

Maciej Syrek*

Wpływ L-glutaminianu sodu na aktywność acetylocholinesterazy w wybranych narządach myszy

S t r e s z c z e n i e

W pracy zostały przedstawione wyniki badań nad wpływem L-glutaminianu sodu na aktywność acetylocholinesterazy (AChE) w wybranych narządach myszy, tj. mózgu, wątrobie, śledzionie i mięśniu udowym. Stwierdzono zmianę aktywności enzymu we wszystkich narządach w pierwszej i drugiej grupie doświadczalnej w porównaniu z grupą kontrolną. Największe zmiany wystąpiły w aktywności enzymu w mózgu i wątrobie, natomiast śledziona i mięsień były mniej reaktywne. Wykazano też różnice w aktywności AChE u samców i u samic, z tym, że samce wykazywały większą wrażliwość na duże dawki L-glutaminianu sodu.

Wstęp

Z uwagi na udział w procesach przekąźnictwa synaptycznego dużym zainteresowaniem badaczy cieszy się od wielu lat acetylocholinesteraza (AChE). Po raz pierwszy surowy ekstrakt AChE został wyizolowany z końskiej surowicy przez Stedman, Stedman i Easson w 1932 roku. W 1937 Marnay i Nachmansohn pracujący na mięśniach

*Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie

żaby wykazali, że prawie cała pula AChE obecna w tkankach jest zlokalizowana w zakończeniach nerwów. Wykazano, że jej aktywność w poszczególnych częściach neuronu jest różna: intensywna aktywność w perikarionie i na zakończeniach nerwowych, natomiast znacznie słabsza w aksonie. AChE występuje w elementach pre- i postsynaptycznych układu cholinergicznego, w płytkach nerwowo-mięśniowych, w różnych obszarach mózgu (prążkowie, kora, twór siatkowaty), w osoczcu, erytrocytach, ścianach naczyń krwionośnych, gruczole ślinowym, nadnerczach (Silver 1974, Lehman i Fibiger 1979, Beauregard 1980, Davis i Koelle 1981, Carmichael 1984, Gordon i Finch 1984, Mastrolia i wsp. 1980).

Jest bardzo prawdopodobne, że rola AChE nie jest jedynie ograniczona do rozkładu acetylocholino przy transmisji nerwowo-mięśniowej. Zdaniem Nachmansohna (1963) AChE jest związana również z przewodnictwem nerwowym. Hokin i Hokin (1960) zwrócili uwagę na rolę enzymu w zjawiskach aktywnego transportu jonów Na^+ i dodatnio naładowanych cząsteczek organicznych poprzez cykl kwasu fosfatydowego. Ponieważ AChE jest markerem układu cholinergicznego i bierze udział przy rozkładzie acetylocholino (ACh), która jest mediatorem pobudzającym, wydaje się interesujące prześledzenie wpływu innego mediatora pobudzającego, jakim jest L-glutaminian sodu. Rola strukturalnych analogów kwasu glutaminowego staje się coraz większa w związku z wykryciem ich neurotoksycznych właściwości (Coyle J., Schwarcz R. 1976, Olney J.W., Rhee V. 1974, Takasaki V. 1978). Z licznych badań wynika, że pochodne kwasu glutaminowego, do których należy m.in. L-glutaminian sodu i kwas kainowy powodują selektywną degenerację neuronów w różnych obszarach mózgu. L-glutaminian sodu szczególnie uszkadza neurocyty jądra łukowatego podwzgórza. Po podaniu toksycznych dawek L-glutaminianu sodu 80% dopaminergicznych komórek jądra łukowatego ulega uszkodzeniu. Po podaniu szczurom (przez pierwsze 10 dni życia) występowały zaburzenia charakteryzujące się karłowatym wzrostem, otyłością, niedorozwojem gonad, niedoczynnością tarczycy i atrofią przysadki – zaburzenie cyklu estralnego, obniżony poziom tyroksyny i trójiodotyroniny w surowicy. Obniżenie koncentracji dopaminy i aktywności acetylotransferazy cholinowej w jądrze łukowatym i wyniosłości po-

środkowej przy nie zmienionej koncentracji serotoniny i noradrenaliny (Olney J.W. 1969, Nemeroff C.B. i wsp. 1977).

Celem niniejszych badań było uzyskanie odpowiedzi na następujące pytania:

1. Jak zmienia się aktywność enzymu w mózgu, wątrobie, śledzionie i mięśniu udowym po podaniu L-glutaminianu sodu?
2. Czy istnieją różnice w aktywności AChE u zwierząt obu płci?
3. Czy chroniczne podawanie L-glutaminianu sodu zmienia relacje w zakresie aktywności AChE w wybranych narządach myszy?

Materiał i metodyka badań

Do badań użyto 15 samic i 15 samców myszy białej o średniej wadze 27 g, hodowanych w jednakowych warunkach pod względem oświetlenia LD 12:12 i żywionych pokarmem standardowym.

L-glutaminian sodu rozpuszczony w 0.3 ml soli fizjologicznej podawano w dawce 6 mg/g wagi ciała. Chroniczne iniekcje wykonywano codziennie w dwóch grupach doświadczalnych 5- i 10-dniowych (po 5 osobników obu płci w każdej). Wszystkie iniekcje odbywały się o stałej porze, tj. o godzinie 10. W kolejnym dniu po zakończeniu iniekcji myszy zabijano przez dekapitację, a następnie preparowano: mózg, wątrobę, śledzionę i mięsień udowy. Wypreparowane narządy przepłukiwano w roztworze soli fizjologicznej (0,9% roztwór NaCl), po czym odważano po 120 mg wątroby, śledziony i mięśnia 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 2 min. Z kolei do homogenatów wątroby, śledziony i mięśnia dodawano 3 ml schłodzonego buforu fosforanowego o pH 8, natomiast w przypadku mózgu rozcieńczano homogenat do tego stopnia, aby uzyskać proporcję 120 mg tkanki na 6 ml buforu. Otrzymane homogenaty wirowano przez 15 minut z prędkością 15000 obr./min po odwirowaniu oznaczano w supernatantach aktywność acetylocholinesterazy (AChE) kolorymetryczną metodą Ellmana (1961).

Substratem był jodek acetylotiocholiny. Powstająca w wyniku jego hydrolizy tiocholina, reagując z dodanym do homogenatu DTNB (5,5-ditiobis-2-nitro-benzoowym) 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 minuty przy długości fali 412 nm, a następnie obliczano szybkość hydrolizy substratu korzystając ze wzoru

$$R = \frac{\Delta A}{1,36 \times 10^{-4}} \times \frac{1}{(400/300)C_0} = 5,74 \times 10^{-4} \frac{\Delta A}{C_0}$$

gdzie: R – szybkość hydrolizy substratu w mol/min/gram tkanki

ΔA – zmiany ekstynkcji/min

C_0 – pierwotne stężenie tkanki (mg/ml)

Uzyskane wyniki przeliczano na $\mu\text{mol}/\text{min}^{-1}/\text{g}^{-1}$, a następnie obliczano 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 0.05.

Wyniki

Wszystkie dane liczbowe zestawiono w tabelach 1, 2 i zilustrowano na rycinach 1, 2. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że L-glutaminian sodu w dawce 6 mg/g wagi ciała podany w 5- i 10-dniowych iniekcjach podskórnych powoduje zmiany aktywności AChE w badanych narządach, tj. mózgu, wątrobie, śledzionie i mięśniu. Największą aktywność enzymu w grupie kontrolnej wykazano w wątrobie, natomiast najniższą w mięśniu. Po iniekcjach nastąpił znaczny spadek aktywności AChE w wątrobie, a wzrost w mózgu w porównaniu z grupą kontrolną (tab. 1). W śledzionie zaobserwowano początkowy spadek, a następnie wzrost aktywności AChE. Mięsień był najmniej reaktywny, ale występowały tutaj różnice płciowe w aktywności enzymu (tab. 2). Stwierdzono także większą reaktywność samców.

Tab. 1. Zmiany aktywności AChE w mózgu, wątrobie, śledzionie i mięśni u samców myszy po podaniu L-glutaminianu sodu w dawce 6 mg/g przez okres pięciu i dziesięciu dni

Grupy badawcze	Badany narząd	Średnia akt. AChE	% śred. akt. AChE	Odchylenie standardowe	Średni błąd	„t”
Kontrolna	mózg	14,4648	100,000	0,2119	0,0947	–
	wątroba	23,1609	100,000	0,7027	0,3148	–
	śledziona	14,3787	100,000	0,1173	0,0525	–
	mięsień	11,3365	100,000	0,2720	0,1216	–
Doświadczalna 1	mózg	17,7366	122,619	0,3778	0,1689	16,8*
	wątroba	21,5537	93,060	0,2882	0,1289	4,7*
	śledziona	14,0056	97,405	0,5749	0,2571	1,4
	mięsień	11,6235	102,531	0,4110	0,1838	1,3
Doświadczalna 2	mózg	21,3300	147,461	0,2065	0,0923	51,8*
	wątroba	19,2485	83,107	0,7041	0,3149	8,7*
	śledziona	18,2345	126,816	0,4827	0,2158	17,3*
	mięsień	10,4870	92,506	0,4075	0,1822	3,8*

* statystycznie istotne przy $p \leq 0.05$

Tab. 2. Zmiany aktywności AChE w mózgu, wątrobie, śledzionie i mięśni u samic myszy po podaniu L-glutaminianu sodu w dawce 6 mg/g po pięciu i dziesięciu dniach

Grupy badawcze	Badany narząd	Średnia akt. AChE	% śred. akt. AChE	Odchylenie standardowe	Średni błąd	„t”
1	2	3	4	5	6	7
Kontrolna	mózg	19,7456	100,000	0,6336	0,2833	–
	wątroba	34,3880	100,000	0,2282	0,1020	–
	śledziona	23,3905	100,000	0,2837	0,1269	–
	mięsień	10,2459	100,000	0,3760	0,1681	–

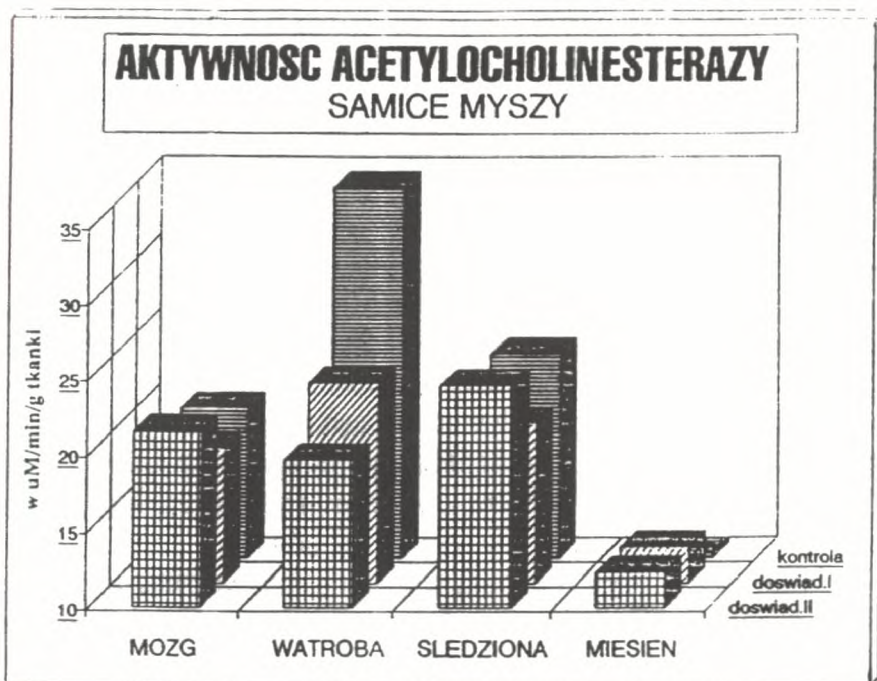
cd. Tab. 2

1	2	3	4	5	6	7
Doświadczalna 1	mózg	18,8272	95,348	0,5117	0,2288	2,5
	wątroba	23,0461	67,017	0,2111	0,0944	81,5*
	śledziona	20,4057	87,239	0,3328	0,1488	15,2*
	mięsień	12,3984	121,008	0,1596	0,0714	11,7*
Doświadczalna 2	mózg	21,5191	108,981	0,3004	0,1343	5,6*
	wątroba	19,6398	57,112	0,4754	0,2126	62,5*
	śledziona	24,5131	104,799	0,3466	0,1550	5,6*
	mięsień	12,3047	120,094	0,3695	0,1652	8,7*

* statystycznie istotne przy $p \leq 0.05$



Ryc. 1. Zmiany aktywności AChE u samców myszy po podaniu L-glutaminianu sodu w dawce 6 mg/g po 5 i 10 iniekcjach



Ryc. 2. Zmiany aktywności AChE u samic myszy po podaniu L-glutaminianu sodu w dawce 6 mg/g po 5 i 10 iniekcjach

Dyskusja

Uzyskane wyniki wskazują, że chroniczne iniekcje L-glutaminianu sodu w istotny sposób wpływają na aktywność acetylocholinesterazy (AChE) w mózgu, wątrobie, śledzionie i mięśniu. W mózgu obserwowano wzrost aktywności AChE, natomiast w wątrobie znaczy spadek w porównaniu z grupą kontrolną.

Mechanizm neurotoksycznego działania L-glutaminianu sodu nie jest w pełni poznany. Z prac wielu badaczy wynika, że podanie L-glutaminianu sodu powoduje wyraźny wzrost w surowicy kwasu glutaminowego i że zmiany degeneracyjne neurocytów jądra łukowego są konsekwencją jego podwyższonego poziomu (Perez, Olney 1972). Kwas glutaminowy jest potrzebny do syntezy acetylocholiny,

ponieważ służy jako koenzym acetylazy cholinowej. Tak więc wzrost aktywności AChE w mózgu można by wiązać z podwyższonym poziomem kwasu glutaminowego. W czasie depolaryzacji błony presynaptycznej odbywa się uwalnianie neuroprzebieżnika z pęcherzyków synaptycznych. Proces ten jest uwarunkowany wniknięciem do zakończeń komórki nerwowej jonów Ca^{2+} przez kanały wapniowe w odpowiedzi na depolaryzację błony plazmatycznej. Jak wynika z badań Olney i wsp. 1971 neurotoksyczny efekt pobudzających aminokwasów jest związany z przedłużoną depolaryzacją neuronów. Pastuszko i wsp. (1984) sugerują inny mechanizm neurotoksycznego działania kwasu kainowego (strukturalnego analogu kwasu glutaminowego). Stwierdzili oni, że kwas ten wywołuje wpływ na receptory glutaminowe i stymuluje wychwyty jonów Ca^{2+} przez synaptosomy mózgu, powodując otwieranie kanałów wapniowych. Dochodzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji wapnia i to powoduje degenerację neuronów.

Uszkodzenia mózgu też mają wpływ na aktywność enzymów i ilość wydzielanych neuromediatorów. Niemal bezpośrednio po przerwaniu dróg nerwowych obserwuje się przejściowy, bardzo silny wzrost niektórych neurotransmiterów (Anden, Bedard, Fuxe, Ungerstedt 1972, Sethy, Kuher, Roth 1973, Lindbrink 1974) w strukturach mózgu unerwianych przez uszkodzone drogi nerwowe. W późniejszym czasie, na skutek degeneracji odciętych od perikarionów aksonów i zakończeń nerwowych zachodzi znaczny spadek ilości neurotransmiterów.

Czynniki regulujące aktywność enzymów odpowiedzialnych za metabolizm acetylocholinę badano m.in. w hodowlach tkanki nerwowej (Siman-Tov, Sachs Amano, Richelson, Nirenberg 1972). Stwierdzono (Siman-Tov 1972), że niektóre substancje, takie jak bromodeoksyrydydina – związek wywołujący formowanie się dendrytów i aksonów w hodowlach tkankowych wpływał na wzrost aktywności AChE i acetylotransferazy cholinowej (ChAc). Podanie cAMP lub adeniny powodowało wzrost aktywności AChE i spadek aktywności ChAc.

Wątroba jest głównym miejscem syntezy enzymu, dlatego aktywność AChE w grupie kontrolnej była bardzo wysoka. Znaczny spadek aktywności enzymu w pierwszej i drugiej grupie doświadczalnej można by wiązać z zaburzeniami w czynności wątroby i uszkodzeniu hepatocytów przez duże dawki L-glutaminianu sodu.

Śledziona stanowi istotną część składową układu siateczkowo-śródbłonkowego. Jej budowa umożliwia kontakt krwi z komórkami fagocytarnymi, bierze udział w usuwaniu z krwiobiegu starych erytrocytów, a także innych cząstek materii. Spadek aktywności AChE w pierwszej grupie doświadczalnej można by wiązać z ogólnym obniżeniem aktywności organizmu przez duże dawki L-glutaminianu sodu. Nieznaczny wzrost aktywności enzymu w drugiej grupie doświadczalnej sugeruje, że organizm mógł częściowo zaadaptować się do chronicznych iniekcji L-glutaminianu sodu.

Mięsień natomiast wykazywał najmniejsze wahania aktywności enzymu, chociaż samice były bardziej reaktywne.

W wyniku przeprowadzonych badań (po wielokrotnym podaniu L-glutaminianu sodu (stwierdzono, że zmienia się aktywność jednego z najważniejszych enzymów, jakim jest AChE. Zmiany te powodują zaburzenia w funkcjonowaniu układu cholinergicznego, a przez to i całego organizmu.

Literatura

- Albala B.J., Moshe S.L., Okada R., 1984, *Kainic acid-induced seizures: a developmental study*. Brain Research 13, 139–148
- Beauregard G., Potier M., Roufogalis B.D., 1980, *Modulation of Erythrocyte Acetylcholinesterase by Cardiolipin: Effect of Subunit Coupling Revealed by Irradiation Inactivation*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 96, 1200–1295
- Carmichael S.W., 1984, *Acetylcholinesterase Activity fo Adrenal Chromatin Vesicles*. Acta Histochem. 75, 183–188
- Coyle J.T., Schwarcz R., 1976, *Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntingtons chorea*. Nature (Lond.), 263, 244–246
- Davis R., and Koelle G.B., 1981, *Electron Microscope Localization of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase in the Superior Cervical Ganglion of the Cat*. J. Neurochem, 30, 826–832
- Fonnum F., 1984, *Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain*. Journal of Neurochemistry. 1–11
- Gordon M.N. and Finch C.K., 1984, *Topochemical Localization of Choline Acetyltransferase and Acetylcholinesterase in Maus*. Brain Res. 308, 364–368

- Kawata A., Nakane M., Deguchi T., 1990, *Inhibition by transforming growth factor beta of choline acetyltransfer stimulation in a co-culture of spinal cord and muscle cells from mice*. Brain-Res-Dev-Brain-Res 57/1, 129–137
- Lehman J. and Fibiger H.C., 1979, *Acetylcholinesterase and the Cholinergic Neurons*. Life Sciences. 25, 1939–1947
- Mastrolia L., Bichi R., Arizzi M., Manley H., 1986, *Acetylcholinesterase and Pseudocholinesterases in Developing Chick Adrenal*. Bas. Appl. Histochem. 30, 97–108
- Miyamoto M., Coyle J.T., 1990, *Idebenone attenuates neuronal degeneration induced by intrastriatal injection of excitotoxins*. Exp-Neurol., 108(1), 38–45
- Nemerof C.B., Konkol R.J., Bissette G., Youngblood A., Martin J.B., Brazeau P., Rone M.S., Prange A.J.Jr., Breese G.R., Kizer J.S., 1977, *Analysis of the disruption in hypothalamic-pituitary regulation in rats treated neonatally with monosodium L-glutamate (MSG): Evidence for the involvement of tuberoinfundibular cholinergic and dopaminergic systems in neuroendocrine regulation*, Endocrinology. 101, 613–622
- Niemierko S., 1965, *Występowanie i właściwości esterazy acetylocholinowej*. Post. Biochem. XI, 3, 247–265
- Olney J.W., Rhee B., Ho O-L., 1974, *Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate*. Brain Res., 77, 507–512
- Pastuszko A., Wilson D.F., Erecińska F., 1984, *Effects of kainic acid in rat brain synaptosomes: the involvement of calcium*. J. Neurochem. 43, 747–754
- Silver A., 1974, *The Biology of Cholinesterase*. North-Holland Publ. Co., Amsterdam-Oxford
- Szerb J.C., Fine A., 1990, *Is glutamate a co-transmitter in cortical cholinergic terminals? Effects of nucleus basalis lesion and of presynaptic muscarinic agents*. Brain-Res. 515(1–2), 214–218
- Szutowicz A., 1979, *Synteza acetylocholin w synaptosomach*. Post. Biochem. 25, 59–84
- Wieraszko A., 1975, *Regulacja biosyntezy acetylocholin*. Post. Biochem. 21, 57–73

The Influence of Sodium L-Glutamate for Acetylcholinesterase Activity in Chosen Organs of Mouse

S u m m a r y

There are presented results of research of the influence of sodium L-glutamate for acetylcholinesterase activity in chosen organs of mouse: brain, liver, spleen and muscle. There was ascertain changes of acetylcholinesterase activity in first and second experimental group in confrontation with control group in every organ. There were the biggest changes of enzyme activity in brain and liver, whereas spleen and muscle were less reactive. It was proved that males were more reactive than females.