

A ÉS B TÍPUSÚ MONOAMINO OXIDÁZ ENZIMBÉNÍTŐK HATÁSA PATKÁNYOK VISELKEDÉSI MINTÁIRA. I.

KNOLL BERTA, a biológiai tudományok kandidátusa, TIMÁR JÚLIA,
GYARMATI ZSUZSA, HELD GYÖRGYI és KNOLL JÓZSEF, az MTA rendes tagja

Közlésre érkezett: 1980. X. 20.

Mind a farmakológiában, mind a biokémiában elfogadottá vált, hogy a mitokondriális monoamino oxidáz (MAO) enzimnek szubsztrát specificitástól függően két, A és B formája van. A két formát szelektív módon gátló vegyületek felfedezése tette lehetővé.

1964-ben Knoll és mtsai kidolgozták a deprenilt (fenilizopropil-N-metilpropinilamin), melyről a részletes vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy bár a MAO enzim egyik leghatékonyabb gátlója, a tiramin hatását nem potenciórozza, hanem gátolja (Knoll és mt 1968).

A (—)deprenilre, mint új hatásspektrumú MAO bénítóra, akkor fordult erőteljesen a nemzetközi kutatás figyelme, amikor Knoll és Magyar 1972-ben bebizonyították, hogy ez a vegyület a B-típusú MAO szelektív gátlója. A MAO enzim kutatásában a klorgilin (Johnston 1968) és (—)deprenil használatos az A, ill. B enzim szelektív gátlójaként (Knoll 1976, 1980).

A (—)deprenil és klorgilin egyaránt csak meghatározott dózistartományban gátolják szelektíven a MAO egyik típusát, míg nagyobb adagokban elvesztik ezt a hatásukat. A (—)deprenil szelektív dózisának tartós adagolásával is fenntartható a B-típusú enzim szelektív gátlása (Ekstedt és mt 1979).

A MAO-B enzim specifikus szubsztrátja, a feniletamin (PEA), amelynek hatását a szervezeten belül szelektív módon lehet (—)deprenillel fokozni (Knoll, 1976). Erre épül a B-típusú enzim folyamatos *in vivo* gátlásának macska pislogóhártyán kidolgozott vizsgálati módszere. A klorgilin még igen nagy adagban is hatástalan az *in vivo* tesztben (Knoll, 1976). PEA-val kiváltott sztereotip mozgásmintákat patkányon (—)deprenillel erősen fokozni lehet, míg klorgilin hatástalan (Braestrup és mt. 1975). Deprenil kezelés során az agyi PEA-szint igen erősen fokozódik. Mivel a PEA-t stimulatív agyi mikroaminnak tekintik (Sabelli, 1974), megvizsgáltuk a (—)deprenil szelektív dózisainak hatását néhány tanulási teszt-szituációban klorgilinnel összehasonlítva. Mint ismeretes, a striatalis dopaminerg rendszernek fontos szerepe van a patkányok tanulási

reakcióiban és a dopamin (DA) mind az A, mind a B-típusú MAO szubszt-rátja, kísérleteinkben ezért a dopamin rendszerben bekövetkezett változásokat is nyomon követtük a szelektív MAO bénítókkal (klorgilin, (–)deprenil) kezelt állatokon.

Anyag és módszer

A kísérletekhez hím, Wistar patkányokat (180–220 g) használtunk. Az állatok tanulási és memóriatároló képességét egyirányú és kétirányú feltételes reflex kiépítését szolgáló berendezésekben ellenőriztük. Egyirányú elhárító reflex kiépítésére előző (Knoll B. 1976, 1978) közleményeinkben részletesen leírt módszereink közül a Screening teszt II-t alkalmaztuk. Ebben a kísérleti helyzetben gyenge feltétlen inger (60°C-ra felfűtött fémlap) társítottunk gyenge feltételes ingerrel (környezeti ingerek összessége), amelyek együttes alkalmazása mellett az állatok zöme nehezen tanul, az átlagos teljesítmény alacsony.

Kétirányú feltételes reflex kiépítését automatikusan működő shuttleboxban végeztük el (Bovet, 1966). A módszer előnye az előzőkhöz képest, hogy a készülék egyszerre 6 állat viselkedését regisztrálja. A módszer lényege, hogy minden állat egy fémlappal (barrier) kétfelé választott boxba kerül. A választófalak közepén az állat számára kényelmesen átjárható nyílás van. A dobozok alapja fémrács, mely a feltétlen inger kiváltását biztosító áramütést adja. Feltételes ingerként ritmusosan villanó fény szolgál. 15"-es ún. nyugalmi periódust 10"-es feltételes inger (csak fény) követ, majd 5"-en keresztül párosítjuk a fényt és a feltétlen ingerként szolgáló áramütést (1,3 mA).

Az állatok feladata, hogy a feltételes inger (fény) hatására a kiinduló helyükről a kapun át a doboz másik felébe meneküljenek. Ha ez a feltételes inger hatására nem következik be, áramütést kapnak („büntetés”), majd a szünet után most már az ellenkező oldalról kezdve ismétlődik az újabb ciklus.

Az állatok 4 egymást követő napon, naponta 100 társítást kaptak. A feltételes reflex kiépülését („akvizíció”) %-ban kifejezve a napok függvényében grafikusan ábrázoltuk.

A szelektív MAO bénítók tanulásra kifejtett hatásával párhuzamosan másik patkánycsoporton azonos gyógyszeres kezelések striatalis DA szintre kifejtett hatását vizsgáltuk spektrofotometriával.

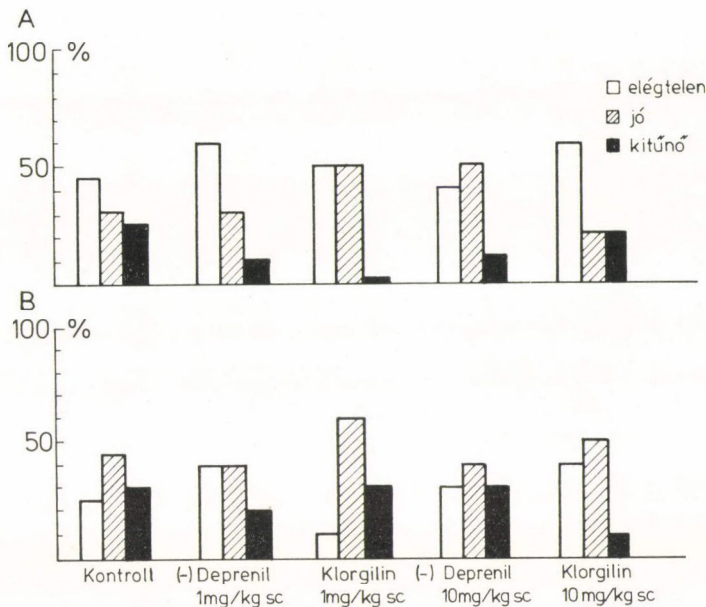
Az állatokat 24 órával a kezelések befejezése után guillotinnal dekapitáltuk, az agyat azonnal eltávolítottuk. Az egyik oldali corpus striatumot (Glowinski, 1966) módszere szerint vettük ki. 0,4 M perklorosavban homogenizáltuk, majd MSE centrifugán 15000 g, 4°C, 20 percig centrifugáltuk. A felülúszót pH 8,4-re történő beállítása után, Al₂O₃ oszlopra vittük. Az oszlop Tris pufferes (pH: 8,4) és bidesztillált vízzel történő mosása után, 0,2 N ecetsavval eluáltuk a dopamint. Az ecetsavas eluátum 1 ml-éből a dopamint Atack (1973) módszere szerint spektrofotometrián határoztuk meg.

Mind a viselkedés, mind a biokémiai mérések eredményeit a kísérletek végén matematikailag értékeltük 2 próbás Student t teszt alkalmazásával. Felhasznált vegyületek: (–)deprenil (Chinoïn, Budapest), klorgilin (2,4-diklo-rofen-oxipropil-N-metil-propinilamin, MB-9302, May és Baker, Dagenhaus, Anglia), reszerpin (Kőbányai Gyógyszerárugyár Budapest). A (–)deprenilt 0,9%-os konyhasóban, a klorgilint desztillált vízben oldottuk és szubkután adtuk az állatoknak. A kontrollokat fiziológiás sóval, ill. desztillált vízzel kezeltük.

Eredmények

(–)Deprenil és klorgilin 1 mg/kg és 10mg/kg dózisokban 24 órával a kezelés után nem okozott változást az állatok tanulási és memóriatároló képességében Screening teszt II-es módszerünkkel mérve. Tendenciájukat tekintve mind az 1 mg (–)deprenil, mind az 1 mg/kg klorgilin az első tanulást egy kissé gátolta a kontrollokhöz viszonyítva (1. ábra).

Lényeges különbséget kaptunk hatásukat illetőleg krónikus kezelés után. Ebben az esetben 7 napon át naponta 1 mg/kg (–)deprenilt, illetve klorgilint injiciáltunk szubkután az állatokba, és ugyancsak 24 órával az utolsó kezelés után teszteltük viselkedésüket az adott kísérleti feltételek mellett. A hatás



1. ábra Akut (1 és 10 mg/kg s. c.) (–)deprenil és klorgilin kezelés hatása patkányok tanulási és memóriatároló képességére. Csoportonként 20 állat.

Módszer: Screening teszt II
(Knoll, B. Orvostud. 1976)

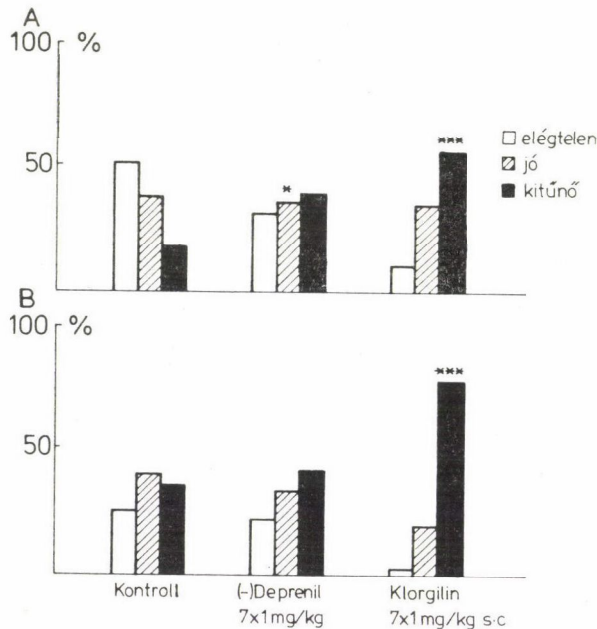
pozitív volt. Mindkét vegyület szignifikánsan növelte a feltételes reflexet kiépítő állatok számát (2. ábra).

Miután, Screening teszt II. módszerünkkel mérve, csak az egyhetes (—)deprenil, ill. klorgilin kezelések után kaptunk tanulás és retenció fokozást, a továbbiakban csak az ily módon kezelt patkányok akvizíciós képességét vizsgáltuk a shuttle-boxban.

A 3. ábrán tüntettük fel az eredményeket. A vizsgálatok szerint mind a (—)deprenil, mind a klorgilin fokozta a feltételes reflex akvizícióját az egy héten át fiziológias konyhasóval kezelt csoporthoz képest (0,1 ml/100 g naponta). A klorgilin, hasonlóan az egy-irányú berendezésben kapott eredményhez, erősebb hatású volt, mint a (—)deprenil (Knoll, B. és mt. 1977).

A biokémiai mérések kimutatták, hogy a striatalis dopamin szintet a (—)deprenil 1 és 10 mg/kg dózisokban szignifikánsan növelte, klorgilin csak 10 mg-os dózisban volt hatékony. Meglepő volt számunkra, hogy a tanulást fokozó krónikus kezelések csak igen kis mértékű, nem szignifikáns emelkedést okoztak, tehát a vegyületek viselkedésre kifejtett hatása és a dopamin szintre kifejtett hatása között disszociáció van (4. és 5. ábra).

A reszerpin trankvilláns hatásának elemzése során kimutattuk (Knoll és mtsai, 1965), hogy a reszerpin krónikusan (0,1 mg/kg, s.c./nap, 30 napig)



2. ábra Krónikus (7×1 mg/kg s. c.) (-)deprenil és klorgilin kezelés hatása patkányok tanulási és memóriatároló képességére. Csoportonként 20 állat.

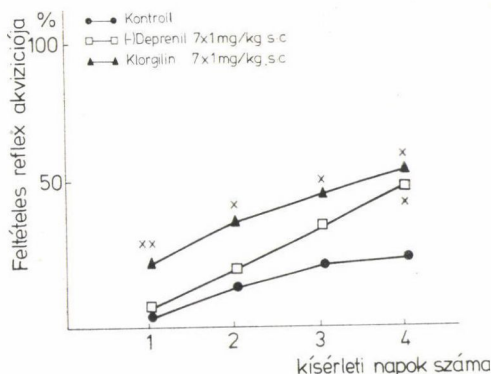
Módszer: Screening teszt II.

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$ Student t teszt 2 mintás

adagolva (24 órával az utolsó kezelés után vizsgálva) szignifikánsan csökkenti patkány egészséggy noradrenalin szintjét, és arra konkludáltunk, hogy a trankvilláns hatás nem kizárólagos függvénye a noradrenalin szint csökkenésnek, mert egyhetes, hasonló kezelés is ugyanígy csökkenti a noradrenalin szintet anélkül, hogy trankvilláns hatás létrejönne.

Ugyancsak ebben a munkánkban kimutattuk, hogy a módosított ugrásteresztén (Knoll és Knoll, 1964) — mely módszerünk alkalmas depresszív és anti-

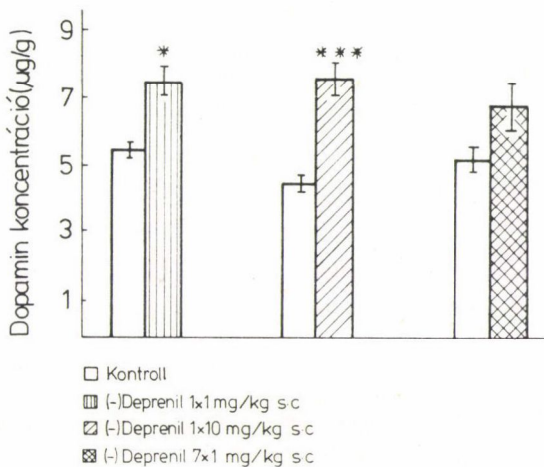


3. ábra Krónikus (-)deprenil (7×1 mg/kg s. c.) és klorgilin kezelés hatása patkányok „akvizíciós” képességére. Csoportonként 12 állat.

Módszer: Shuttle box

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$ Student t teszt 2 mintás

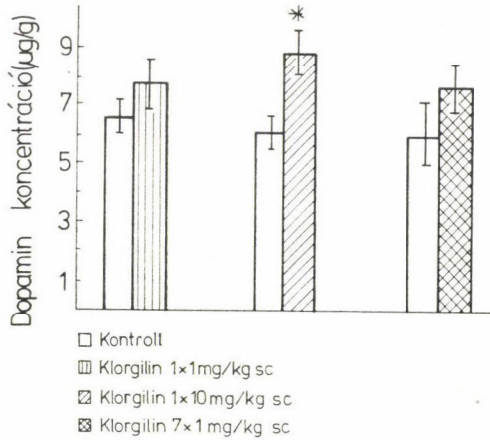


4. ábra Striatális dopamin szint változás ($\mu\text{g/g}$) akut (1 és 10 mg/kg s. c.) és krónikus (7×1 mg/kg s. c.) (-)deprenil kezelés után

N = 5

* $p < 0,05$

*** $p < 0,001$ Student t teszt 2 mintás



5. ábra Striatalis dopamin szint változás ($\mu\text{g/g}$) akut (1 és 10 mg/kg s. c.) és krónikus (7×1 mg/kg s. c.) klorgilin kezelés után.

N = 5

* $p < 0,05$ Student t teszt 2 mintás

depresszív vegyületek hatásának mérésére patkányon és egéren egyaránt — egerek menekülési (feltétlen elhárító reflexes) reakciója akut (5 mg/kg s.c.) reszerpinnel teljesen meggátolható, az állatok elpusztulnak. Ez a hatás MAO bénítóval (Nialamid 50 mg/kg s.c.) antagonizálható. Ezen adatok alapján arra a kérdésre kerestünk választ, hogy lehet-e a reszerpín gátló hatását Screening teszt II-es módszerünkkel is patkányon demonstrálni, és ha igen, MAO bénítóinkkal antagonizálni.

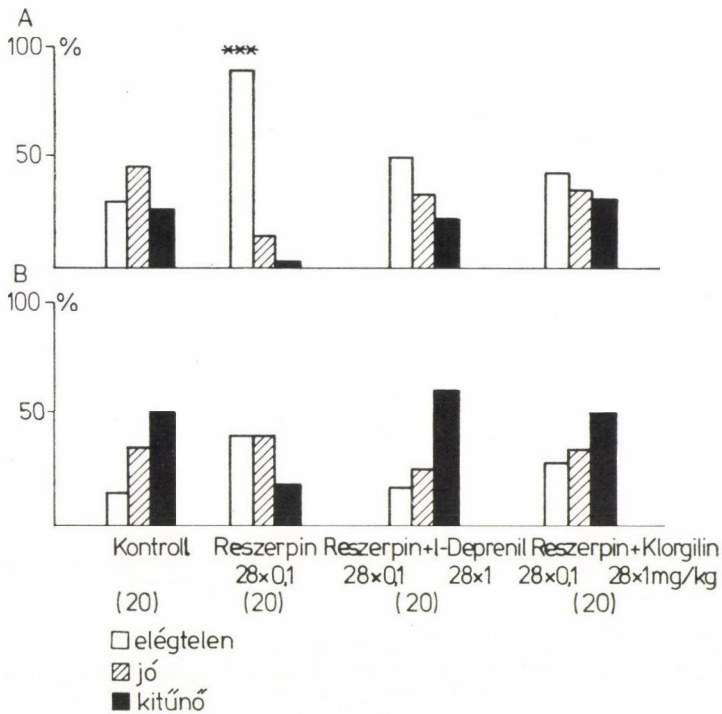
Három, egyenként 20 patkányból álló csoportot naponta az alábbi módon kezeltünk: 1. csoport: 0,1 mg/kg reszerpint kaptak szubkután naponta, 28 napon át; 2. csoport: 0,1 mg/kg reszerpint és 1 mg/kg deprenilt szubkután naponta, 28 napon át. 3. csoport: 0,1 mg/kg reszerpint és 1 mg/kg klorgilint szubkután naponta, 28 napon át.

Az állatok tanulási képességét mindhárom csoportnál 24 órával a kezelés befejezése után, majd egy hét múlva ismét a szokásos módon ellenőriztük. Az eredményeket a 6. ábra összegezi.

A krónikus reszerpín kezelés önmagában gátolta az állatok tanulását az első tanulásnál, a fiziológiás sóval ugyancsak 28 napig kezelt kontrollokhoz képest. Mindkét kombinációs kezelés ezt az erős gátlást antagonizálta, a (—) deprenillel és klorgilinnel való együttes kezelés után úgy tanultak az állatok, mint a kontroll csoport.

Egy héttel később a retenció ellenőrzésénél a csak reszerpinnel kezelt állatok viselkedése sem mutatott eltérést a többi csoporthoz képest.

Fenti kísérletekkel párhuzamosan vizsgáltuk a krónikus reszerpin kezelés hatását a striatális dopamin szint változására. E célból megismételtük a krónikus kezeléseket egyenként 5—5 patkányból álló csoportokon és 24 órával az egyhónapos kezelése befejezése után az állatokat dekapitáltuk és a dopamin szintet megmértük a corpus striatumban (7. ábra).

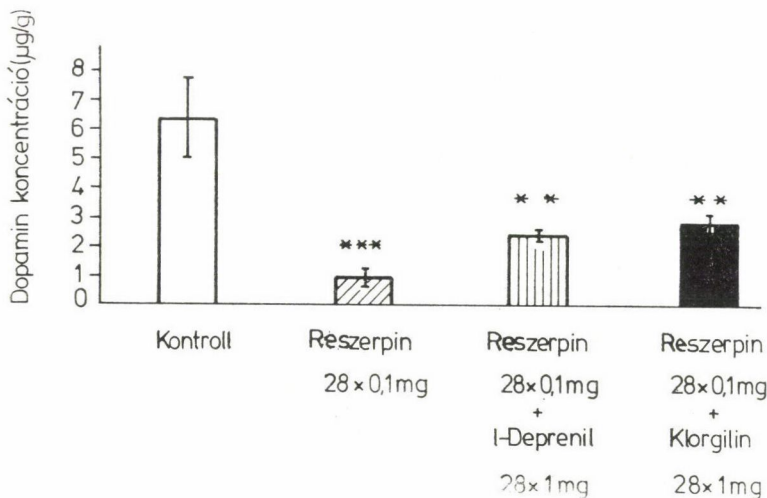


6. ábra Krónikus ($28 \times 0,1$ mg/kg s. c.) reszerpin, krónikus reszerpin + (-)deprenil (28×1 mg/kg s. c.) és krónikus reszerpin + klorgilin (28×1 mg/kg s. c.) hatása patkányok tanulási és memóriatároló képességére. Csoportonként 20 állat.

Módszer: Screening teszt II.

*** $p < 0,001$ fiziológiás konyhasóval ($28 \times 0,1$ ml/100 g) kezelt kontrollesoporthoz viszonyítva. Student t teszt 2 mintás

A tartós reszerpin kezelés önmagában nagymértékű dopaminszint csökkenést okozott a kontrollhoz képest. A MAO bénítókcal való együttes kezelés ugyanakkor a reszerpinhez viszonyítva, szignifikánsan emelte a dopamin szintet. Annak ellenére, hogy a MAO bénítókcal való együttes kezelés olyan dopaminszint emelkedést okozott, amely a fiziológiás sóval kezelt állatok normál dopamin szintjét nem érte el, a viselkedési vizsgálatoknál a fiziológiás sóval kezelt állatok viselkedésével megegyező eredményeket kaptunk (6. ábra).



7. ábra Striatalis dopaminszint változás (µg/g) krónikus rezzperin, krónikus rezzperin + (-)deprenil és krónikus rezzperin + klorgilin kezelés után.

N = 5

***p < 0,001 fiziológias sóval kezelt kontrollhoz képest

**p < 0,01 krónikus rezzperin kezeléshez viszonyítva Student t teszt 2 mintás

Megbeszélés

A kísérletek egyértelműen azt mutatják, hogy nincs szoros összefüggés a striatalis dopaminszint és a tanulás eredményessége között (lásd 1. és 5. ábra). Az egy héten át napi 1 mg/kg adagban alkalmazott klorgilin hatékonyabban stimulálta az akvizíciót a shuttle-boxban, mint a hasonló adagban adott (–)deprenil. Ez a különbség esetleg összefüggésben állhat azzal, hogy a patkánygyanban főleg A-típusú MAO van a neuronokban.

A rezzperin hatásának antagonizálhatósága mindkét MAO gátlóval (6. ábra) amellet szól, hogy a 28 napon át adott 1 mg/kg dózis már kumulatív módon mindkét enzim típus gátlásához vezetett.

A (–)deprenil és klorgilin kisebb, biztosan szelektív módon gátló dózisának (0,25 mg/kg) adagolásával elérhető hatások összehasonlítása csakúgy, mint a biogénamin szint mellett a „turn-over”-ek meghatározása adhat csak választ arra, hogy különböző módon lehet-e az A és B típusú MAO gátlásával a tanulási folyamatot befolyásolni, és ha igen, mi a különbség a biokémiai hatásmódban.

Összefoglalás

Screening teszt II-es módszerrel kiépíthető feltételes reflex kialakulását akut (1 és 10mg) (—)deprenyl és klogilin nem befolyásolta, krónikus kezelés (7×1 mg) szignifikáns emelkedést okozott a kontrollhoz viszonyítva. Krónikus kezelés ugyancsak fokozta a feltételes reflex akvizícióját shuttle-boxban. A biokémiai mérések azt mutatják, hogy nincs szoros összefüggés a striatalis dopaminszint és a tanulás eredményessége között.

IRODALOM

- Atack, C.*: Br. J. Pharmacol. **48**, 699 (1973).
Bovet, D., Bovet-Nitti, F., és Oliverie, A.: Psychopharmacologia **10**, 1 (1966).
Braestrup, C., Andersen, H. és Randrup, A.: Eur. J. Pharm. **34**, 181 (1975).
Ekstedt, B., Magyar, K. és Knoll, J.: Biochem. Pharm. **28**, 919 (1979).
Glowinski, J. és Iversen, L. L.: J. Neurochem. **13**, 655 (1966).
Johnston, J. P.: Biochem. Pharm. **12**, 1285 (1968).
Knoll, Berta: Orvostudomány, **27**, 59 (1976).
Knoll, Berta, Held, Györgyi és Gyarmati, Zsuzsa: Pol. J. Pharmacol. Pharm. **29**, 291 (1977).
Knoll, Berta, Timár, Júlia és Gyarmati, Zsuzsa: Orvostudomány, **29**, 277 (1978).
Knoll, J.: In: Monoamine oxidase and its inhibition. Ciba Found. Symp. 39 vol. Elsevier, Amsterdam, pp. 135–161, (1976).
Knoll, J.: In: Enzyme inhibitors as drugs. (Ed. M. Sandler), The Macmillan Press, London, pp. 151–171, (1980).
Knoll, J., Ecsery, Z., Nievel, J. G. és Knoll, B.: MTA V. Osztályközlemények, **15**, 231 (1964).
Knoll, J. és Knoll, B.: Arch. int. Pharmacodyn. **148**, 200 (1964).
Knoll, J., Vizi, E. S. és Somogyi, Gy.: Arzneimittel-Forsch. **18**, 109 (1968).
Knoll, J. és Magyar, K.: Adv. Biochem. Psychopharm. **5**, 393 (1972).
Knoll, J., Vizi, E. S., Knoll, Berta és Somogyi, Gy.: MTA V. Osztályközlemények, **16**, 227 (1965).
Sabelli, H. C. és Mosnaim, A. D.: Am. J. Psychiat., **131**, 695 (1974).