

Beata Sobocińska-Rodzoń*

Antycholinergiczne efekty działania alkaloidów tropanowych

Streszczenie

Praca dotyczy zmian aktywności acetylocholinesterazy (AChE) w wyniku jednorazowej dawki siarczanu atropiny oraz skopolaminy. Uzyskane wyniki dowodzą, iż podawane związki obniżają aktywność AChE po 1 i 2 godzinach od czasu iniekcji, zaś w 3 godzinie obserwuje się tendencje wzrostowe poziomu enzymu.

Jednocześnie stwierdzono, że samice są bardziej reaktywne od samców myszy.

Wykazano także silniejsze działanie antycholinergiczne skopolaminy w stosunku do siarczanu atropiny.

Wstęp

Alkaloidy tropanowe stanowią bardzo ważną grupę związków stosowanych jako leki parasympatykolytyczne. Substancje te wyodrębniono z pokrzyku wilczej jagody (*Atropa belladonna*), bielunia dziędzierzawy (*Datura stramonium*), lulka czarnego (*Hyoscyamus niger*) oraz z innych roślin z rodziny piankowatych (*Solanaceae*).

Z toksykologicznego punktu widzenia największe znaczenie spośród nich przypisuje się atropinie i skopolaminie. Są to związki pora-

*Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie

zające układ przywspółczulny, a więc skutki przez nie wywoływane są podobne do objawów pobudzenia układu współczulnego (Prandota i wsp. 1982). Efektem zatrucia tymi związkami jest wystąpienie zespołu antycholinergicznego, charakteryzującego się licznymi objawami centralnymi (śpiączka, delirium, depresja oddechowa, stupor, wstrząs, drgawki, zaburzenia pamięci, dodatni objaw Babińskiego) i obwodowymi (rozszerzenie źrenic, przyspieszenie zatokowe akcji serca lub inne zaburzenia rytmu z nadpobudliwości, zatrzymanie moczu, atonia jelit, hipertermia, suchość błon śluzowych, zaczerwienienie i suchość skóry), przy czym objawy kliniczne zatrucia są uzależnione od wielkości przyjętej dawki (Deichmann i wsp. 1964, Polson i wsp. 1969, Krzymiński 1980). Powyższe reakcje są skutkiem obniżenia poziomu acetylocholiny (ACh) i/lub braku wrażliwości na ten neuromediator, na drodze kompetycyjnej blokady muskarynowego receptora cholinergicznego w poszczególnych narządach (Urbański 1988, Podlewski, Chwalibogowska-Podlewska 1990).

Mechanizm tej blokady polega na reakcji substancji cholinolitycznych z receptorem M, który staje się niewrażliwy na działanie acetylocholiny. Pod względem farmakologicznym substancje te są antagonistami acetylocholiny. Konkurencja ich odnosi się jednak jedynie do receptorów M pozazwojowych zakończeń parasympatycznych, natomiast nie dotyczy zwojów wegetatywnych (receptor N), ani płytek motorycznych (receptor N).

W przypadku pobudzenia ACh jest nadal uwalniana w zakończeniach pozazwojowych, natomiast traci swoją funkcję neuromediatora między układem parasympatycznym a narządami (Daunderer 1980, Endres i wsp. 1989).

Zarówno atropina, jak i skopolamina tłumiąc aktywność muskarynowych receptorów cholinergicznym nie wywierają bezpośredniego wpływu ani na syntezę, ani na metabolizm acetylocholiny (Kubikowski i wsp. 1979). Znane są jednak prace (Watanabe i Shimizu 1989) wskazujące na wzrost aktywności tego neuromediatora wywołany podaniem alkaloidów tropanowych.

W świetle powyższych faktów celowe wydaje się prześledzenie wpływu siarczanu atropiny i skopolaminy na zmiany aktywności acetylocholinesterazy, enzymu odpowiedzialnego za hydrolizę ACh.

Materiał i metodyka

Do badań użyto 70 samic i 70 samców myszy białej (*Mus musculus L.*) szczepu Swiss, pochodzących z chowu wsobnego, o średniej wadze 28 g hodowanych w jednakowych warunkach pod względem oświetlenia LD 12:12 i żywionych pokarmem standardowym.

Zwierzęta obu płci podzielono na dwie zasadnicze grupy eksperymentalne. Pierwszej z nich podawano domięśniowo siarczan atropiny w dawce 5 mg/kg wagi ciała, drugiej – skopolaminę w analogicznej dawce. Wszystkie iniekcje odbywały się o stałej porze, tj. o godz. 12.00, w okresie minimalnej aktywności motorycznej myszy.

Zwierzęta zabijano przez dekapitację po 1,2 i 3h od momentu iniekcji, a następnie preparowano: mózg, mięsień udowy (*musculus gracilis*), wątrobę i nerki. Wypreparowane narządy przepłukiwano w roztworze soli fizjologicznej, po czym odważano po 100 mg mięśnia, wątroby i nerek oraz ustalano wagę całego mózgu. Tkanki umieszczano w 3 ml zimnego buforu fosforanowego o pH 8, a następnie poddawano homogenizowaniu w homogenizatorze teflonowym przez okres od 1–2,5 min w zależności od rodzaju tkanki. Z kolei do homogenatów mięśnia, wątroby i nerek dodawano po 2 ml schłodzonego buforu fosforanowego o pH 8, natomiast w przypadku mózgu rozcieńczano homogenat do tego stopnia, aby uzyskać proporcję 100 mg tkanki na 5 ml buforu. Otrzymane homogenaty wirowano przez 15 min przy prędkości 14.000 obr./min. Po odwirowaniu oznaczano w supernatantach aktywność acetylocholinesterazy kolorymetryczną metodą Ellmana i wsp. (1961).

Substratem był jodek acetylotiocholiny. Powstająca w wyniku jego hydrolizy tiocholina, reagując z dodanym do homogenatu DTNB (5,5-ditiobis-2-nitro-benzoesanem) dawała żółte zabarwienie, którego intensywność była wprost proporcjonalna do ilości rozłożonej przez enzym acetylotiocholiny, a tym samym do aktywności enzymu zawartego w homogenacie.

Pomiaru ekstynkcji dokonywano w czasie 1 min, przy długości fali wynoszącej 412 nm, po czym obliczano szybkość hydrolizy substratu, korzystając ze wzoru:

$$R = \frac{\Delta A}{1,36 \times 10^{-4}} \times \frac{1}{(400/3120)C_0} = 5 \times 74 \times 10^{-4} \frac{\Delta A}{C_0}$$

gdzie: R – szybkość hydrolizy substratu w mol/min/gram tkanki
 ΔA – zmiany ekstynkcji/min
 C_0 – pierwotne stężenie tkanki (mg/ml)

Uzyskane wyniki przeliczono na $\mu\text{mol/min/g}$, a następnie opracowano statystycznie, obliczając średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe. Do analizy wyników zastosowano test „t” Studenta-Gosseta, przyjmując różnicę za statystycznie istotną, jeżeli prawdopodobieństwo jej zaistnienia było mniejsze lub równe 0,01.

Wyniki

Dane liczbowe dotyczące wpływu jednorazowego podania siarczanu atropiny i skopolaminy na zmiany aktywności acetylocholinesterazy w mózgu, mięśniu udowym, wątrobie i nerkach myszy zestawiono w tabelach 1,2 oraz zilustrowano graficznie (ryc. 1–4).

Otrzymane wyniki pozwalają na stwierdzenie, iż jednorazowa dawka obu alkaloidów wpływa generalnie na obniżenie aktywności AChE, niezależnie od płci myszy oraz charakteru badanego narządu. Nie dotyczy to jedynie wątroby zwierząt obu płci poddanych działaniu siarczanu atropiny, gdzie zaobserwowano tendencję wzrostową aktywności enzymu.

W zależności od czasu działania alkaloidów wystąpiły statystycznie istotne różnice w stopniu aktywności AChE w poszczególnych grupach doświadczalnych, przy czym najwyraźniej zaznaczyły się one po 2h od czasu iniekcji, zwłaszcza w efekcie podania skopolaminy. Po 3h od momentu podania alkaloidów zanotowano tendencję wzrostową aktywności enzymu, dążącą do osiągnięcia stanu kontrolnego.

Jednocześnie stwierdzono różnice w poziomie aktywności enzymu u zwierząt obu płci pomiędzy poszczególnymi narządami.

Wykazano ponadto, iż narządem o największej aktywności AChE jest wątroba, najniższą zaś wartość enzymu zanotowano w nerkach.

Tab. 1. Zmiany aktywności AChE w wybranych narządach myszy pod wpływem podania siarczanu atropiny w dawce 5 mg/kg po 1, 2 i 3 godzinach od iniekcji

Grupy badawcze	Płeć	Mózg			Mięsień			Wątroba			Nerki		
		Średnia aktyw. AChE	Odchylenie standardowe	Test Studenta	Średnia aktyw. AChE	Odchylenie standardowe	Test Studenta	Średnia aktyw. AChE	Odchylenie standardowe	Test Studenta	Średnia aktyw. AChE	Odchylenie standardowe	Test Studenta
Kontrola	♀	10,171	1,074	-	11,599	0,881	-	13,467	0,388	-	7,232	0,505	-
	♂	9,620	0,418	-	4,995	0,231	-	16,095	0,418	-	3,848	0,407	-
1 h	♀	6,697	0,707	8,544*	4,439	0,380	23,598*	23,383	4,283	7,291*	6,548	0,234	3,886*
	♂	3,404	0,265	39,721*	5,217	0,146	2,571	19,343	1,101	8,718*	3,534	0,162	2,270
2 h	♀	5,565	0,533	12,150*	4,088	0,253	25,908*	20,127	1,900	14,707*	3,624	0,293	19,539*
	♂	10,175	0,400	3,034*	5,069	0,278	0,647	28,953	0,688	50,495*	3,256	0,217	4,057*
3 h	♀	7,325	0,328	8,017*	5,178	0,212	22,405*	14,688	0,776	4,449*	8,416	0,219	6,805*
	♂	11,711	0,800	7,326*	4,644	0,105	4,385*	17,501	0,382	7,848*	2,831	0,176	7,257*

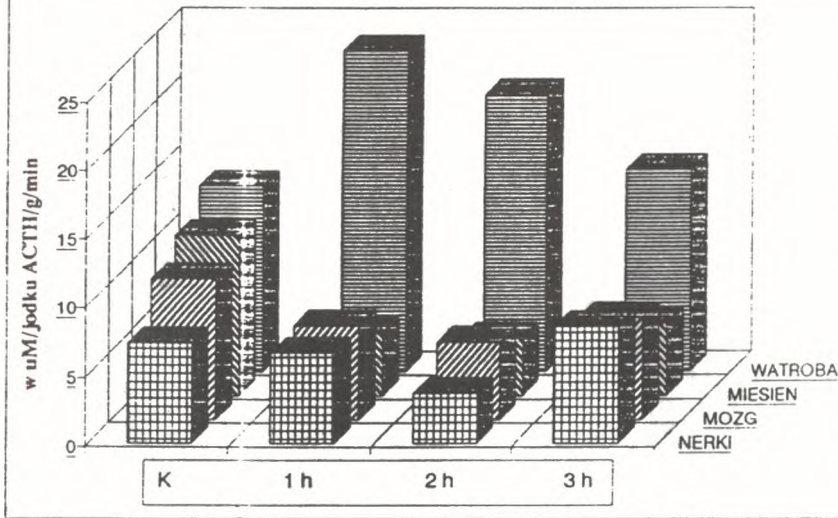
*statystycznie istotne przy $p \leq 0,01$

Tab. 2. Zmiany aktywności AChE w wybranych narządach myszy pod wpływem podania skopolaminy w dawce 5 mg/kg po 1, 2 i 3 godzinach od iniekcji

Grupy badawcze	Płeć	Mózg			Mieśnię			Wątroba			Nerki		
		Średnia aktyw. AChE	Odcylenie standardowe	Test Studenta	Średnia aktyw. AChE	Odcylenie standardowe	Test Studenta	Średnia aktyw. AChE	Odcylenie standardowe	Test Studenta	Średnia aktyw. AChE	Odcylenie standardowe	Test Studenta
Kon-trola	♀	10,171	1,074	-	11,599	0,881	-	13,467	0,388	-	7,232	0,505	-
	♂	9,620	0,418	-	4,995	0,231	-	16,095	0,418	-	3,848	0,407	-
1 h	♀	6,234	0,537	10,371*	7,526	0,400	13,311*	13,355	1,030	0,322	7,122	1,181	0,271
	♂	7,354	1,091	6,071*	4,292	0,893	2,411	10,453	0,824	19,311*	5,587	0,794	6,166
2 h	♀	5,383	0,722	11,701*	2,516	0,455	28,965*	13,264	0,730	0,777	4,255	0,585	12,183*
	♂	6,529	0,974	9,219*	2,456	0,350	19,191*	6,88	0,722	34,922*	3,532	0,266	2,055
3 h	♀	5,846	0,715	10,602*	3,977	0,235	26,429*	16,334	0,800	13,763*	5,327	0,698	6,995*
	♂	9,248	0,508	1,788	2,829	0,195	22,653*	7,695	1,150	21,706*	3,994	0,382	0,827

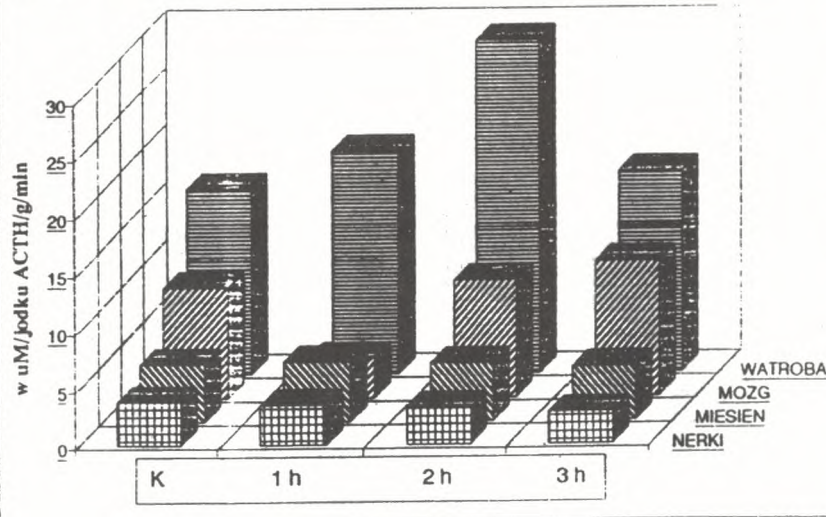
*statystycznie istotnie przy $p \leq 0,01$

AKTYWNOŚĆ AChE W TKANKACH SAMIC MYSZY W WYNIKU PODAŻY SIARCZANU ATROPINY



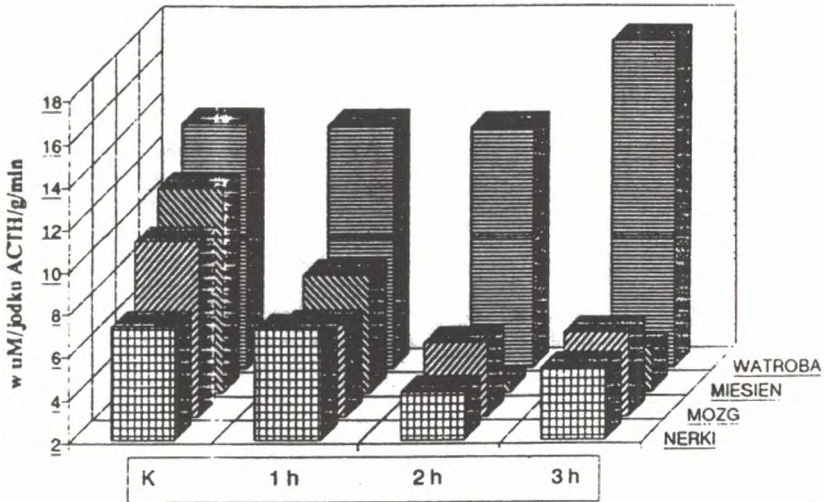
Ryc. 1. Zmiany aktywności acetylocholinesterazy w wybranych tkankach samic myszy w efekcie jednorazowego podania siarczanu atropiny w dawce 5 mg/kg

AKTYWNOŚĆ AChE W TKANKACH SAMCÓW MYSZY W WYNIKU PODAŻY SIARCZANU ATROPINY



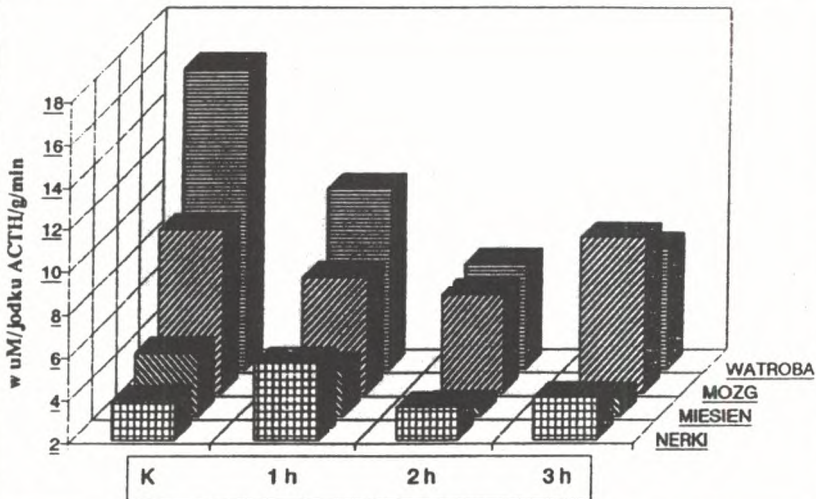
Ryc. 2. Zmiany aktywności acetylocholinesterazy w wybranych tkankach samców myszy w efekcie jednorazowego podania siarczanu atropiny w dawce 5 mg/kg

AKTYWNOŚĆ AChE W TKANKACH SAMIC MYSZY W WYNIKU PODAZY SKOPOLAMINY



Ryc. 3. Zmiany aktywności acetylocholinesterazy w wybranych tkankach samic myszy w efekcie jednorazowego podania skopolaminy w dawce 5 mg/kg

AKTYWNOŚĆ AChE W TKANKACH SAMCÓW MYSZY W WYNIKU PODAZY SKOPOLAMINY



Ryc. 4. Zmiany aktywności acetylocholinesterazy w wybranych tkankach samców myszy w efekcie jednorazowego podania skopolaminy w dawce 5 mg/kg

Dyskusja

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono istotne obniżenie poziomu aktywności acetylocholinesterazy, najwyraźniej zaznaczające się we wszystkich narządach zwierząt obu płci po 2 godz. oddziaływania skopolaminy, co znajduje potwierdzenie w pracy Watanabe i Shimizu (1989), gdzie analogiczna dawka alkaloidu wywoływała w tym czasie wyraźny wzrost poziomu acetylocholininy w mózgu szczurów. Bowiernie wysokie stężenie neuromediatora powoduje hamowanie aktywności rozkładającego go enzymu, co należy tłumaczyć budową cząsteczki acetylocholinesterazy. W takich warunkach istnieje duże prawdopodobieństwo, że podcentrum anionowe połączy się z jedną cząsteczką substratu, podcentrum zaś estrowe – z drugą, efektem czego żadna z nich nie ulegnie hydrolizie (Niemierko 1965).

Podobnie spadki aktywności AChE zanotowano w narządach samic myszy po podaniu siarczanu atropiny. Wyjątek stanowi tutaj wątroba, w której zaobserwowano przejściowy wzrost aktywności enzymu, będący prawdopodobnie konsekwencją wzmożonych przemian metabolicznych, wynikających z bezpośredniego względnie pośredniego toksycznego działania ogólnoustrojowego siarczanu atropiny. Zaburzenia te tłumaczyć można również występowaniem u samic cyklu estralnego, gdyż mechanizmy cholinergiczne stanowią swoisty implikator w regulacji sekrecji hormonów przedniego płata przysadki. Wykazano, iż niepośrednią rolę w tych zjawiskach odgrywa atropina (Smallridge i wsp. 1991).

Nieco odmiennie przedstawia się obniżenie poziomu AChE u samców myszy, gdzie we wszystkich narządach oprócz mózgu, obserwowano je dopiero po upływie 3 h od momentu iniekcji. Przypuszczalnie ma to swoje podłoże w odmiennym stopniu reaktywności zwierząt obu płci.

Interesujący wydaje się również spadek aktywności enzymu w mózgu, zanotowany już po 1 godz. działania alkaloidu, który koreluje ze wzrostem aktywności ACh (Watanabe i Shimizu 1989). Spadek aktywności AChE wiąże się prawdopodobnie z hamowaniem czynności bioelektrycznej ośrodkowego układu nerwowego, warunkowanym zmniejszeniem szybkości syntezy ACh (Gadamski 1979).

Istniejące różnice zmian aktywności acetylocholinesterazy w wyniku działania siarczanu atropiny i skopolaminy wynikają z odmiennych mechanizmów ich funkcjonowania. Jak wiadomo, oba alkaloidy blokują transmisję impulsów nerwowych układu parasympatycznego do komórek efektorowych, znoszą więc objawy muskarynopodobne (Ramisz i wsp. 1976, Herman i wsp. 1981, Mc Bride i wsp. 1991). Atropina jest przy tym blokerem zarówno dla postsynaptycznego receptora M_1 , jak i presynaptycznego receptora M_2 . Natomiast skopolamina stanowi swoisty farmakologiczny bloker tylko dla autoreceptora M_2 , zwiększając wydzielanie ACh prowadzące do przerwania ujemnego presynaptycznego sprzężenia zwrotnego (Traczyk i wsp. 1989), stąd wywoływane przez nią efekty nie dorównują działaniu atropiny. Równocześnie receptory muskarynowe, będące receptorami metabotropowymi sterują syntezą różnych wtórnych przekaźników, mianowicie cholinergiczny receptor M_1 – pobudza syntezę fosfatydyloinozytoli, a M_2 – hamuje aktywność cyklazy adenylowej (Vetulani 1989).

W wyniku działania alkaloidów tropanowych zostaje naruszona równowaga na osi ACh-AChE, co niekorzystnie wpływa na enzymy błonowe, m.in. na ATP-azę i transport jonów potasu (Giermaziak 1976). Prowadzi to do zmiany przepuszczalności błony postsynaptycznej dla jonów Na^+ , w efekcie konformacyjnego otwarcia kanałów sodowych (Breer i Knipper 1984). Jednocześnie wiadomo, iż kanał sodowy receptora muskarynowego jest regulowany przez aktywację kanału Ca^{++} i cyklazy guanilowej (Ehlert 1985). Badania Hong i Chang (1989) wykazały zaś, że atropina zaburza aktywację receptorów ACh i kanałów wapniowych. Dowodzi to antycholinergicznego działania alkaloidów tropanowych.

Z przeprowadzonych rozważań wynika, iż alkaloidy tropanowe wykazują zróżnicowane działanie antycholinergiczne, przy czym silniej zaznacza się ono w efekcie podania skopolaminy, niż siarczanu atropiny. Jest to działanie krótkotrwałe i odwracalne, przejawiające się we wszystkich tkankach organizmu, różniących się między sobą pod względem biochemicznym, strukturalnym i fizjologicznym.

Literatura

- Breer H., Knipper M., 1984, *Characterization of acetylcholine release from insect synaptosomes*. Insect Biochem., vol. 14, no 3, 337–344
- Daunderer M., 1980, *Physostigmine salicylate as an antidote*. International J. Clin. Pharmacol. Therapy Toxicol., 18, 12, 523
- Deichmann W.B., Gerarde H.W., 1964, *Symptomatology and therapy of toxicological emergencies*. New York, London
- Ehlert F.J., 1985, *The relationship between muscarinic receptor occupancy and adenylate cyclase inhibition in the rabbit myocardium*, Molec. Pharmacol. 28, 410–421
- Ellman G.L. Courtney K.D., Andres Jr. V., Featherstone R., 1961, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochem. Pharmacol., 7, 88–95
- Endres W., Spular A., Bruggencate G., 1989, *Acetylcholinesterase reactivators antagonize epileptiform bursting induced by paraoxon in guinea pig hippocampal slices*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 251(3), 1181–1186
- Gadamski R., 1979, *Wpływ niedotlenienia hipoksyjnego na aktywność AChE w mózgu szczura i chomika mongolskiego (Meriones unguiculatus)*, Neuropat. Pol., XVII, 2, 201–214
- Giermaziak H., 1976, *Ocena cytotoksycznego działania pestycydów fosforoalfatycznych na modelu zatrucia intrationem*. Med. Pracy, XXVII, 4, 253–257
- Herman Z.S., Słomińska-Żurek J., 1981, *Enhanced responses to muscarine in rats treated chronically with atropine*. Pol. J. Pharmacol. Pharm., 33, 481–484
- Hong S.J., Chang C.C., 1989, *Antagonism by tubocurarine and verapamil of the regenerative acetylcholine release from mouse motor nerve*, Eur. J. Pharmacol., 162(1), 11–17
- Krzywiński S., 1980, *Skopolamina w leczeniu cholinolitycznym*. Psychiatr. Pol. XLV, 6, 635–640
- Kubikowski P., Kostowski W., 1979, *Farmakologia. Podstawy farmakoterapii*, PZWL Warszawa, 63–67, 80–85
- Mc Bride R.K., Zwierzyński D.J., Stone K.K., Culp D.J., Marin M.G., 1991, *Variable effects of soman on macromolecular secretion by ferret trachea*, Fundam. Appl. Toxicol., 16(1), 24–30
- Niemierko S., 1965, *Występowanie i właściwości esterazy acetylocholinowej*. Post. Biochem., XL, 3, 247–265
- Podlewski J.K., Chwalibogowska-Podewska A., 1990, *Leki współczesnej terapii*, PZWL, Warszawa, 43–44
- Polson C.J., Tattersall R.N., 1969, *Clinical toxicology*. London
- Prandota J., Nienartowicz B., Nowicka J., 1982, *Dramatyczny przebieg zatrucia związkiem fosforoorganicznym u 4-letniego dziecka leczonego chlorkiem obidoksymu oraz siarczanem atropiny*. Ped. Pol., LVII, 11, 975–979

- Ramisz A., Szańkowska Z., Kulig D., 1976, *Wstępne badania przydatności preparatu Toksobidin „Polfa” w leczeniu zatruc związkami fosforoorganicznymi*. *Bromat. Chem. Toksykol.*, IX, 2, 149–156
- Smallridge R.C., Carr F.E., Fein H.G., 1991, *Diisopropylfluorophosphate (DFP) reduces serum prolactin, thyrotropin, luteinizing hormone, and growth hormone and increases adrenocorticotropin and corticosterone in rats: involvement of dopaminergic and somatostatinergic as well as cholinergic pathways*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108(2), 284–295
- Traczyk W.Z., Trzebski A., 1989, *Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej*. PZWL, Warszawa, 354
- Urbański R., 1988, *Ocena skuteczności leczniczej optymalnych dawek siarczanu atropiny, obidoksyumu i diazepanu w ostrym zatruciu somanem, sarinem i V_x*, *Lek. Wojsk.*, 7–8(IV), 488–490
- Vetulani J., 1989, *Receptory układów neurotransmisyjnych. Fizjologia i farmakologia błony komórkowej*, red. Przewłocka B., Inst. Farmakol. w Krakowie, Ossolineum
- Watanabe H., Shimizu H., 1989, *Effect of anticholinergic drugs on striatal acetylcholine release and motor activity in freely moving rats studied by brain microdialysis*. *J. Pharmacol.*, 31, Japan, 75–82

Beata Sobocińska-Rodzoń

Anticholinergic Activity Effects of Tropine Alkaloids

Summary

Activity changes of acetylcholinesterase (AChE) upon single introduction of atropine sulfate and scopolamine have been reported in this paper. The results have proved that the above compounds have reduced the AChE activity during 1 and 2 hours after the injection, whereas during 3 hours after the injection the increase of the enzyme level has been observed.

Simultaneously, it has been stated that females have been more reactive than males of the mouse.

It has been proved the stronger anticholinergic activity of scopolamine as compared with atropine sulfate.