

Waldemar Szaroma*

Ocena aktywności wybranych enzymów glikolitycznych w określonych narządach myszy po ogólnoustrojowym podaniu kwasu kainowego

Streszczenie

Eksperyment badawczy przeprowadzono na dorosłych czteromiesięcznych samicach i samcach myszy białej, którym podawano podskórnie kwas kainowy w jednorazowej dawce 12 mg/kg wagi ciała. W surowicy krwi oraz w supernatantach homogenatów mózgu, wątroby i nerek oznaczano aktywność aldolazy i dehydrogenazy mleczanowej. Dodatkowo w surowicy krwi określano stężenie glukozy. Badania aktywności tych enzymów i zawartości glukozy przeprowadzono u zwierząt kontrolnych i doświadczalnych po upływie 1, 2, 6, 24, 120 i 168 godzin od iniekcji kwasu kainowego. W odniesieniu do wartości kontrolnych stwierdzono zarówno u samic, jak i u samców wyraźny wzrost aktywności aldolazy w surowicy krwi oraz znaczne obniżenie jej aktywności w mózgu, wątrobie i nerkach. Jednocześnie w przypadku dehydrogenazy mleczanowej nie zanotowano istotnych zmian jej aktywności w surowicy krwi i w mózgu, natomiast wykazano obniżenie jej aktywności w wątrobie, a wzrost w nerkach. Ponadto stwierdzono wyraźny spadek ilości glukozy w surowicy krwi samic i samców myszy po 3, 6, 24 i 72 godzinach od podania kwasu kainowego.

*Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Krakowie

Wstęp

Dotychczasowe liczne badania eksperymentalne, zapoczątkowane jeszcze w latach siedemdziesiątych, wykazały, że kwas kainowy jest ekscytotoksyną o bardzo silnym działaniu neuropobudzającym i neurotoksycznym. Kwas ten po domózgowym, dokomorowym i ogólnoustrojowym podaniu powoduje selektywną degenerację neuronów oraz zmiany biochemiczne w neuronach i komórkach glejowych różnych struktur mózgu kręgowców (Olney i inni 1974, Krespan i inni 1982, Coyle 1983, Saria i inni 1989).

Jednakże do chwili obecnej, poza mózgiem, niewiele jest wiadomo na temat ewentualnych zmian w metabolizmie innych narządów pod wpływem działania kwasu kainowego. Dlatego też celem podjętych badań było ustalenie obrazu zmian aktywności dwóch kluczowych enzymów cyklu glikolitycznego – aldolazy i dehydrogenazy mleczanowej w mózgu, a także w surowicy krwi, wątrobie i nerkach po jednorazowym ogólnoustrojowym podaniu kwasu kainowego.

Materiał i metodyka badań

Badania przeprowadzono na 112 samicach i 112 samcach cztero-miesięcznych myszy o średniej wadze 27 g, które były hodowane w jednakowych warunkach oświetlenia LD 12:12 i żywione pokarmem standardowym. Wszystkie użyte do badań zwierzęta, zarówno samice jak i samce, podzielono na grupę kontrolną i siedem grup doświadczalnych, po 14 osobników w każdej. Myszy grup doświadczalnych otrzymywały jednorazowo kwas kainowy w postaci iniekcji podskórnej w dawce 12 mg/kg wagi ciała. Następnie po upływie 1, 3, 6, 24, 72, 120 i 168 godzin od momentu podania kwasu kainowego zabijano przez dekapitację myszy grupy kontrolnej i grup doświadczalnych, po czym pobierano krew, preparowano mózg, wątrobę i nerki. Pobraną krew po skrzepnięciu poddawano wirowaniu przez 15 min z prędkością 3000 obr./min, natomiast mózg, wątrobę i nerki po zważeniu homogenizowano w schłodzonym buforze fosforanowym 0.1 M o pH = 7,4.

Uzyskane homogenaty wirowano przez 15 min przy 15 000 obr./min w temperaturze 4°C. Po odwirowaniu, w uzyskanej surowicy krwi oraz w supernatantach mózgu, wątroby i nerek określano aktywność aldolazy metodą Brunsa (1954), zaś dehydrogenazy mleczanowej metodą kolorymetryczną wg Cabauda i Wróblewskiego (1958). Z kolei stężenie glukozy w surowicy krwi oznaczano enzymatycznie przy użyciu testu kolorymetrycznego Biochem – Test Glukoza EO – POCh Gliwice. Z otrzymanych wyników obliczano średnie arytmetyczne oraz procentowe zmiany zawartości glukozy i aktywności aldolazy i dehydrogenazy mleczanowej w odniesieniu do wartości kontrolnych.

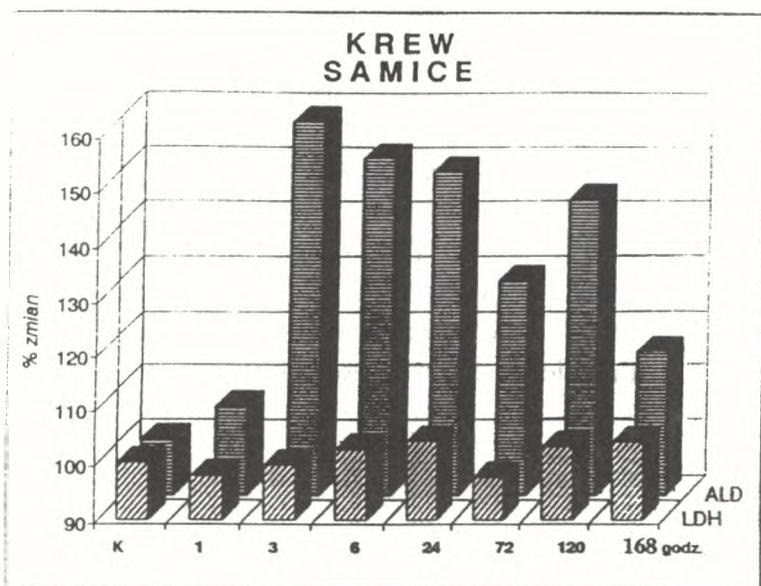
Wyniki

Wszystkie dane liczbowe dotyczące wpływu jednorazowych dawek kwasu kainowego na zmienność zawartości glukozy w surowicy krwi oraz aktywności aldolazy i dehydrogenazy mleczanowej w surowicy krwi, mózgu, wątrobie i nerkach przeliczono na procentowe zmiany w odniesieniu do kontroli i zilustrowano graficznie na ryc. 1–10.

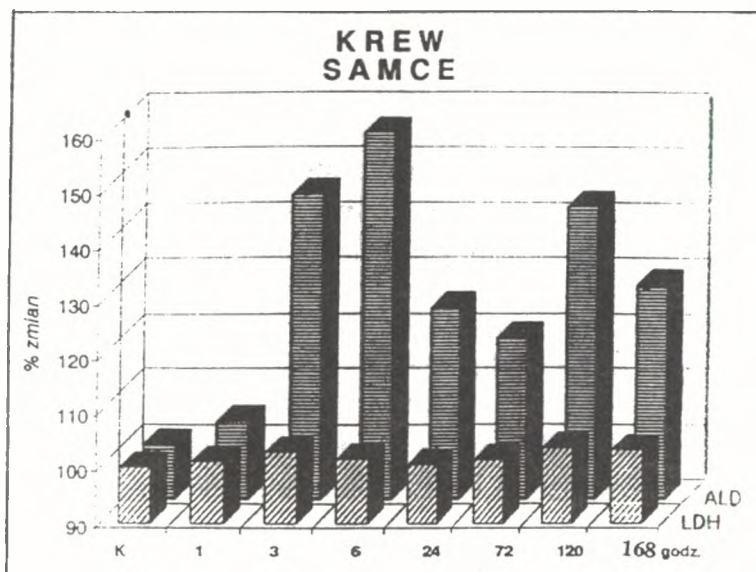
Analiza uzyskanych wyników badań pozwala na stwierdzenie, że ogólnoustrojowe podanie kwasu kainowego w dawce 12 mg/kg powoduje wyraźne zmiany aktywności badanych enzymów cyklu glikolitycznego nie ograniczające się tylko do mózgu, ale występujące także w surowicy krwi, wątrobie i nerkach.

W surowicy krwi samic i samców myszy po iniekcji kwasu kainowego wykazano znaczny wzrost aktywności aldolazy, zarówno po 1, 3, 6, 24, 72, 120 jak i 168 godzinach od momentu podania tego kwasu, natomiast nie zanotowano istotnych zmian aktywności dehydrogenazy mleczanowej (ryc. 1, 2). Ponadto w surowicy krwi wystąpił wyraźny spadek stężenia glukozy szczególnie po 3, 6 i 24 godzinach (ryc. 3, 4).

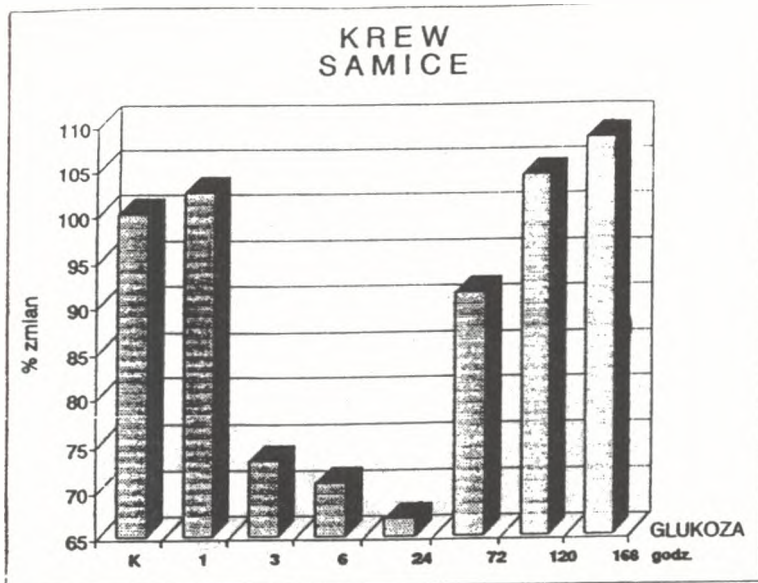
W mózgu zwierząt eksperymentalnych obu płci, które otrzymywały kwas kainowy, stwierdzono istotne obniżenie aktywności aldolazy we wszystkich badanych przedziałach czasowych, natomiast nie zaobserwowano znamiennych zmian aktywności dehydrogenazy mleczanowej (ryc. 5, 6).



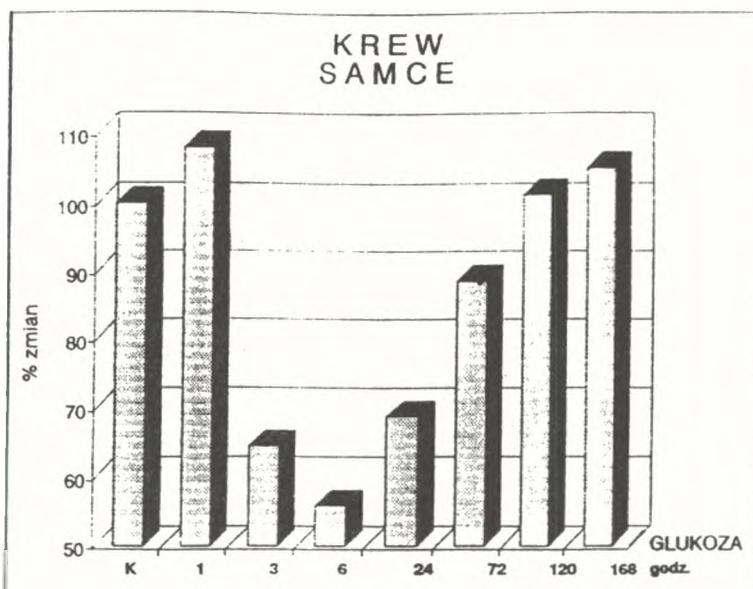
Ryc. 1. Procentowe zmiany aktywności aldolazy (ALD) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w odniesieniu do wartości kontrolnych (K) w surowicy krwi samic myszy po upływie 1, 3, 6, 24, 72, 120 i 168 godzin od jednorazowego ogólnoustrojowego podania kwasu kainowego w dawce 12 mg/kg wagi ciała



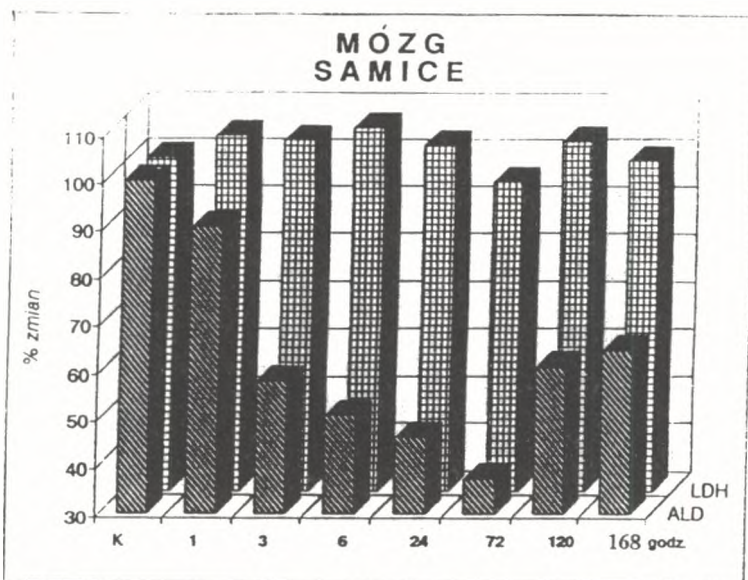
Ryc. 2. Procentowe zmiany aktywności aldolazy (ALD) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w stosunku do wartości kontrolnych (K) w surowicy krwi samców myszy po podskórnej iniekcji kwasu kainowego



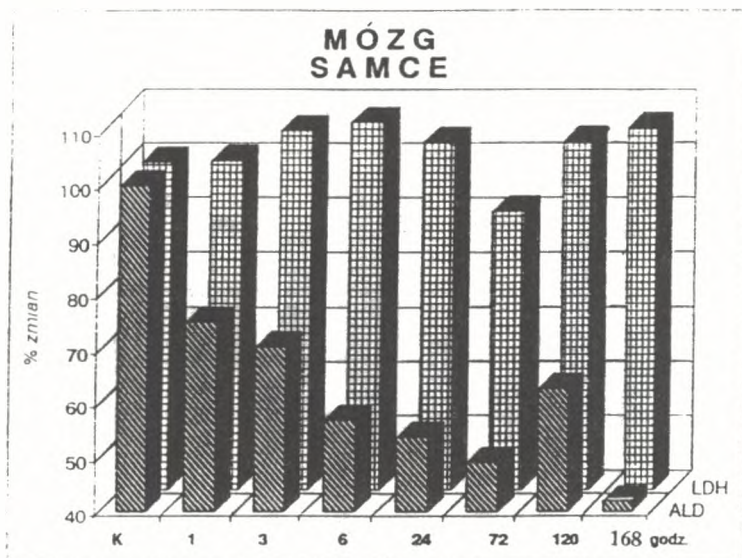
Ryc. 3. Procentowe zmiany zawartości glukozy w odniesieniu do wartości kontrolnych (K) w surowicy krwi samic myszy po upływie 1, 3, 6, 24, 72, 120 i 168 godzin od podania kwasu kainowego w ilości 12 mg/kg wagi ciała



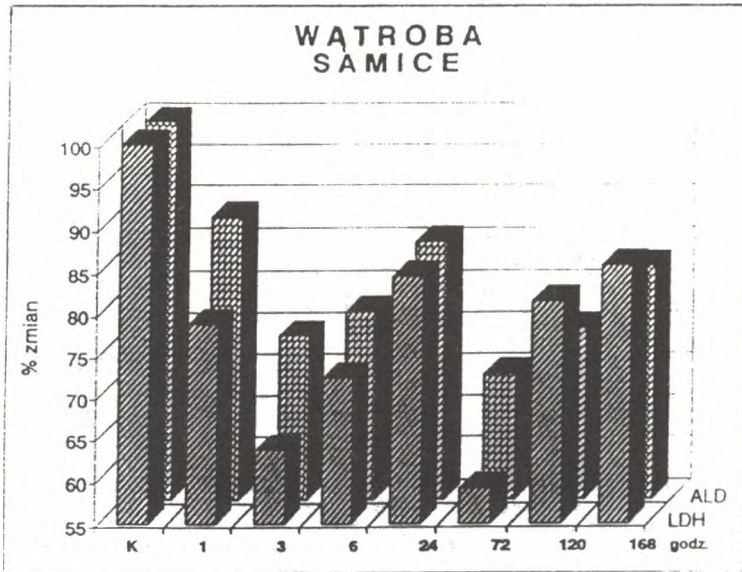
Ryc. 4. Procentowe zmiany ilości glukozy w stosunku do wartości kontrolnych (K) w surowicy krwi samców myszy pod wpływem jednorazowej iniekcji kwasu kainowego



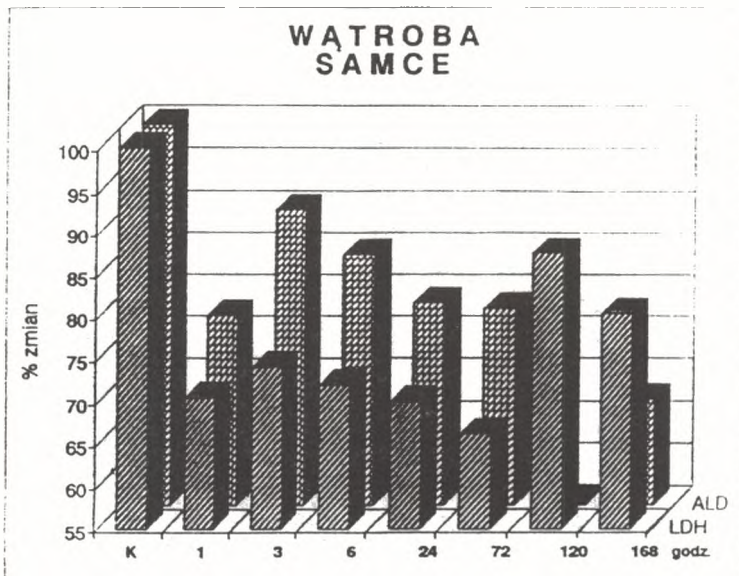
Ryc. 5. Procentowe zmiany aktywności aldolazy (ALD) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w odniesieniu do wartości kontrolnych (K) w homogenatach mózgu samic myszy po upływie 1, 3, 6, 24, 72, 120 i 168 godzin od podania kwasu kainowego



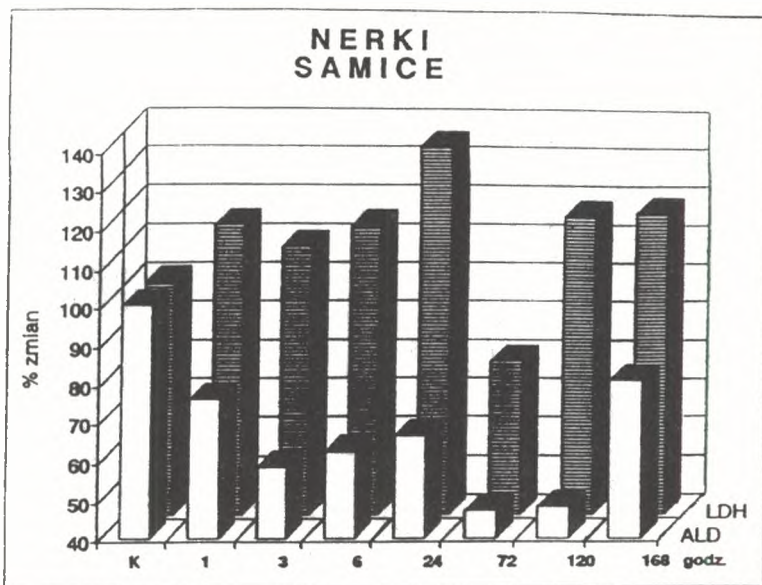
Ryc. 6. Procentowe zmiany aktywności aldolazy (ALD) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w odniesieniu do wartości kontrolnych (K) w homogenatach mózgu samców myszy po upływie 1, 3, 6, 24, 72, 120 i 168 godzin od iniekcji kwasu kainowego w dawce 12 mg/kg



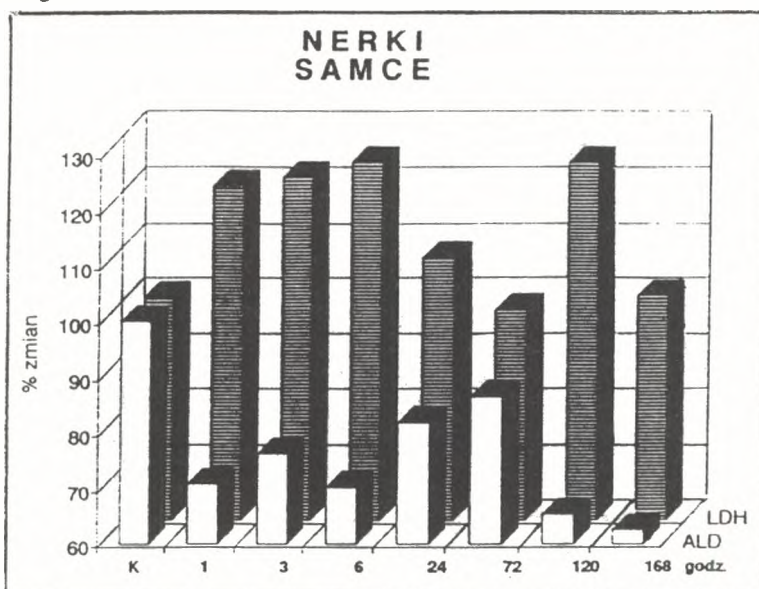
Ryc. 7. Procentowe zmiany aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i aldolazy (ALD) w stosunku do wartości kontrolnych (K) w wątrobie samic myszy po upływie 1, 3, 6, 24, 72, 120 i 168 godzin od jednorazowego podania kwasu kainowego w ilości 12 mg/kg wagi ciała



Ryc. 8. Procentowe zmiany aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i aldolazy (ALD) w odniesieniu do wartości kontrolnych (K) w wątrobie samców myszy po upływie 1, 3, 6, 24, 72, 120 i 168 godzin od momentu iniekcji kwasu kainowego



Ryc. 9. Procentowe zmiany aktywności aldolazy (ALD) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w odniesieniu do wartości kontrolnych (K) w homogenatach nerek samic myszy wywołane jednorazowym podaniem kwasu kainowego



Ryc. 10. Procentowe zmiany aktywności aldolazy (ALD) i dehydrogenazy mleczanowej (LDH) w odniesieniu do wartości kontrolnych (K) w homogenatach nerek samców myszy po podaniu kwasu kainowego w dawce 12 mg/kg wagi ciała

W przypadku wątroby zwierząt doświadczalnych po iniekcji kwasu kainowego wykazano i to zarówno u samic, jak i samców znaczne obniżenie aktywności obu badanych enzymów cyklu glikolitycznego we wszystkich analizowanych przedziałach czasowych (ryc. 7, 8).

Z kolei w nerkach samic i samców myszy jednorazowa podskórna dawka kwasu kainowego spowodowała wyraźne obniżenie aktywności aldolazy i wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej (ryc. 9, 10).

Dyskusja

Jak wynika z przeprowadzonych badań, kwas kainowy wywiera istotny wpływ na aktywność aldolazy i dehydrogenazy mleczanowej zarówno w mózgu, jak i w wątrobie, nerkach i surowicy krwi, w której także powoduje wyraźny spadek stężenia glukozy.

Wykazany w prezentowanych badaniach spadek aktywności aldolazy w mózgu jest skorelowany z obniżeniem się koncentracji glukozy w surowicy krwi i występuje już w pierwszych godzinach od podania kwasu kainowego i stan ten utrzymuje się do kilkudziesięciu godzin. Potwierdzają to wcześniejsze badania, w których również stwierdzono obniżenie aktywności aldolazy w mózgu i glukozy w surowicy krwi myszy po iniekcji samego kwasu kainowego, a także specyficznych blokerów i kwasu kainowego (Szaroma 1993). Wydaje się, że obserwowane zmiany aktywności aldolazy w przypadku mózgu należałoby interpretować neuropobudzającym i neurotoksycznym wpływem kwasu kainowego, u którego podstaw leży jego specyficzne działanie receptorowe. Można zatem przyjąć, że w następstwie bezpośredniego oddziaływania kwasu kainowego dochodzi do zakłóceń metabolizmu neuronów i zaburzeń komórkowej homeostazy, co w konsekwencji prowadzi do ich degeneracji.

Metabolizm komórek mózgu jest bezwzględnie uzależniony od przemian glukozy. Jest ona podstawowym „paliwem” dla metabolicznej aktywności centralnego układu nerwowego, a poprzez pirogronian jest kluczowym prekursorem koenzymu A w centralnym systemie nerwowym (Hall i Gold 1986).

W regulacji stężenia glukozy istotną rolę odgrywa jądro nadskrzyżowaniowe (*nucleus suprachiasmaticus*) podwzgórza, które również

uczestniczy w regulacji sekrecji insuliny (Yamamoto i inni 1984). Jak wykazali Lach i Srebro (1989) jednorazowe domięśniowe dawki kwasu kainowego prowadzą do istotnego zwiększenia ilości RNA w cytoplazmie neuronów *nucleus suprachiasmaticus*. W oparciu o powyższe dane wydaje się prawdopodobne, że na skutek zmian w metabolizmie neuronów tego jądra wywołanych działaniem kwasu kainowego dochodzi do zaburzeń mechanizmów odpowiedzialnych za regulację zawartości glukozy.

Z kolei interpretacja zmian aktywności badanych enzymów cyklu glikolitycznego w krwi, wątrobie i nerkach jest niezwykle trudna, albowiem niewiele jest danych odnośnie działania kwasu kainowego na te narządy. Potwierdzeniem faktu, że kwas ten wywiera istotny wpływ na przemiany metaboliczne w tych narządach są badania Lisy i Muprhy (1984), którzy stwierdzili istotne obniżenie aktywności gamma glutamylotranspeptydazy w mózgu i w nerkach oraz Szaromy (1988), który wykazał wzrost koncentracji glutationu zredukowanego (GSH) w krwi, wątrobie i nerkach czteromiesięcznych samic i samców myszy.

Wydaje się, iż zmiany badanych w niniejszej pracy parametrów biochemicznych w krwi, wątrobie i nerkach mogą być konsekwencją przemian metabolicznych w różnych tkankach i narządach, które wynikają z pośredniego, względnie bezpośredniego, toksycznego ogólnoustrojowego oddziaływania kwasu kainowego.

Literatura

- Bruns F., 1954, *Bestimmung und Eigenschaften der Serumaldolase*. Biochem. Z., 325; 156
- Cabaud P.G., Wróblewski F., 1958, *Colorimetric measurement of lactic dehydrogenase activity of body fluids*. Am. J. Clin. Pathol. 30: 234
- Coyle J.T., 1983, *Neurotoxic action of kainic acid*. J. Neurochem. 41: 1–11
- Hall J., Gold P., 1986, *The effects of training epinephrine and glucose injections on glucose levels in rats*. Behav. Neurol. Biol. 156–167
- Krespan B., Berl S., Nicklas W.J., 1982, *Alteration in neuronal – glial metabolism of glutamate by the neurotoxin kainic acid*. J. Neurochem. 38: 509–518

- Lach H., Srebro Z., 1989, *Changes in the cytoplasmic RNA content in neurons of the nucleus suprachiasmaticus following a single dose of kainic acid*. Folia Biol. (Kraków). 37(1-2): 55-59
- Lisy V., Murphy S., 1984, *γ -glutamyl transpeptidase activity can be altered by kainic acid and related compounds*. Physiol. Gohemoslav. 33: 17-22
- Olney J.W., Rhee V., Ho O.L., 1974, *Kainic acid: A powerful neurotoxic analogue of glutamate*. Brain Res. 77: 507-512
- Sari A., Marksteiner J., Humpel C., Sperk G., 1989, *Pronounced increases in brain levels of calcitonin gene - related peptide after kainic acid induced seizures*. Regulatory Peptides. 26: 215-223
- Szaroma W., 1988, *Zmiany zawartości glutationu w krwi i wybranych narządach różnowiekowych myszy wywołane chroniczną iniekcją analogu kwasu glutaminowego - kwasu kainowego*. Rocznik Nauk.-Dydakt. WSP Kraków, Prace Fizjologiczne. I. 118: 141-156
- Szaroma W., 1993, *Adaptacyjne zmiany aktywności aldolazy i glukozy po podaniu kwasu kainowego i specyficznych blokerów*. Rocznik Nauk.-Dydakt. WSP Kraków, Prace Fizjologiczne III 154: 197-213
- Yamamoto H., Nogai K., Nakagawa H., 1984, *Role of the suprachiasmatic nucleus in glucose homeostasis*. Biochem. Res. 5: 55-60

Waldemar Szaroma

The Valuation of Selected Glicolitic Pathway Enzymes in Definite Organs after Systemic Injection of Kainic Acid

Summary

The study was carried out on 4 month old mature male and female white mice which received subcutaneously kainic acid in single dose 12 mg/kg of body weight. The activity of aldolase and lactate dehydrogenase were determined in the blood serum and in brain, liver and kidneys homogenates. Additionally glucose concentration was defined in blood serum. Study these enzymes activity and glucose contents was carried out in control and experimental animals: 1, 3, 6, 24, 72, 120 and 168 hours after injection of the kainic acid. Marked increase of aldolase activity in blood serum and considerable decrease

its activity in brain, liver and kidneys were at males and also at females in comparison with the control values. At the same time in the case of lactate dehydrogenase weren't noted essential changes of its activity in blood serum and brain, instead there was proved decrease of its activity in the liver, and increase in kidneys. Moreover there was stated statistical significantly decrease of glucose quantity in female and male blood serum after 3, 6, 24 and 72 hours after injection of kainic acid.