

RADOVI
KNJIGA LVII

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA
Knjiga 19.

Urednik
SEID HUKOVIĆ,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine



SARAJEVO
1975.

PAVAO ŠTERN* i BOGDAN BOŠKOVIC

FARMAKOLOŠKA ANALIZA TREMORA IZAZVANOG ACETALDEHIDOM**

(Primljeno na sjednici Odjeljenja medicinskih nauka 14. I 1975. god.)

Nedavno su Ortiz i sar. pokazali da acetaldehid (A) izaziva grčeve i tremor kod miševa (Ortiz et al., 1973.). Već prije je opisao da disulfuran izaziva tremor i kod ljudi (Goodman i Gilman, 1970). Ortiz i sar. (1973) nisu ulazili u mehanizam postanka ovog tremora i konvulzija, pa smo smatrali interesantnim da mi to ispitamo.

Ortiz i sar. ispitivali su određene farmake u citiranom radu, ali ne na fenomen tremora, nego na konvulzije koje izaziva acetaldehid (Ortiz et al., 1973).

Na simpozijumu o eksperimentalnom tremoru 1971. god. dali smo diobu tipova eksperimentalnog tremora (Štern, 1972). Interesiralo nas je da li se tremor, izazvan pomoću A, može inhibirati supstancama koje su se već pokazale aktivne kod raznih vrsta tremora, npr. kod tremora parkinsonskog tipa ili tremora koji se javlja kod Wilsonove bolesti trovanje ciklopijum toksina (Wilson et al., 1968), verruculogena (Cole et al., 1972), DDT-a (Dale et al., 1967).

Ova analiza, prema našem mišljenju, ima specijalni značaj, jer se tremor javlja i kod kroničkih alkoholičara, a u terapiji sa disulfiramom povećava se acetaldehid u nervnom tkivu. Vrlo je vjerovatno da mnogi toksični simptomi samog etanola idu na račun povećanja acetaldehida.

METODA

Pokusi su rađeni na bijelim miševima, težine 20—25 g, oba spola, hranjeni su kolačićima »Kalinovica« (Institutski soj). A je davan u dozi od 200 mg/kg i. p. Supstance kojima smo pokušali utjecati na ovaj tre-

* Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu.

** Ovaj rad finansiran je iz sredstava Republičke zajednice za naučni rad BiH, grant.03/3—822—1/74.

mor davane su uglavnom i. p. u većini slučajeva 30' prije nego se aplicira A, ukoliko to na tabeli nije drukčije označeno. Kriterij za procjenu je bio: da li se tremor uopće razvija, da li je pojačan ili oslabljen. Svi su eksperimenti bili prosuđivani ad oculos od tri osobe koje nisu znale koja grupa je šta dobila. Ispitivane su supstance koje djeluju na Parkinsonovu bolest, Wilsonovu bolest, na tremor izazvan ciklopijum toksinom ili verruculogenom itd. Osim toga, ispitali smo i neke supstance koje utječu na metabolizam kateholamina, serotoninina, kao i takove koje utječu na količinu acetilholina u CNS. Isto tako ispitali smo cistein. Cistein je bilo potrebno ispitati jer se pozakalo da zaštićuje životinje od trovanja acetaldehidom (S p r i n c e et al., 1974). U pokusu je bila i supstanca AY, jedan inhibitor holinacetilaze (C a v a l l i t o et al., 1970).

Ispitali smo A i na aktivnost acetilholinesteraze u krvi i mozgu miša in vivo. U tim eksperimentima davali smo samo A 4 mg/kg i. p. da bi doza A u tkivu bila što manja, tj. što bliže koncentraciji koju nalazimo u krvi čovjeka iza uzimanja disulphirana. Osim toga, ispitali smo i dozu od 200 mg/kg i. p., dakle onu sa kojom smo dobivali tremor. Acetilholinesterazu određivali smo metodom S t e v a n o v i ć a (1962).

TABELA

Supstanca	Doza mg/kg (30' prije acetaldehida)	Efekt	Vrijeme aplikacije
Atropin sulfat	10,0 i. p.	oslabljuje	
Atropin sulfat	20,0 i. p.	potpuno uklanja	
Etilbenztropin	1,0 i. p.	oslabljuje	
AY	20,0 i. v.	uklanja	
Metil atropin nitrat	25,0 i. p.	bez efekta	
Penicilamin	25,0 i. p.	pojačava	
alfa-metil DOPA	100,0 i. p.	pojačava	4 h
L-DOPA	100,0 i. p.	bez efekta	4 h
Oksotremorin	0,06 i. v.	pojačava	
Morfin sulfat	10,0 i. p.	pojačava	
Nalorfin bromid	100,0 i. p.	bez efekta	
Glicin	100,0 i. p.	oslabljuje	
Amino-oksiocetna kiselina	20,0 i. v.	oslabljuje	4 h
Mephenezin	50,0 i. p.	bez efekta	
Mephenezin	100,0 i. p.	oslabljuje	
Cistein	25,0 i. p.	pojačava	
Propranolol	20,0 i. p.	pojačava	
Dibenamin HCl	100,0 i. p.	pojačava	
BOL-148	2,5 i. p.	potpuno uklanja	
BOL-148	5,0 i. p.	potpuno uklanja	
LSD	1,0 i. p.	pojačava	
5-hydroxytryptohan	100,0 i. p.	pojačava	
Hloramfetamin	10,0 i. p.	pojačava	4 h
Pirogalol	10,0 i. p.	pojačava	
Etanol	2000,0 i. p.	uklanja	15'

REZULTATI

U prvom redu smo opazili da je tremor koji nastaje iza A intencioni, a ne statički. To ističemo zato, jer Ortiz i sar. (1973) ništa o tome ne govore. Međutim, ono što nas iznenađuje je činjenica da mi nikada nismo opazili u dozi od 200 mg/kg A konvulzije, kako to opisuju Ortiz i sar. (1973).

Kako se vidi iz priložene tabele, atropin i etilbenztropin koji centralno uklanjaju djelovanje acetilholina, dovode do uklanjanja tremora, dok metilatropin, koji ne prodire kroz hemoencefalnu barijeru, nema efekta. Potpuno je uklonio tremor i jedan inhibitor holinacetilaze AY (trans-1-(2-hydroxyethyl-4-(1-naphthylvinyl) pyridinium bromide) (Cavallito et al., 1970). Penicilamin (Scheinberg i Sternlieb, 1960) i alfametolidopa (Stern i Zec, 1963), koji su se pokazali efikasni kod terapije intencionog tremora Wilsonovog tipa, čak pojačavaju acetaldehidski tremor, dok L-DOPA nema efekta. Ovaj tremor pojačavaju i oxotremorin (Holmstedt i Landgreen, 1966) i morfijum (Garmann i Pepeu, 1962), za koje se zna da povećavaju količinu acetilholina u CNS, dok je antagonist morfijuma nalorfin bez efekta. Glicin i amino-oksioctena kiselina, koja pojačava GABA-u u CNS (Popov i Matthies, 1969), djeluju oslabljujuće na acetaldehidski tremor, a oba faktora, kako znamo, djeluju inhibitorno na alfa motorne stanice u prednjem rogu (Curtis i Watkins, 1965). Treba naglasiti da glicin sprječava tremor izazvan ciklopijum toksinom (Stern, 1971), a amino oksioctena kiselina uklanja tremor izazvan sa verruculogenom (Hotujac i Stern, 1974). Mephenezin u većoj dozi oslabljuje A-tremor a povećava količinu glicina (Stern et al. u pripremi za štampu). Propranolol, blokator beta receptora i dibenamin, i blokator alfa receptora pojačavaju A-tremor, ali tako djeluje i pirogalol koji sprječava razaranje noradrenalina i adrenalina (Croust, 1961). Centralni antagonist serotonin, BOL-148 uklanja A-tremor, dok LSD, koji također djeluje centralno, sam izaziva tremor i pojačava acetaldehidski tremor. A-tremor jako pojačava 5-hidroxitriptophan. Tako djeluje i hloramfetamin, koji snizuje količinu serotonin u CNS (Fuller et al., 1965). Cistein, kojega smo dali zato jer je u literaturi opisano da djeluje antagonistički na toksične doze acetaldehida (Sprince et al., 1974.), u našem je pokusu pojačavao tremor. Eksperimenti sa acetilholinesterazom su pokazali da A ni u dozi od 4 ili 200 ml/kg ne inhibira ovaj ferment ni u mozgu ni u krvi miša. Interesantno je da je etanol uklonio A-tremor.

DISKUSIJA

Kako vidimo iz naših rezultata, A-tremor, iako klinički imponira kao intencioni tremor, da se ukloniti sa antiholinergicima koji djeluju centralno, dok je metilatropin bez efekta. Mi smo, također, pokazali da acetaldehid ne inhibira holinesterazu, tako da ovaj efekt ne bi mogao ići na račun povećanja acetilholina uslijed inhibicije holinesteraze. Budući da je AY, jedan inhibitor holinacetilaze, uklonio tremor, mislimo da je vrlo vjerovatno da A-tremor ide na račun povećanja acetilholina

u CNS. A povećava količinu noradrenalina i dopamina u CNS (Svensson i Waldeck, 1973). Povećanje dopamina moralo bi, prema svim očekivanjima, odnosno prema onome što znamo o ulozi dopamina u postanku parkinson-like tremora, smanjiti tremor (Hornykiewicz, 1966). Međutim, vidimo da ovdje nije tako. Stvar se komplicira izvanredno i time što A povećava i noradrenalin i adrenalin u CNS (Svensson i Waldeck, 1965) a i sam djeluje slično adrenalinu (Nelson, 1943). Ima opažanja u literaturi da oni sami mogu biti uzrok jednog tremora (Agarwal i Bose, 1967) i da se taj tremor može ukloniti pomoću adrenergičnih beta blokera (Owen i Marsden, 1965). Međutim, kako vidimo u našem slučaju, propranolol je čak pojačao tremor. U ovom radu smo, takođe, pokazali da BOL, antagonist serotonina, spriječava A-tremor, a da ga 5-hydroxytryptophan pojačava. Poznato je već iz literature da povećanje serotonina uzrokuje tremor, doduše statički (Bogdanski et al., 1957.). Osim toga, A povećava serotonin u CNS (Jofre de Breyer i Soehring, 1968; Jofre de Breyer et al., 1972). Prema tome, izgleda da u postanku ovog tremora, uzrokovanog sa A, pored povećanja acetilhiclina, određenu ulogu igra i povećanje serotonina. Što LSD nije imao nikakvog efekta, ne treba da iznenadi, jer LSD sam po sebi izaziva jedan tremor statičkog tipa (Ahmed i Taylor, 1959). S druge strane iznenađuje da parahloramphetamin koji snažno snizuje serotonin u mozgu (Fuller, 1965) pojačava A-tremor. Možda je to uzrokovano momentanom mobilizacijom serotonina.

U svakom slučaju vidimo da je A-tremor jedan vrlo komplicirani centralni proces jer ne ovisi samo o jednoj komponenti. Za sada znamo barem za dva faktora povećanje acetilholina i serotonina. Obadvije ove komponente inače izazivaju tremor statičkog tipa, pa nam nije jasno zašto se ovdje javlja klinički kao intencioni. Interesantno je da je uklanjanje samo jedne komponente odgovorne za tremor, tj. acetilholina ili serotonina, dovoljno da tremor nestane. Možda se na taj način može tumačiti da povećanje dopamina koje izaziva A nije spriječilo postanak tremora iza davanja BOL i ako acetiholin ostaje povišen. Dok bi povećanje dopamina moralo inhibirati djelovanje acetilholina (Hornykiewicz, 1966) da se ne razvije tremor, ostaje ona druga komponenta odgovorna za tremor, tj. serotonin. Problem se komplicira i time što smanjenje serotonina u CNS, npr. reserpinom, potencira holinomietske procese u CNS (Janowsky, et. al., 1972). Prema tom nalazu, antagonista serotonina BOL morao bi čak pojačati holinomimetsku komponentu, odnosno tremor koji se razvija na račun acetilholina. Međutim, to se nije dogodilo. Interesantno je ponovno upozoriti da hloramphetamin koji također snizuje serotonin, kao i reserpin, stvarno pojačava acetaldehidski tremor.

Sve su to problemi koje treba dalje analizirati. Za nas se postavlja osnovno pitanje: da li će antagonisti serotonina ili parasimpatikolitika smanjiti tremor koji se javlja kod kroničkih alkoholičara ili će ublažiti neugodne simptome do kojih dolazi uslijed uzimanja acetaldehida kod terapije kroničkog alkoholizma.

PHARMACOLOGICAL ANALYSIS OF TREMOR CAUSED BY ACETALDEHYDE

SUMMARY

Acetaldehyde causes intentional tremor in mice. Pharmacological analysis has shown that this tremor can be abolished by the application of anticholinergic or antiserotonergic drugs. It is known that acetaldehyde increases the levels of 5-HT and noradrenaline in the brain. Noradrenalin can be responsible for the origin of some kinds of tremor, but our analysis has shown it does not alter the tremor caused by acetaldehyde. It is known whether acetylcholine is increased after acetaldehyde application or not. In our analysis it is shown that this component is of importance for the genesis of this kind of tremor since one inhibitor of cholinacetylase can remove acetaldehyde induced tremor.

The question is can parasympatholytics and antiserotonergic drugs be of therapeutic value in tremor which is present in chronic alcoholism. We do not know whether this antagonists of acetaldehyde induced tremor can be of some value in therapy of toxic symptoms that are present during application of acetaldehyde in the therapy of chronic alcoholism.

LITERATURA

1. Agarwal, S. L. and Bose, D.: A study of the role of brain catecholamines in drug induced tremor. *Br. J. Pharmac. Chemother.* **30**, 349—353 (1967).
2. Ahmed, A., Taylor, N. R. W.: The analysis of drug-induced tremor in mice. *Br. J. Pharmacol.* **14**, 350—354 (1959).
3. Bogdanski, D. F., Weissbach, H., Udenfriend, S.: Pharmacological studies with the serotonin precursor, 5-hydroxytryptophan. *J. Pharmacol.* **122**, 182—194 (1957).
4. Cavallito, C. J., Yun, H. S., Kaplan, T., Crispin Smith, J. and Foldes, F. F.: Choline acetyltransferase inhibitors. Dimensional and substituent effects among styrylpyridine analogs. *J. Med. Chem.* **13**, 221 (1970).
5. Cole, R. J., Kirskey, J. W., Moore, J. H., Blankenship, B. R., Diener, U. L. and Davis, N. D.: Tremorogenic toxin from *Penicillium verruculosum*. *Appl. Microbiol.* **24**, 248—250 (1972).
6. Crout, J. R.: Inhibition of catechol-O-methyltransferase by pyrogallol in the rat. *Biochem. Pharmacol.* **6**, 47—54 (1961).
7. Curtis, D. R. and Watkins, J. C.: The pharmacology of amino acids related to gamma-aminobutyric acid. *Pharmacol. Rev.* **17**, 347—391, (1965).
8. Dale, E. W., Gaines, T. B., Hayes, W. J.: Poisoning by DDT: Relation between clinical signs and concentration in rat brain. *Science* **142**, 1474 (1967).
9. Fuller, W. R., Hines, C. W., Mills, J.: Lowering of brain serotonin level by chloramphetamines. *Biochem. Pharmacol.* **14**, 483—488 (1965).

10. Giarman, N. J. and Pepeu, G.: Drug-induced changes in brain acetylcholine. *Brit. J. Pharmacol.* **19**, 226—234 (1962).
11. Goodman, L. S., Gilman, A.: The pharmacological basis of therapeutics. IV. Edit. MacMillan, London, Toronto, 1970.
12. Holmstedt, B., Lundreen, G.: Tremorogenic agents and brain acetylcholine. In »Mechanisms of release of biogenic amines« Pergamon Press, Oxford, 439—468 (1966).
13. Hotujac, Lj., Stern, P.: Pharmacological examination of verrucologen induced tremor. *Acta Medica Yugoslavica* **28**, 223—229 (1974).
14. Hornykiewicz, O.: Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* **18**, 925—964 (1966).
15. Janowsky, D. S., Davis, J. M., Khaled El-Yousef, M., Sekerke, H. J.: A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression *Lancet*, **2**, 632—635 (1972).
16. Jofre de Breyer, I. J., Acevedo, C., Torrelío, M.: Influence of ethanol on the effects of DL-p-chlorophenylalanine on biogenic amines of rat brain. *Arzneim. Forsch.* **22**, 2140—2142 (1972).
17. Jofre de Breyer, I. J., Soehring, K.: Wirkung von Äthanol und Acetaldehyd auf den Serotonin-Stoffwechsel in Leberschnitten. *Arch. Pharmak. exp. Path.* **260**, 148 (1968).
18. Nelson, E. E.: Presor respons to acetaldehyde and its potentiation by cocaine. *Proc. Soc. exper. Biol. Med.* **52**, 23—24 (1943).
19. Ortiz, A., Littleton, J. M., Griffiths, P. J.: A simple screening test for drugs of potential use in ethanol withdrawal. *J. Pharm. Pharmacol.* **25**, 1020—1021 (1973).
20. Owen, D. A. L., Marsden, C. D.: Effect of adrenergic β -blockade on Parkinsonian tremor. *Lancet* **2**, 1259—1262 (1965).
21. Popov, N., Matthies, H.: Some effects of monoamino-oxidase inhibitors on the metabolism of gamma-aminobutyric acid in rat brain.
22. Scheinberg, I. H., Sternlieb, L.: In »Metalbinding in medicine« ed. J. B. Lippincot Co, Philadelphia, 1960.
23. Sprince, H., Parker, C. M., Smith, G. G. and Gonzales, L. J.: Protection against acetyleddehyde toxicity in the rat by L-cysteine, thiamin and L-methylthiazolidine-4- carboxylic acid. *Agents and actions*, **4**, 125—130 (1974).
24. Stern, P.: Pharmacological analysis of the tremor induced by cyclopium toxin. *Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta* **7**, 187—196 (1971).
25. Stern, P.: Methods for causing diseases of the extrapyramidal sysetm. Posebna izdanja XVII, Akad. nauka i umjetnosti BiH, Odjeljenje Med. nauka, knj. 4, 35—36 (1972).
26. Stern, P., Zec, N.: Die Behandlung der Krankheiten die von Intentionstremor-Symptomen begleitet sind. *Wien. Klin. Wschr.* **75**, 213 (1963).
27. Stern, P., Čatović, S., Filipović, N.: (u pripremi za štampu).
28. Stevanović, M.: Prilog određivanju holinesteraze u celokupnoj krvi eritrocitima, plazmi i homogenatu mozga miševa. *Arh. Farm.* **5**, 327—330 (1962).
29. Svensson, T. H., Waldeck, B.: Significance of acetaldehyde in ethanol-induced effects on catecholamine metabolism and motor activity in the mouse. *Psychopharmacologia (Berl.)* **31**, 229—238 (1973).
30. Wilson, R. J., Wilson, Ch. H., Hayes, A. S.: Tremorogenic toxin from penicillium cyclopium grown of food materials. *Nature* **220**, 77—78 (1968).