

Henryk Lach*, Maria J. Korohoda**,
Karol Dziubek*, Józef Ryczek**

Wpływ pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego i karbacholu na aktywność acetylocholinoesterazy (AChE) w niektórych narządach myszy

Streszczenie

Oznaczano aktywność AChE w mózgu, sercu, jelicie cienkim i mięśniu uda samców myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego i karbacholu. Aktywność AChE oznaczano metodą Ellmana. Wykazano wzrost aktywności badanego enzymu w mózgu i mięśniu uda po podaniu PHA-2 i spadek jego aktywności w mózgu, sercu i jelicie cienkim po iniekcji HA-4. Podanie karbacholu spowodowało spadek aktywności AChE jedynie w mózgu, po czym po podaniu PHA-2 zanotowano jej wzrost.

Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się, że jedynie pochodna PHA-2 wzmacnia aktywność acetylocholinoesterazy.

Wstęp

Acetylocholinoesteraza (AChE EC 3.1.1.7) jest enzymem występującym głównie w zakończeniach nerwów cholinergicznym, syntetyzujących i uwalniających acetylocholinę (ACh). AChE występuje także w erytrocytach, ścianach naczyń krwionośnych i gruczołach wydzielniczych.

* Zakład Fizjologii Zwierząt Instytutu Biologii WSP w Krakowie.

** Samodzielny Zakład Chemii WSP w Krakowie.

W prawidłowo funkcjonującym organizmie nadmiar ACh jest stosunkowo szybko rozkładany przez AChE, która nie pozwala na nadmierne gromadzenie się tego neuromediatora i zbyt długie jego oddziaływanie na receptory. Funkcjonowanie narządów i całego ustroju zależy od rytmicznego wytwarzania ACh w zakończeniach nerwowych i od jego szybkiego rozkładu przez AChE. Poziom aktywności AChE jest więc miernikiem aktywności całego układu cholinergicznego (Lehman i Fibiger 1979).

Spadek aktywności AChE wywołuje wzrost poziomu ACh objawiający się zaburzeniami transportu błonowego w wyniku konformacyjnego otwarcia kanałów wapniowych i sodowych (Sandle 1991), a także pobudzeniem receptorów cholinergicznym, tj. muskarynowych i nikotynowych mózgu, mięśni gładkich i zwojów śródściennych przewodu pokarmowego, a także receptorów nikotynowych w płytce nerwowo-mięśniowej (Hammer i Giachetti 1983).

Stwierdzono, że leki cholinomimetyczne pobudzające receptory muskarynowe zmniejszają napływ jonów wapnia do komórki (Trautwein i wsp. 1982). Tak więc zmiany w konformacyjnym otwarciu kanałów wapniowych wywołujące ewentualny wzrost aktywności AChE i obniżenie poziomu ACh mogą mieć korzystny wpływ na działanie leków depresyjnych. Znanymi lekami depresyjnymi są pochodne hydantoiny zawierające podstawniki w położeniu 5. Działają one depresyjnie na ośrodkowy układ nerwowy i silnie hamują sferę ruchową kory mózgowej. Pochodne stosowane w leczeniu wywołują jednak silne zaburzenia w funkcjonowaniu wielu narządów i dlatego szuka się coraz to nowych pochodnych hydantoiny o słabym działaniu ubocznym.

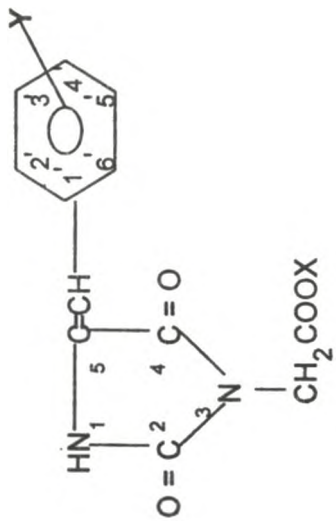
W naszych badaniach postanowiono więc zbadać wpływ pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego na aktywność AChE. Pochodne te zgodnie z wcześniej uzyskanymi danymi (Korohoda i wsp. 1976) mogą charakteryzować się aktywnością przeciwdrgawkową. Jeżeli tak to powinny stymulować aktywność AChE, głównie w mózgu, sercu, jelicie cienkim i mięśniu udowym samców myszy, po wcześniejszej podaży karbacholu.

Material i metody badań

A. Pochodne kwasu hydantoino-3-octowego

Do badań wykorzystano cztery kwasy 5-benzylideno-hydantoino-3-octowe, tj. kwas 2' – metylobenzylideno-hydantoino-3-octowy, HA-1, kwas 3' – metylobenzylideno-hydantoino-3-octowy, HA-2, kwas 4' –metylobenzylideno-

Tab. 1. Dane dotyczące pochodnych kwasów hydantoino-3-octowych oraz ich soli potasowych



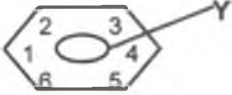
Symbol związku	X	Y	Wzór sumaryczny	wyd. %	T.t. °O*	ANALIZA						IR, cm ⁻¹ **			
						Obliczono %			Otrzymano %			v NH	v C=O	v C=C	
						C	H	N	C	H	N				
HA-1	H	2-CH ₃		80.0	260-261				60.3	4.7	10.7	3220	1750	1700	1650
HA-2	H	3-CH ₃	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₄ (260)	78.4	270-271	56.5	4.1	10.1	56.4	4.5	10.1	3300	1770	1710	1650
HA-3	H	4-CH ₃		94.4	278-279	56.5	4.4	10.1	56.5	4.4	10.1	3240	1770	1720	1650
HA-4	H	4-N(CH ₃) ₂	C ₁₄ H ₁₃ N ₂ O ₄ (289)	53.0	288-300	55.1	4.1	13.8	57.9	5.3	14.2	3200	1760	1700	1640
PHA-1	K	2-CH ₃		90.0	329-331				52.3	3.6	9.2	3280	1750	1700	1650
PHA-2	K	3-CH ₃	C ₁₃ H ₁₁ N ₂ O ₄ K (298)	83.3	319-321	52.4	3.7	9.4	52.4	3.7	9.1	3320	1750	1710	1650
PHA-3	K	4-CH ₃		76.6	340-343	52.1	3.7	9.3	52.1	3.7	9.3	3320	1770	1710	1650

* Oznaczano w aparacie Boetiusa

** Wykonano na spektrofotometrze IR-75(Zeiss) w zakresie 400-3800 cm⁻¹ w HCB

hydantoino-3-octowy, HA-3 oraz kwas 4' –dimetyloaminobenzylideno-hydantoino-3-octowy, HA-4. Syntezę tych związków opisano wcześniej (Lach i wsp. 1994). Ze względu na słabą rozpuszczalność w wodzie związków HA-1, HA-2 i HA-3 przeprowadzono je w odpowiednie sole potasowe otrzymując: 2' – metylobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu, PHA-1, 3' – metylobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu, PHA-2, 4' – metylobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu, PHA-3. Związek HA-4 charakteryzował się dobrą rozpuszczalnością w wodzie, ze względu na możliwość tworzenia soli wewnętrznej. Dane fizykochemiczne dotyczące otrzymanych związków są zestawione w tabeli 1 i 2.

Tab. 2. Widma ¹HNMNR* pochodnych kwasów hydantoino-3-octowych oraz ich soli potasowych

Symbol związku	Przesunięcie chemiczne δ ppm				
	CH ₃	CH ₂	=CH		NH
HA-1	2.35 s	4.22 s	6.67 s	7.67-7.05**	10.83
HA-2	2.35 s	4.22 s	6.56 s	7.69-7.01 m,	10.93
HA-3	2.34 s	4.22 s	6.58 s	7.25d i 7.56 d	10.87
HA-4	2.98 s	4.19 s	6.53 s	6.75d i 7.51 d	10.66
PHA-1	2.34 s	3.82 s	6.57 s	7.73-7.09 m	–
PHA-2	2.34 s	3.69 s	6.42 s	7.69-6.98 m	–
PHA-3	2.33 s	3.70 s	6.43 s	7.23d i 7.53 m	–

* Wykonano na spektrofotometrze Tesla BS 587A (80 Mhz) w DMSO-d₆ w odniesieniu do TMS jako wzorca wewnętrznego w temperaturze pokojowej

** Skróty s-singlet, d-dublet, m-multiplet

B. Przygotowanie materiału i oznaczenie aktywności AChE

Badania przeprowadzono na 56 samcach myszy białej, dojrzałych płciowo, o średniej wadze 25 g, które żywiono pokarmem standardowym i hodowano w warunkach oświetlenia LD 12:12. Zwierzęta przeznaczone do badań podzielono na dwie grupy kontrolne i sześć doświadczalnych. Zwierzętom

grup doświadczalnych podawano zsyntetyzowane pochodne kwasu hydantoino-3-octowego: PHA-1, PHA-2, PHA-3 i HA-4. W pierwszych czterech grupach doświadczalnych zwierzętom podawano powyższe pochodne w dawce 60 mg/kg masy ciała, przez okres dwóch dni (dwie iniekcje), w grupie piątej karbachol w dawce 250 µg/kg na jedną godzinę przed dekapitacją, zaś w grupie szóstej karbachol i po jednej godzinie od momentu podaniu karbacholu związek PHA-2. W grupach doświadczalnych zwierzęta zabijano po jednej godzinie od momentu ostatniej iniekcji.

Po dekapitacji oznaczano aktywność AChE w mózgu, sercu, jelicie cienkim i mięśniu udowym według metodyki Ellmana i wsp. (1957). Z uzyskanych danych wyliczono średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe. Dla stwierdzenia czy uzyskane zmiany aktywności AChE pomiędzy kontrolą a poszczególnymi grupami badawczymi są statystycznie istotne zastosowano test „t” Studenta-Gosseta.

Wyniki

Wszystkie dane liczbowe zestawiono w tabeli 3 i 4 oraz zilustrowano na rycinie 1–2.

Mózg. Podanie zsyntetyzowanych pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego spowodowało wzrost aktywności AChE w drugiej grupie doświadczalnej, po podaniu PHA-2 i jego spadek po iniekcji PHA-3 i HA-4. Karbachol spowodował bardzo wyraźny spadek aktywności AChE w mózgu. Po podaniu PHA-2, po jednej godzinie od momentu iniekcji karbacholu nastąpił bardzo wyraźny wzrost aktywności badanego enzymu.

Serce. W sercu po podaniu PHA-1, PHA-2, PHA-3 i HA-4 stwierdzono spadek aktywności AChE. Spadek ten był bardzo wyraźny po iniekcji HA-4. Podanie samego karbacholu i PHA-2, po wcześniejszej iniekcji karbacholu nie spowodowało zmian aktywności AChE w sercu.

Jelito cienkie. Iniekcja PHA-2, PHA-3 i HA-4 wywołała statystycznie istotny spadek aktywności AChE w jelicie cienkim samców myszy. Podanie karbacholu i PHA-2, po wcześniejszej iniekcji karbacholu nie spowodowało zmian w aktywności AChE w jelicie cienkim.

Tab. 3. Zmiany aktywności acetylocholinoesterazy AChE w mózgu, sercu, jelicie cienkim i mięśni u samców myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego w dawce 50 mg/kg masy ciała

Grupa Badawcza	Badany narząd			
	mózg	serce	jelito	mięsień
Kontrola	10.858	8.413	18.740	7.414
SD	±1.818	±1.443	±4.627	±1.263
PHA-1	10.427	7.887	18.368	8.601
SD	±0.883	±1.430	±3.519	±1.394
„t”	0.521	0.634	0.156	1.557
PHA-2	14.399	7.605	6.724	12.962
SD	±1.575	±0.938	±0.905	1.544
„t”	3.604*	1.488	6.768*	6.811*
PHA-3	7.509	7.845	7.623	11.623
SD	±1.617	±1.423	±1.442	±2.910
„t”	3.369*	0.685	5.617*	3.246*
HA-4	7.937	5.644	8.532	8.994
SD	±1.669	±1.423	±1.442	±2.910
„t”	2.894	4.103*	5.056*	1.304

* statystycznie istotne przy $P < 0.01$

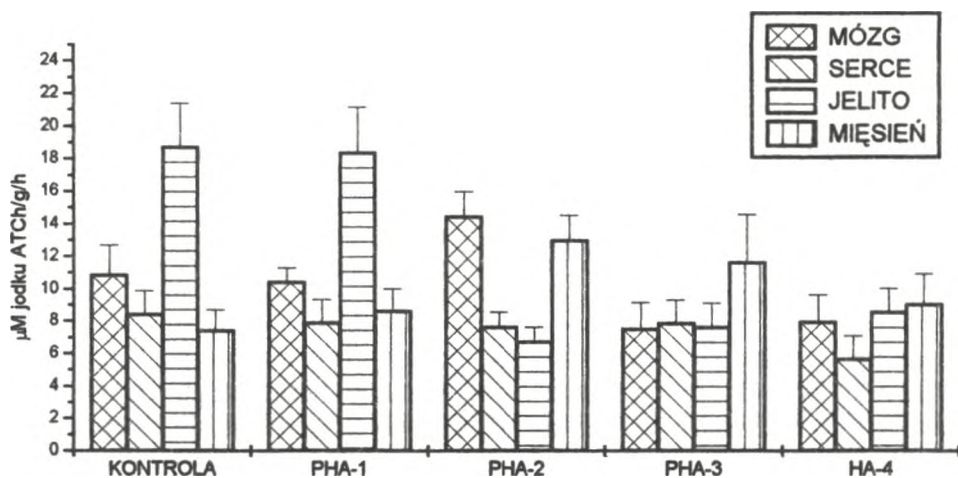
Porównywano grupy doświadczalne z grupą kontrolną

Tab. 4. Zmiany aktywności acetylocholinoesterazy (AChE) w mózgu, sercu, jelicie cienkim i mięśni u samców myszy pod wpływem pochodnych karbacholu oraz karbacholu plus 3' – metylobenzylideno-hydantoino-3-octanu potasu (PHA-2)

Grupa Badawcza	Badany narząd			
	mózg	serce	jelito cienkie	mięsień uda
Kontrola	10.85	8.413	18.740	7.414
SD	±1.8188	±1.443	±4.627	±1.263
Karbachol	4.937	8.610	19.731	8.394
SD	±0.243	±0.234	±0.857	±1.083
„t”	5.370*	0.429	0.397	0.874
Karbachol + PHA-2	14.399	7.605	16.724	12.962
SD	±0.792	±0.966	±0.948	±0.717
„t”	2.709	1.793	2.084	0.054

* statystycznie istotne przy $P, 0.01$

Porównywano grupy doświadczalne z grupą kontrolną



Ryc. 1. Zmiana aktywności AChE u samców myszy

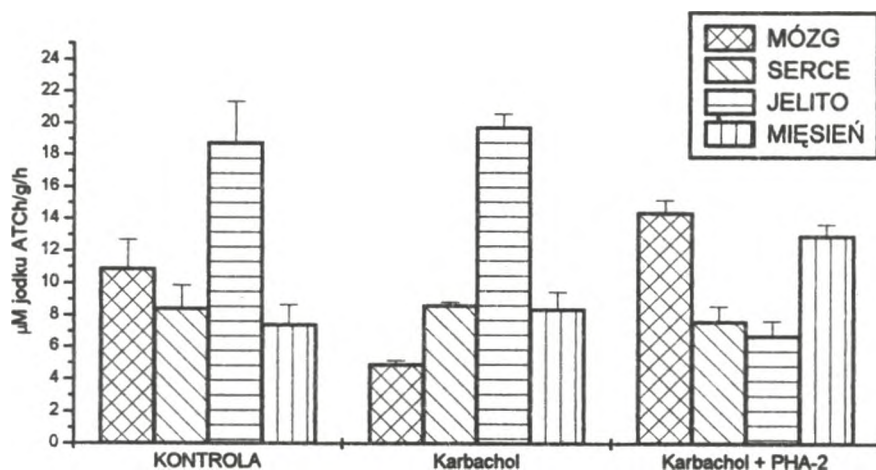
Oznaczenia:

PHA-1, 2 – metylobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu,

PHA-2, 3 – metylobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu,

PHA-3, 4 – metlobenzylideno-hydantoino-3-octan potasu,

HA-4, kwas dimetyloaminobenzylideno-hydantoino-3-octowy



Ryc. 2. Zmiana aktywności AChE u samców myszy

W grupie doświadczalnej Karbachol podano jednorazowo karbachol, zaś w grupie Karbacho/PHA-2 podano karbachol, a następnie związek PHA-2

Mięsień udowy. Iniekcja PHA-2 i PHA-3 spowodowała wzrost aktywności AChE, podobnie jak dawka PHA-2, po wcześniejszym podaniu karbacholu.

Dyskusja

Podanie 3' – metylobenzylideno-hydantoino-3-octanu potasu (PHA-2) spowodowało wzrost aktywności AChE w mózgu.

Ważną rolę w rozważaniach nad aktywnością i mechanizmem działania AChE odgrywają badania nad wpływem inhibitorów tego enzymu. Inhibitory AChE hamują hydrolizę ACh i powodują gromadzenie się tego neuroprzekaźnika, we wszystkich synapsach układu cholinergicznego, co wywołuje pobudzenie pozazwojowych zakończeń synaptycznych lub blok depolaryzacyjny zwojów autonomicznych płytki nerwowo-mięśniowej mięśni szkieletowych oraz synaps cholinergicznyc. Inhibitory AChE mogą mieć naturę kompetycyjną lub niekompetycyjną. Pierwsze charakteryzują się odwracalnym działaniem hamującym, natomiast te drugie działają nieodwracalnie. Związki o odwracalnym działaniu hamującym są bardzo powoli hydrolizowane, przez AChE w przeciwieństwie do inhibitorów niekompetycyjnych, które z cząsteczką enzymu wiążą się w sposób trwały. Inhibitory AChE wiążą się z wiązaniem anionowym i estrowym lub tylko estrowym enzymu (Karczmar 1984).

Nagromadzenie ACh w wyniku działania inhibitorów AChE pobudza receptory muskarynowe i nikotynowe (Hammer i Giachetti 1983). Działanie inhibitorów AChE wiąże się z pobudzeniem przez nagromadzoną ACh receptorów muskarynowych i nikotynowych. Receptory te pomimo tego, że wykazują powinowactwo do tego samego mediatora (ACh) różnią się od siebie mechanizmem działania, np. receptor nikotynowy jest receptorem jonotropowym, a receptor muskarynowy metabotropowym (Lindstrom i wsp. 1983). Wykazano także różnice pomiędzy receptorem nikotynowym pochodzenia mięśniowego, a receptorem nikotynowym pochodzenia neuronalnego (Morley i Kemp 1981). Dlatego też ten sam neuromediator w różnych rodzajach komórek może mieć całkowicie przeciwstawne działanie. I tak kiedy działa jako przekaźnik nerwowo-mięśniowy stymuluje skurcze mięśni szkieletowych, albo wywołuje hiperpolaryzację mięśnia sercowego wywołaną ucieczką z niego jonów potasu.

W przeprowadzonych badaniach obserwowano wzrost aktywności AChE po podaniu PHA-2 w mózgu. Inne badane pochodne kwasu hydantoino-3-octowego nie zmieniły aktywności AChE w pozostałych narządach, tj. mięśniu serca, jelicie cienkim i mięśniu uda, albo ją obniżyły poniżej warto-

ści kontrolnych. W związku z powyższym tylko pochodna PHA-2 może być traktowana jako substancja obniżająca aktywność układu cholinergicznego badanych myszy. Może więc charakteryzować się ewentualnymi właściwościami przeciwdrgawkowymi.

W celu potwierdzenia czy pochodna PHA-2 stymuluje aktywność AChE obniżono aktywność tego enzymu przez jednorazowe podanie karbacholu. Karbachol wyraźnie obniżył aktywność AChE i to głównie w mózgu. Wydaje się to interesujące, gdyż związek ten jest agonistą receptorów nikotynowych, które w przeważającej ilości występują w układzie cholinergicznym obwodowym, poza centralnym systemem nerwowym (Zatz i Brownstein 1981), a tylko w niewielkiej ilości w mózgu (Morley i Kemp 1981).

Rzeczywiście po podaniu PHA-2 nastąpił wzrost aktywności AChE w mózgu i mięśni udowym badanych myszy. Tak więc pochodna ta znosi blokadę cholinergiczo-nikotynowej transmisji w mózgu i mięśni udowym i będzie brana pod uwagę w dalszych badaniach, jako substancja o ewentualnych właściwościach przeciwdrgawkowych.

W konkluzji można stwierdzić, że być może bezpośrednią przyczyną obserwowanych zmian aktywności AChE w mózgu, sercu, jelicie cienkim i mięśni udowym myszy są różnice w strukturze chemicznej badanych pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego.

Literatura

- Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V., Featherston R.M., 1961, *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88–95.
- Hammer R., Giachetti A., 1983, *Muscarinic receptor subtypes M 1 and M 2 biochemical and functional characterization*. *Life Sci.*, 31: 2991–2998.
- Karczmar A.G., 1984, *Acute and long lasting central actions of organophosphorus agents*. *Found. Appl. Toxicol.*, 4: 1–17.
- Korohoda M.J., Kleinrok Z., Przegaliński E., 1976, *A search for new anticonvulsant compounds among 3-aryl-5-benzylidene derivatives of 2-tiohydantoin*. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.*, 28: 329–333.
- Lach H., Korohoda M.J., Dziubek K., Ryczek J., 1994, *Zawartość glutationu (GSH) w wybranych narządach myszy pod wpływem pochodnych kwasu hydantoino-3-octowego*. W: *Prace Fizjologiczne IV*. *Rocz. Nauk.-Dydakt. WSP, Kraków*, z. 173, 79–91.

- Lindstrom J., Tzarsargent P., Gullick W., Hochshwender S., Swanson L., 1983, *Use of monoclonal antibodies to study acetylcholine receptors from electric organs, muscle, and brain and the autoimmune response to receptor in myasthenia gravis*. W: 48 th Cold Spring Harbor Symposium, Molecular Neurobiology, CHS Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 89–99.
- Morley B.J., Kemp G.E., 1981, *Characterization of putative nicotinic acetylcholine receptor in mammalian brain*. Brain Res. 228: 81–104.
- Trautwein W., Taniguchi J., Noma A., 1982, *The effect of intracellular cyclic nucleotides and calcium on the action potential and acetylcholine response of isolated cardiac cells*. Pflugers Arch. Physiol., 392: 307–314.
- Zatz M., Brownstein M.J., 1981, *Injection of α -bungarotoxin near the suprachiasmatic nucleus blocks the effects of light on nocturnal pineal enzyme activity*. Brain Res. 213: 438-442.

*Henryk Lach, Maria J. Korohoda,
Karol Dziubek, Józef Ryczek*

Effect of Derivatives of Hydantoin-3-Acetic Acid and Carbachol on the Activity of Acetylcholinesterase (AChE) in Selected Organs of Mice

Summary

Changes in the activity of AChE induced by hydantoin-3-acetic acid derivatives and carbachol were assayed in brain, heart, small intestine and biceps muscle of thigh of male mice. The activity of AChE was determined with the method of Ellman.

The increase of AChE activity was observed after PHA-2 application in brain and biceps muscle of thigh, and the decrease in the enzyme activity after HA-4 application in brain, heart and small intestine. Carbachol induced the decrease in AChE activity in brain only but subsequent application of PHA-2 caused the significant increase in the activity.

It is suggested that the PHA-2 stimulates the activity of AChE.