

ВЛИЯНИЕ НА ГАЛАНТАМИН ВЪРХУ ХОЛИНЕСТЕРАЗНАТА АКТИВНОСТ В ПЕРИФЕРНИ СТРУКТУРИ: АНАЛИТИЧНО ПРЕДСТАВЯНЕ НА РЕЛАЦИЯТА ЕНЗИМНА АКТИВНОСТ – МЕХАНИЧНА АКТИВНОСТ.

Райна Ардашева, Мариана Аргирова, Валентин Турийски, Атанас Кръстев
Медицински Университет, Фармацевтичен факултет, Пловдив, 4000, България
e-mail: valone@abv.bg

ABSTRACT

The primary aim of the study was quantitatively estimation of alterations of cholinesterase activity in peripheral smooth muscles provoked by galantamine. Adequate analytical presentation of results has been searched in attempt to illustrate causal effect between enzymatic activity and muscle contractility.

Enzymatic activity of smooth muscle homogeneities was measured spectrophotometrically by Ellman's method. Data from previously performed *ex vivo* experiments on smooth muscle contractility measurement were applied. Results were represented by means of parametric functions in entire investigated range. In order to achieve correct comparison of tendencies of two processes coefficient of Pearson was calculated. Value obtained suggested a maximal degree of coincidence.

Procedure performed gives opportunity causal effect related processes to be illustrated by numerical approximations.

Key word: *galantamine, enzymatic activity*

Въведение

Галантамин е природен продукт с доказан терапевтичен потенциал. Способността му да инхибира ацетилхолинестеразната (AChE) активност обуславя приложимостта му към различни таргетни биоструктури с холинергичен дефицит или при необходимост от потенциране на холинергичната ефективност [1]. Липсата на сигнификантни странични ефекти закономерно го наложи в експериментите ни като своеобразен маркер при оценката на качествата и класификацията на периферната активност на AChE инхибитори по отношение гладкомускулния (ГМ) контрактилитет.

Настоящите резултати представят някои количествени параметри, касаещи фармакологичната активност на галантамин върху изолирани ГМ от стомах на плъх.

Материали

В опитите бе работено с 50 половно-зрели мъжки плъха порода Wistar с тегло 250-320 g. Спазвани бяха изискванията за работа с експериментални животни според Directive 86/609/ЕЕС След декапитиране на плъховете циркулярни (12-15 mm дълги, 1.5 mm широки) ГМ-препарати бяха дисекцирани от корпуса на стомаха (gastric corpus), отделени без да се нарушава целостта на мукозата;

Субстанции, химикали, разтвори.

Бяха използвани следните лекарствени средства и химикали: galantamine, Tris, EDTA, N-етилмалеинимид, Triton X-100 и DTNB, (*Sigma-St. Louis, MO*); Acetylcholine (*Dispersa-Baeschlin, Germany*). Разтворът на Кребс бе със следното съдържание (mM) : NaCl – 120; KCl – 5.9; CaCl₂ – 2.5; Mg Cl₂ – 1.2; NaH₂PO₄ – 1.2; NaHCO – 15.4 и Glucose – 11.5 и pH = 7.4. Всички необходими за приготвянето му химикали бяха производство на Merck- *Darmstadt, Germany*.

Методи

Измерване на ензимна активност на тъканни хомогенати

Ацетилхолинестеразната ензимна активност бе измервана спектрофотометрично след хомогенизиране на предварително изготвените ГМ-препарати. Препаратите предварително биваха инкубирани за 40 мин в разтвор на Кребс в присъствие на съответната концентрация (10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} mol/l) галантамин. Контролните проби престояваха при същите условия, без добавка на лекарството. Препаратите бяха хомогенизирани в 10^{-2} M Tris-HCl буфер, съдържащ $5 \cdot 10^{-3}$ M EDTA и 10^{-3} M N-етилмалеинамид, 1 M NaCl и 1% Triton X-100 при съотношение тъкан (mg) : обем буфер (μ l) = 1:25. След центрофугиране супернатантата беше използвана по-нататък за определяне на ензимната активност. Активността на AChE беше определена спектрофотометрично по метода на Ellman чрез спектрофотометър Cary 1 (Varian, Australia). Специфичната активност на ензима беше изчислена като активността, намерена чрез фотометричните измервания, беше разделена на количеството тъкан (mg). Концентрацията на тъкан в хомогената беше 40 mg/ml. За всяко измерване беше използвано количество от 0.1 ml, което отговаря на 4 mg тъкан.

Регистрация на механична съкратителна активност

Съкратителната активност на изготвените препарати бе регистрирана изометрично: в единия край ГМ ивици бяха фиксирани към неподвижен стъклен държател, а в другия - към тензодетектори. Кребсовият разтвор (pH=7.4), миец гладкомускулните препарати, бе аериран с газова смес от 95% O₂ и 5% CO₂ при температура 36° C. Началното механично напрежение за препаратите, постигнато чрез обтягане, бе със стойност, отговаряща на сила на опън 7.5 mN. Спонтанната механична активност и лекарство-причинените отговори се отчитаха спрямо това ниво и бяха регистрирани чрез усилвателно стъпало и записани върху хартия с рекордер.

Статистическа обработка

Получените резултати са обработени статистически с помощта на специализиран програмен продукт STATISTICA. Чрез вариационен анализ са изчислени средна аритметична стойност на съответния показател (mean) и нейната грешка (SEM). Достоверността при сравняване е определена на база на t-теста на Стюдънт при степен на значимост 95% (P<0.05).

Апроксимации и корелационна оценка

При анализа на връзката между галантамин-провокираните съкратителни реакции на ГМ-препарати и степента на инхибиция на ацетилхолинестеразата бяха направени апроксимации с помощта на програмен продукт TableCurve 3.2. За целта в програмата бяха заложили стойности на тонуса на препаратите и на ацетилхолинестеразната активност, получени след третиране на препаратите с различни концентрации галантамин. Функциите описващи горните процеси бяха подложени на корелационна оценка. Използван бе критерий за съвпадение – коефициент на Pearson (PC).

Резултати

1. В концентрационен диапазон $1 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l галантамин инхибира AChE активност в изследваните ГМ в концентрация-зависим маниер. Изходната активност, измерена върху изолирани ГМ тъкани от контролната група плъхове е 7,09 U/mg. (фиг 1).
2. Аналитично представяне на ензимната инхибиция и контрактилните отговори в диапазона $1 \cdot 10^{-8}$ – $1 \cdot 10^{-4}$ mol/l. чрез числени апроксимации.
- 2а. Степента на ензимната инхибиция в ГМ проби, в зависимост от концентрацията на галантамин се описва с максимална точност чрез параметрична функция:
 $G(c)=a+b \cdot 0.5(1+\operatorname{erf}((c-h)/(20.5d)))$, (фиг 2а)

където : $a = -3.59$, $b = 66.41$, $h = 3.13$, $d = 2.32$ и $G(c)$ е процентната инхибиция на АСhЕ-активност, отчетена спрямо изходната стойност приета за 100%. Точността на апроксимацията е $r^2 = 0.99$.

2б. Промените в ГМ тонус на изолирани препарати (gastric corpus) [4] се описват с максимална точност чрез параметрична функция $F(c)$. $F(c) = a + b \cdot 0.5(1 + \operatorname{erf}((c-h)/(20.5d)))$, където $a = 1.93$, $b = 106.81$, $h = 4.45$, $d = 1.29$

Механичното напрежение (измервано в mN) е представено като процент от ефекта, предизвикан от 10^{-5} mol/l галантамин, (с е концентрацията на галантамин (mol/l)). Точността на апроксимацията е $r^2 = 0.996$. (фиг.3)

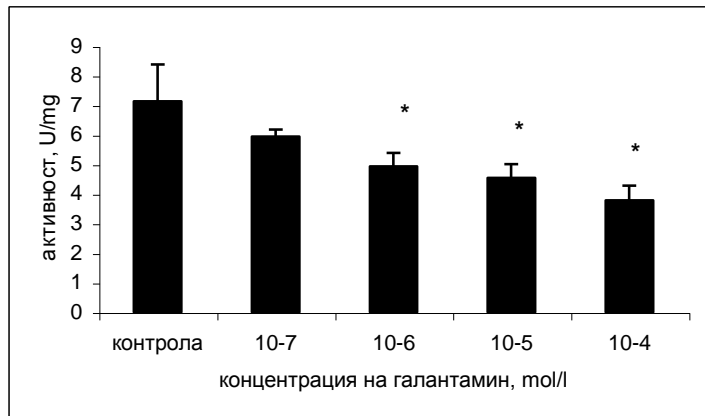
3. Корелационна оценка на тенденциите в развитието на процесите на ензимна инхибиция и съкратителната активност в ГМ.

Сравнението на функциите описващи анализирания процес показва съвпадение в тенденциите: коефициент на Pearson PC = +1.

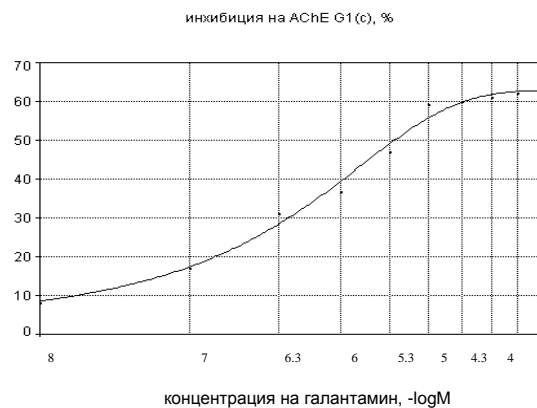
Обсъждане

Фокусът на приложение на галантамин е ЦНС [2], което неминуемо изисква паралелен анализ и на възможните периферните действия на препарата [3]. Изследванията ни показват концентрация-зависимост на инхибицията на АСhЕ в ГМ тъкани, изолирани от стомашно-чревния тракт на плъхове, като при терапевтично-съизмерими концентрации инхибицията достига 50%. Горните резултати са в унисон с установената концентрационна зависимост на тоничните ГМ отговори, наблюдавани след въздействие с галантамин в ex vivo условия на регистриране на съкратителната активност [4].

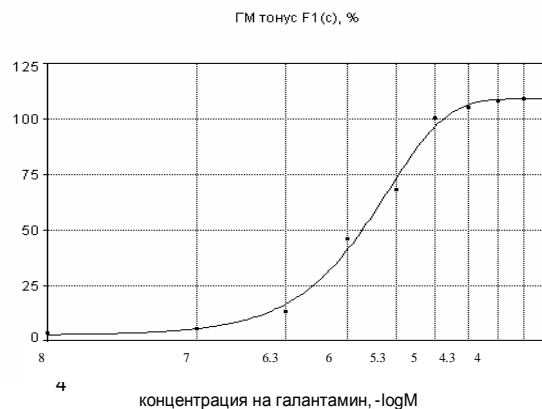
Наличието на достоверна причинно-следствена връзка между нивата на ензимна активност и ГМ контракции даде



Фиг.1. Концентрация-ефект зависимост на остатъчната специфична активност на АСhЕ в ГМ-тъкани проби от стомах на плъх при въздействие с галантамин. Сравнението е направено спрямо контролната активност. (*), $P < 0.05$ ($n = 12$ за всяка концентрация).



Фиг.2. Степен на инхибиране на ензимната активност представено чрез апроксимация като функции на концентрацията на галантамин ($n = 12$ за всяка концентрация)



Фиг.3. Тонично съкращение на изолирани ГМ, представено като функция на концентрацията на галантамин- $F(c)$ ($n = 12$ за всяка концентрация).

основание да потърсим възможност за коректно представяне на процесите чрез параметрични математически функции. Използваният модел позволява, от една страна да се илюстрира аналитично конкретна зависимост, а именно: концентрация на фармакологичен агент-физиологична реакция и концентрация-ензимна активност, от друга да се оцени корелацията между двата процеса - биохимичен и механичен. Степента на съвпадение в тенденциите на двата процеса, която бе изчислена чрез коефициент на Pearson има максимална стойност: $PC = +1$

Методът няма за цел да прогнозира резултати, а да описва евентуална общност в тенденциите на процесите в конкретен концентрационен диапазон, като по този начин се явява едно аналитично илюстративно допълнение към основните физиологични и фармакологични доказателства. Прилагането на гореописания модел към фармако-механични ефекти, предизвикани от други лекарствени субстанции и имащи прагов характер, позволи с добра точност описание и илюстрация на въпросните взаимовръзки [5]

Изводи

В диапазона 10^{-6} - 10^{-4} mol/l галантамин инхибира концентрация-зависимо AChE активност в ГМ от стомах на плъх.

Тенденциите в развитието на ензимната инхибиция и контрактилните реакции на ГМ препарати могат да се представят с висока точност чрез параметрични функции

Прилагането на корелационна оценка към моделните функции позволява да се илюстрира аналитично и графично поведението на два причинно-следствено свързани процеса. В случая- инхибирането на AChE и ГМ контракции.

Библиография

1. Coyle J, Kershaw P.(2001) Galantamine, a cholinesterase inhibitor that allosterically modulates nicotinic receptors: effects on the course of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry* 49:289–299.
2. Bickel U, Thomsen T, Fischer JP, Weber W, Kewitz H.(1991) Galanthamine: pharmacokinetics, tissue distribution and cholinesterase inhibition in brain of mice. *Neuropharmacology* 30:447–454
3. Svoboda Z, Kvetina J, Kunesová G, Herink J, Bajgar J, Bartosová L, Zivný P, Palicka V.(2006). Effect of galantamine on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in the presence of L-carnitine in rat selected brain and peripheral tissues. *Neuro Endocrinol Lett.*;27 Suppl 2:183-6.
4. Turiiski V, Krustev A, Sirakov V, Getova D. (2004). In vivo and in vitro study of the influence of the anticholinesterase drug galantamine on motor and evacuative functions of rat gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharmacol.*, 498: 233-239
5. Turiiski V, Argirova M, Krastev A. (2005). Non-anticholinesterase, non-cholinergic effect of tacrine on gastrointestinal smooth muscle tissues of rat. *Folia Medica*, 2: 45-52