvara spomenute aminokiseline u njihov amin.<sup>6</sup> Konačno, ispitali smo 3 spoja, za koje smo našli da utiču na aktivaciju koencima A. Naposljetku, bio je ispitan i hemiholin, jedan poznati otrov u prenosu holina, a čiji antagonist je sam Ch.

TABELA  
DJELOVANJE NEUROFARMAKA RAZLIČITIH FARMAKOLOŠKIH  
KARAKTERISTIKA NA KOLIČINU HOLINA U CNS-u MIŠA

| Supstancija                                                               | Doza<br>mg/kg | Količina<br>holin-klorida<br>mg% $\pm$ SE | P                 | Opaska       |
|---------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------------------|-------------------|--------------|
| Kontrola                                                                  |               | 164,1 $\pm$ 6,15                          | 0,1               |              |
| 1. Acetilholin<br>klorid                                                  | 25            | 150,2 $\pm$ 3,32                          | 0,05              |              |
| 2. Armin                                                                  | 0,3           | 147,4 $\pm$ 9,1                           | < 0,05            |              |
| 3. Meproamat                                                              | 200           | 195,7 $\pm$ 12,17                         | < 0,02<br>> 0,05  |              |
| 4. Mephenzin                                                              | 200           | 203,9 $\pm$ 7,13                          | 0,001             |              |
| 5. Mebutamat                                                              | 100           | 176,0 $\pm$ 1,97                          | < 0,1<br>> 0,05   |              |
| 6. Carosopridol                                                           | 100           | 196,4 $\pm$ 3,22                          | 0,001             |              |
| 7. Phenobarbiton                                                          | 100           | 161,4 $\pm$ 9,47                          |                   |              |
| 8. Rezerpin                                                               | 2,5           | 177,0 $\pm$ 5,48                          |                   | 24 h prije   |
| 9. Hidroksisin                                                            | 25            | 161,8 $\pm$ 4,52                          |                   |              |
| 10. N-Beznyd-N-<br>methyl-2-<br>-pronilamine<br>hydrochloride<br>(Mo-911) | 100           | 164,3 $\pm$ 4,49                          |                   | 24 h prije   |
| 11. Imipramin                                                             | 100           | 151,0 $\pm$ 3,9                           | 0,1<br>0,05       |              |
| 12. Pentazol                                                              | 80            | 165,8 $\pm$ 4,03                          |                   |              |
| 13. Strichnin                                                             | 0,25          | 193,0 $\pm$ 5,74                          | < 0,001           | s. c.        |
| "                                                                         | 0,5           | 199,2 $\pm$ 4,6                           | < 0,001           | s. c.        |
| 14. I. S. 1.757                                                           | 0,2           | 154,9 $\pm$ 3,0                           |                   |              |
| 15. Tetanus                                                               | 0,76/miša     | 192,6 $\pm$ 1,53                          | < 0,001           | 5 dana prije |
| 16. Pikrotoxin                                                            | 6             | 143,8 $\pm$ 2,92                          | 0,01              |              |
| 17. Nikotin                                                               |               | 164 > 0,6                                 | 0,001             |              |
| 18. Meprimin                                                              | 25            | 189,9 $\pm$ 3,05                          | < 0,01<br>< 0,001 |              |

| Supstancija                                                       | Doza<br>mg/kg    | Količina<br>holin-klorida<br>mg% $\pm$ SE | P <sup>+</sup>    | Opaska |
|-------------------------------------------------------------------|------------------|-------------------------------------------|-------------------|--------|
| 19. Orphenadrin                                                   | 10               | 167,4 $\pm$ 4,19                          |                   |        |
| 20. Atropin                                                       | 50               | 181                                       | < 0,04            |        |
| 21. Recosen                                                       | 01-ml-20<br>gr   | 199,09 $\pm$ 3,56                         | > 0,001           |        |
| 22. Tremorin                                                      | 25               | 167,8 $\pm$ 2,45                          | < 0,001           |        |
| 23. Insulin                                                       | 0,01<br>jedinica | 203,7 $\pm$ 9,9                           | 0,01<br>0,001     |        |
| 24. Morin                                                         | 50               | 128,4 $\pm$ 7,37                          | < 0,01<br>> 0,001 |        |
| 25. Propilen-<br>-glikol                                          | 0,1 ml<br>20 gr  | 158,8 $\pm$ 3,5                           |                   |        |
| 26. L-dihydroxy-<br>-phenil<br>alanin-l-dopa                      | 200              | 164,8 $\pm$ 3,9                           |                   |        |
| 27. DL-hydroxy-<br>-triptohan                                     | 200              | 140,5 $\pm$ 2,07                          | > 0,01<br>< 0,001 |        |
| 28. $\alpha$ -metil-dopa                                          | 200              | 164,1 $\pm$ 2,17                          |                   | 24 h   |
| 29. 2-n-heptilmer-<br>kapto-2 : 2-<br>-difenil-octena<br>kiselina | 143              | 188,9 $\pm$ 2,97                          | 0,01<br>0,001     |        |
| 30. 2-n-oktilmer-<br>kapto-2 : 2-<br>difenil-octena<br>kiselina   | 170              | 200,7 $\pm$ 2,31                          | < 0,001           |        |
| 31. 4-hydroxy-<br>marin                                           | 10               | 182,2 $\pm$ 4,56                          | 0,05<br>0,02      |        |
| 32. HC3                                                           | 170              | 200,7 $\pm$                               | < 0,001           |        |
| 33. Botulinus LD <sub>50</sub>                                    |                  | 174,0                                     | 0,6               |        |

Kako vidimo, acetilholin nešto snižuje holin u CNS-u. To, možda, možemo pripisati kočenju ChE u mozgu. Vrlo je interesantna grupa centralnih relaksancija u koju spadaju: *mefenezin*,<sup>7</sup> *meprobamat*,<sup>8</sup> *mebutamat*<sup>9</sup> i *karosopridol*<sup>10</sup>. Sve ove supstancije povisuju Ch u CNS-u, i to signifikantno, osim mebutamata, u kom slučaju povišenje nije signifikatno. Mi smo ispitali utjecaj ovih centralnih relaksancija, budući da povisuju holin u mozgu, i njihov efekt u odnosu prema trovanju sa HC<sub>3</sub>. Pokazalo se da su sve one antagonisti  $\alpha$ ,  $\alpha$ -dimetiletanolamino 4,4'-biacetofenone (HC<sub>3</sub>).<sup>11</sup> Budući da HC<sub>3</sub> sprečava transport holina<sup>12</sup>, a već sam Ch mu je antagonist, ovi na-

\* Prema upotrijebljenoj statističkoj metodi, signifikantni su rezultati kad je  $P < 0,05$ .

lazi govore u tom smislu da centralna relaksancija omogućuje transport Ch i na taj način djeluje antagonistički na HC<sub>3</sub>. Fenobarbiton ne mijenja količinu Ch u CNS-u, iako je poznato da barbiturati povišuju acetilholin u mozgu.<sup>13,14</sup> Bez efekta su i rezerpin i hidroksisin, koji djeluju smirujuće. Isto tako nema efekta inhibitor monoamino-oksidge N-benzil-N-metil-2-pronilamine hidrokloride (Mo-911),<sup>15</sup> dok ga imipramin snizuje. Interesantno je da pentazol nema nikakvog efekta, dok strihnin signifikantno povišuje Ch u CNS-u. Već je srodnik strihnina IS 1.757<sup>16</sup> bez efekta, ali zato tetanus-toksin, koji ima sličan mehanizam djelovanja kao strihnin,<sup>17</sup> djeluje isto kao taj alkaloid. Pikrotoksin snizuje, dok nikotin nema nikakvog efekta, iako oba uzrokuju konvulzije. Od antihistaminika meprimin povišuje, a orfenadrin je bez efekta. Armin snizuje Ch. Aktivatori holinacetilaze rekozen<sup>18</sup> i tremorin,<sup>19,20</sup> te inzulin signifikantno povišuju, što se moglo i očekivati, dok inhibitor ovog fermenta, morin,<sup>21</sup> signifikantno snizuje, što smo isto očekivali. Propilen-glikol, otapalo morina, je bez efekta. Aminokiselina 5-hidroksi-triptofan snizuje, a L-dopa je bez efekta. Inhibitori koencima A, 2-n-heptilmerkapt-2 : 2-difenil-octena kiselina (heptil), 2-n-oktilmerkapt-2 : 2-difenil-octena kiselina (oktil) i aktivator 4-hidroksi-kumarin,<sup>22</sup> djeluju u smislu povišivanja na količinu holina u mozgu. HC<sub>3</sub> smo isto ispitali, jer nismo našli u literaturi da bi to neko učinio, i našli ono što smo očekivali; on znatno snizuje Ch u mozgu. Botulinus-toksin A, koji, navodno, djeluje slično kao HC<sub>3</sub>,<sup>12</sup> povišuje nešto Ch u CNS-u, ali ne signifikantno.

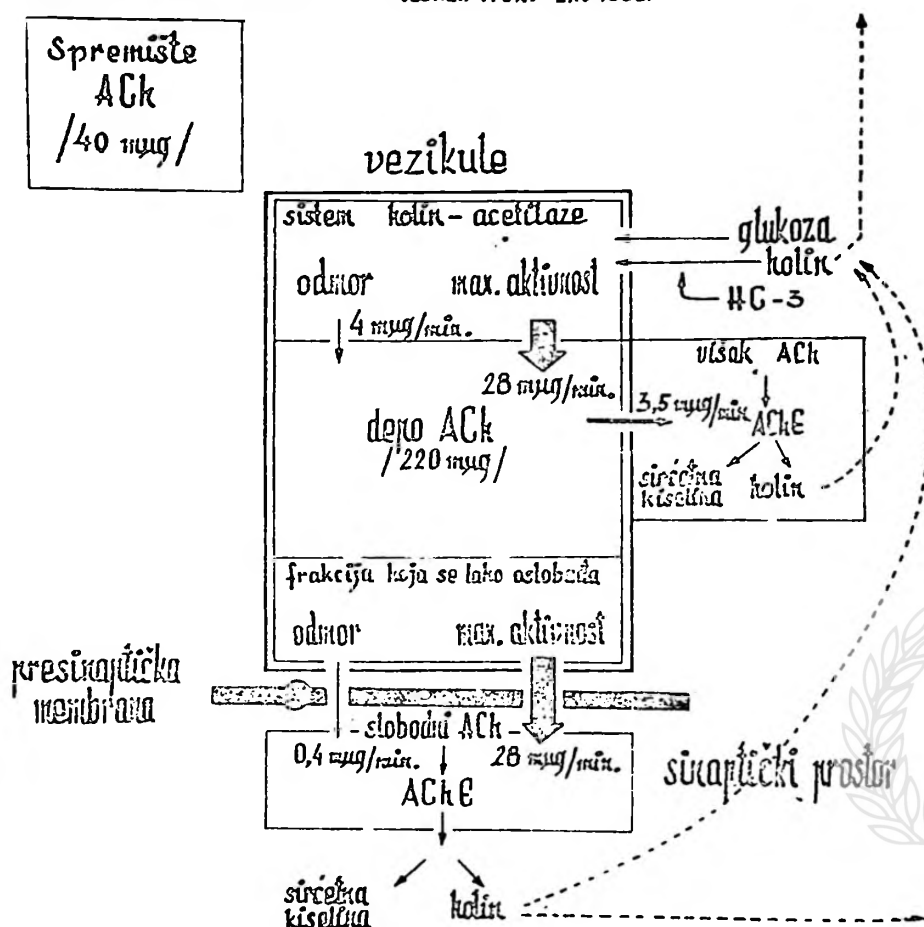
## DISKUSIJA

Vrlo je teško naći jedinstvenu interpretaciju za sve naše rezultate, što dobrim dijelom proizlazi iz činjenice da ne poznajemo dovoljno metabolizam Ch i ne znamo na koje sve komponente u metabolizmu Ch ima direktno ili indirektno djelovanje. Sama injekcija čistog Ch nema efekta na CNS, jer ova baza ne prozali hemoencefalnu barijeru.<sup>23</sup> Vjerojatno se on sintetizira iz glicerina, putem serina, mono-etil-etanol-amina i di-etil-etanol-amina, a ovaj prelazi pomoću S-adenozil-metionina u Ch.<sup>2</sup> Danas još tačno ni ne znamo kako se on oslobađa iz lipida u momentu sinteze u AcH i šta je njegova sudbina nakon hidrolize AcH. Perry<sup>24</sup> misli da jedan dio holina poslije hidrolize AcH na postsinaptičkoj membrani ponovo dolazi do presinaptičke regije, odakle aktivnim transportom prelazi u unutrašnjost aksona i služi za resintezu AcH. Ovu predodžbu će nam jako olakšati slika jednog rada Birksa i Mc Intoshca.<sup>25</sup>

Najvjerojatnija je Režekova pretpostavka da skretanje pH na kiselu stranu uslijed nakupljanja octene kiseline ili, bolje rečeno, acetyl-koenzima A dovodi do oslobađanja Ch.<sup>26</sup> Nadalje, nije jasno kako Ch u normalnim količinama, a osobito ukoliko je povišen ili snižen, utiče na holinesterazu i holinacetilazu in vivo. Iz svega toga vidimo kako je težak pokušaj interpretacije metabolizma Ch, pod utjecajem ovoliko farmaka koje smo mi ispitali. Kako vidimo, farmakološki slične grupe nemaju uvijek isti efekat na njegovu količinu u mozgu, ali katkada ipak ima pravilnosti.

PRESINAPTICKA VLAKNA

PRESINAPTICKI ZAVRŠECI



ŠEMATSKI PRIKAZ METABOLIZMA ACETILHOLIINA  
GORNJEŠE VRATNOG GANGLIJA MAČKE PREMA  
BIRKS-u I MAC INTOSH-u.

ACh, kako smo rekli, signifikantno snižuje Ch u mozgu. Poznato je da ACh u suvišku inhibira acetilholinesterazu,<sup>1</sup> pa bismo morali očekivati prije porast Ch nego njegov pad. Poznato je da životinje mogu da prežive trovanje i visokim dozama organofosfata uz vrlo nisku aktivnost ChE u CNS-u, ako je holinergični receptor zaštićen.<sup>27</sup> Višak ACh koji se nalazi u CNS-u poslije inhibicije ChE difundira na periferiju, pri čemu dolazi do smanjenja i holina u CNS-u. Prema tome upravo zato što nam farmakološki slične grupe ili farmaci iz iste farmakološke grupe ne djeluju uvijek jednako, moramo uzeti u obzir, možda, kao najbitniji faktor koji utiče na količinu

Ch njegovu difuziju na periferiju ili transport u nervnu stanicu (vidi sliku).

Naši rezultati pokazuju da postoji izvjesna korelacija između količine holina i aktivnosti holinacetilaze. Ovakvo tumačenje dozvoljava nalaz da morin, koji inhibira holinacetilazu, snažno snizuje holin u mozgu, i to najjače od svih supstancija koje smo ispitali. Vjerovatno uslijed inhibicije holinacetilaze odlazi Ch na periferiju. Potpuno obrnuti efekt ima rekozen i tremorin, te inzulin. Mi smo našli za rekozen i tremorin da aktiviraju holin-acetilazu,<sup>18,19</sup> i, kako vidimo iz tabele, sve ove tri supstancije signifikantno povišuju holin u mozgu. Za inzulin znamo da djeluje indirektno na holinacetilazu snizivanjem šećera.<sup>28</sup> Sredstva koja dovode do umirenja, kao rezerpin i hidroksisinsin, su bez efekta na količinu Ch u mozgu. Isto tako je bez efekta i fenobarbiton, iako povećava AcH r CNS-u.<sup>13</sup>

O značenju povećanja Ch za aktivnost CNS-a ima u literaturi podataka. Ako štakorima dajemo dimetil-amino-etanol, koji prodire u CNS, pa dođe do povišenja Ch u mozgu, dolazi i do povećane osjetljivosti, primjerice, prema audiogenim grčevima.<sup>29</sup> Smirivanje životinje, kako vidimo, nije praćeno promjenom holina u CNS. Pfeiffer je našao da kod miševa sa povišenim Ch u CNS-u uslijed davanja dimetil-amino-etanola dolazi do povećane osjetljivosti za pentazol.<sup>30</sup> Kako vidimo iz naše tabele, pentazol ne mijenja količinu Ch u mozgu. No strihnin i tetanus-toksin, koji djeluju na isti način inhibicijom inhibitornih mehanizama,<sup>17</sup> snažno povišuju holin u mozgu.

Nije vjerovatno da to znači naglu potrošnju AcH jer, prema Herkenu, AcH je snižen u slučaju konvulzivnih stanja. Možda to znači ne potrošnju nego sintezu AcH, jer vidimo da aktivatori holinacetilaze također povišuju Ch. Interesantno je da I. S. 1.757, koji slično djeluje kao strihnin,<sup>16</sup> ne djeluje na količinu Ch, dok pikrotoksin, izrazito konvulzivni otrov, snizuje, a nikotin je bez efekta. Kako vidimo, u ovoj grupi, koja izaziva grčeve, postoje potpuno različiti efekti s obzirom na metabolizam Ch, što jasno govori o različitim uzrocima izazivanja grčeva pomoću ovih supstancija. Grčevi su samo konačni efekt njihovog djelovanja, a uzroci njihovog postanka i zahvatna tačka u CNS-u su posve različiti. Treba, možda, ipak primijetiti da pentazol i pikrotoksin djeluju konvulzivno direktno ekscitacijom kore, dok strihnin i tetanus uzrokuju konvulzije inhibicijom inhibitornih mehanizma CNS-a. Dakle neka pravilnost ipak postoji.

Grupa heptil-oktil, koja obuhvata izrazite inhibitore koencima A<sup>22</sup> i prema tome indirektno inhibitore holinacetilaze, povišuju Ch u mozgu. Začudo, tako djeluje i aktivator CoA 4-hidroksi-kumarin,<sup>22</sup> dakle isto kao aktivatori holinacetilaze. Ovaj nalaz jako iznenađuje, ali govori u prilog tome da je metabolizam Ch na određenim nivoima neovisan od uloge Ch u sintezi AcH.

Aminokiseline 5-hidroksi-triptofan i L-dopa djeluju različito. L-dopa je bez efekta, dok 5-hidroksi-triptofan snizuje Ch. Poznato je da serotonin, u koji se pretvara ova aminokiselina, djeluje antagonistički na AcH.<sup>31</sup>  $\alpha$ -metil-dopa u organizmu djeluje slično dopaminu, pa nije čudo da je ovdje imala isti efekt kao i L-dopa.

Budući da nismo mogli doći do zadovoljavajuće interpretacije za sve ispitivane supstancije prisiljeni smo da uvedemo, kako smo već spomenuli, još jedan faktor koji, vrlo vjerojatno, ima važnu ulogu za stanje Ch u CNS-u. To je pitanje difuzije Ch iz CNS-a, ali i lakšeg transporta Ch u stanicu, gdje se ponovno pretvara u AcH. Ch može da difundira pod uticajem raznih farmaka različitom brzinom. Prema tome za količinu Ch bila bi od važnosti 2 faktora. Prvo, utjecaj tih farmaka na njegov transport u AcH, drugo, brzina transporta iz mozga ili u stanicu gdje se sintetizira Ch u AcH.

## ZAKLJUČAK

Ispitano je djelovanje 33 neurofarmaka različitih farmakoloških karakteristika na količinu holina u CNS-u miša. Metoda kojom smo se mi služili daje ukupni holin, dakle i onaj iz AcH-a. Analiza je pokazala da ne postoji pravilnost odnosa farmakološkog efekta i količine holina između srodnih ili antagonističkih farmakoloških grupa. Utjecaj ovih spojeva na aktivitet holinesteraze ili holinacetilaze isto nije mogao rastumačiti količinu Ch u mozgu. Najvjerojatnije pojedini farmaci iz iste farmakološke grupe različito utiču na transport holina iz CNS-a i u stanicu, gdje se ponovno pretvara u AcH.

BOGDAN BOŠKOVIĆ, OLGA DARVAŠ AND PAVEL ŠTERN

## THE INFLUENCE OF NEUROPHARMACA ON THE CONTEN OF CHOLINE IN BRAIN

### SUMMARY

The influence of 33 drugs, from various pharmacological groups, on the content of choline in the mouse brain have been tested. The method we used gives the total amount of choline including one from acetylcholine. Results have shoven that there is no correlation between the pharmacologic effect and the content of choline, when the drugs from similar or antagonistic pharmacologic groups were used. The influnce of these compounds on the activity of cholinesterase or cholinacetylase was not in relation with the content of choline. Some drugs from the same pharmacologic group probable act differently the choline diffusion from central nervous system.

## LITERATURA

1. Koelle G. B.: Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Ergänzungsaband 15, Springer Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg, 1963.
2. Kates M.: Lipolytic enzymes, 165, iz Konrad Bloch »Lipide Metabolism« John Wiley & Sons, Inc. New York — London, 1960.
3. Matthews E. K.: Brit. J. Pharmacol, 21, 244 (1963).
4. Chargaff E., Levine C.: JOURNAL of Biol. Chem, 192, 465 (1951).
5. Košak R.: Acta Pharm. Jug. 4, 119 (1959).
6. Sourkes T.: Arch. Biochem. Biophys. 51, 444 (1954).
7. Berger F. M., Bradley W.: Brit. J. Pharmacol. 1, 265 (1946).
8. Berger F. M.: J. Pharm. Exper. Therap. 112, 413 (1954).
9. Berger F. M., Douglas J. F., Kletzkin M., Ludwig J., Margolin S.: J. Pharm. Exper. Therap. 134, 356 (1961).
10. Berger F. M., Kletzkin M., Ludwig B. J., Margolin S., Powell L. S.: J. Pharm. Exper. Therap. 127, 66 (1959).
11. Stern P., Bošković B.: De Medicina Tuenda, u štampi.
12. Schueler F. W., Pfeiffer C. C., Smythies J. R.: »International Review of Neurobiology« vol 2, Academic Press, New York — London, 77 (1960).
13. Herken H., Neubert D.: Arch. Exper. Pharmacol. 219, 223 (1953).
14. Feldberg W. J.: Physiol. (Lond.) 107, 327 (1948).
15. Spector S.: Annals of the New York Academic of Sciences 107, 856 (1963).
16. Longo V. G.: J. Pharmacol. Exper. Therap. 132, 240 (1961).
17. Brooks V. B., Curtis D. R., Eccles J. C.: Nature 175, 120 (1955).
18. Bašagić E., Bošković B., Stern P.: Arch. int. Pharmacodyn 137, 49 (1962).
19. Stern P., Gašparović I.: First Internat. Pharmacol. Meeting 8, 149 (1961).
20. Holmstedt B., Lundgreen G., Sundwall A.: Life Sciences 10, 731 (1963).
21. Balotin N. M., Coon J. M.: Arch. int. Pharmacodyn, 123, 395 (1960).
22. Bošković B., Fuks Ž., Stern P.: Naučno društvo NRBIH, Radovi, knjiga XVII, 83 (1963).
23. Eicholtz F., Feuerstein D.: Arch. int. Pharmacodyn 139, 423 (1962).
24. Perry W. L. M.: Brit. Med. Bul. 13, 220 (1957).
25. Birks R.: Cand. J. Biochem. 39, 787 (1961).
26. Režek A.: Privatno saopštenje.
27. Schaumann W.: Brit. J. Pharmacol. 15, 432 (1960).
28. Feldberg W.: Arch. Exper. Pharmacol. 212, 64 (1950).
29. Smith R. D., Bevan W.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 96, 382 (1957).
30. Pfeiffer C. C., Jeney E. H., Gallagher W., Smith R. P., Bevan W. Jr., Killam K. F., Killam E. K., Blackome W.: Science, 126, 10 (1957).
31. Stern P.: Naturwissenschaften 51, 90 (1964).
32. Carlsson A., Lindqvist M.: Acta Physiol. Scand. 54, 87 (1964).