

Arh. hig. rada, 20 (1969) 161.

UČINAK POVEĆANE KOLIČINE HISTAMINA U TKIVU MIŠA NA AKUTNU TOKSIČNOST BOTULINUS TOKSINA

J. BORAS, P. STERN

Farmakološki institut Medicinskog fakulteta, Sarajevo

(Primljeno 19. VI 1968)

Polazeći od činjenice da histamin senzibilizira tkiva za acetilkolin, autori su pokušali iskoristiti taj fenomen i pri trovanju miševa sa botulinus toksinom A. Ovaj toksin sprečava oslobađanje acetilkolina na završecima motornih nerava. Pokazalo se da aminogvanidin, inhibitor diaminooksidaze, koja razara histamin na periferiji, signifikantno produžuje život miševa otrovanih botulinus toksinom. CuCl_2 , inhibitor imidazol-N-metil-transferaze, koja razara histamin u CNS, nema nikakvog učinka.

Proces intoksikacije sa botulinus toksinom (BT) tumači se spriječenim oslobađanjem acetilkolina (Ach) na završecima motornih nerava (1). Zato smo postavili pitanje neće li povećanje histamina (H) na periferiji, dakle izvan centralnog nervnog sistema (CNS), oslabiti toksično djelovanje BT. U literaturi ima već dosta podataka o tome da povišenje H na periferiji, pojačava efekat Ach. H npr. pojačava kontrakcije ledne muskulature pijavice nakon primjene Ach (2). Kada se poprečno-prugasti mišić osiromaši histaminom, slabije će reagirati na dodatak Ach (3). To isto vrijedi i za žablje srce (4). H pojačava i sekreciju slinovnica nakon primjene pilokarpina (5).

U ovom radu pokušali smo povećanjem endogenog i egzogenog H povećati osjetljivost za Ach tkiva mišića otrovanih sa BT. Moramo pretpostaviti da se određene količine Ach oslobađaju tako dugo dok miš živi, pa bi, ukoliko je naša pretpostavka o senzibilizaciji sa H tačna, porast osjetljivosti tkiva za Ach morao popraviti kliničku sliku otrovanja. Na

* Kratko referirano na I jugoslavenskom simpozijumu medicinske toksikologije, Baška Voda, juni 1968.

periferiji H razara diaminooksidaza (6) (DO) za razliku od CNS, gdje se H inaktivira metiliziranjem pomoću imidazol-N-metiltransferaze (IMT) (7). Za inaktiviranje DO poslužili smo se aminogvanidinom, najjačim inhibitorom ovog fermenta *in vivo* (8, 19) i *in vitro* (9, 10).

METODIKA

Model za ispitivanje zaštitnog učinka aminogvanidina bio je albino miš otrovan s. c. sa BT-A*. Svaka pokusna i kontrolna grupa imala je po 20 životinja oba spola, prosječne tjelesne težine od 20–25 g. Vodene otopine istraživanih supstancija aplicirane su miševima pokusne grupe 10–15 min. poslije aplikacije BT i dalje davane sve do uginuća životinja. U nekim eksperimentima aminogvanidin je apliciran 24–48 sati prije BT. Kontrolne grupe primale su samo BT. Doza BT bila je takva da su životinje kontrolne grupe uginule u roku od 48 ± 6 sati nakon aplikacije. Miševi su konstantno držani pod istim uvjetima ishrane i u prostorijama sa konstantnom temperaturom od 22° C, budući da smo kod životinja opazili opadanje tjelesne temperature. Aminogvanidin davan je u formi hidrokarbonata. Vrijeme preživljavanja otrovanih miševa izrazili smo u danima uz odgovarajuću statističku obradu.

REZULTATI

Kao što se vidi, aminogvanidin apliciran u dozi od 25 mg/kg i 100 mg/kg 15 min. prije BT je bez učinka. Doza aminogvanidina od 100 mg/kg, injicirana 25 sata ranije, značajno produžuje život miševa zatrovanih sa BT. Međutim jednokratna doza od 100 mg/kg AG, kada se daje 48 sati ranije, nema učinka. Primjena aminogvanidina sa CuCl_2 , inhibitorom IMT, kao i CuCl_2 samog, također nema učinka, CuCl_2 u dozi od 10 mg/kg dobro inhibira IMT (12). Isto je tako i nakon primjene H pa aminogvanidina sa H te oksotremorina i AG sa oksotremorinom. Oksotremorin smo istraživali zato što povisuje Ach a ne inhibira kolinesterazu (13). Na kraju, bez učinka je i armin(etil-*p*-nitrofeniletifosfonat), inhibitor kolinesteraze, bez obzira da li se daje sâm ili u kombinaciji sa AG.

DISKUSIJA

Rezultati pokusa potvrdili su našu pretpostavku da periferno povišenje H dovodi do produženja života otrovanih miševa. Ovu pojavu mogli bismo tumačiti nagomilavanjem endogenog H na završecima motornih nerava. Primjena H samog, dakle egzogenog, ne dovodi do tog učinka.

* Firmi Boehringer, Marburg/Lahn, zahvaljujemo za pošiljku BT-A.

Postavlja se pitanje da li egzogeno unesen H može uopće doprijeti na mjesto gdje djeluje endogeni H. Da se zaista radi o senzibilizaciji tkiva za Ach, mogli smo pokazati na slijedeći način: kada se mišu injicira i. v. 125 mg/kg Ach, dolazi do kratkotrajnog kolapsa koji se brzo gubi. Ako takvom mišu damo prethodno aminogvanidin, dolazi do izrazitog statičkog tremora, a dijelom i do konvulzija.

Osim AG upotrijebili smo još neke inhibitore DO: serpentin (5 mg/kg), dimcdon (10 mg/kg), tiosemikarbazid (20 mg/kg), semikarbazid (20 mg/kg) te izoniazid (20 mg/kg), ali sve ove supstancije bile su bez učinka. To

Tablica 1.

Supstancija	Doza (mg/kg) i način aplikacije	Prosječno ugibanje u danima		Signifi- kantna razlika P
		Supstancija + BT (\pm SE-n)*	BT (\pm SE-n)*	
aminogvanidin	1 \times 25 i. p.	1,9(\pm 0,100-20)	1,6(\pm 0,163-20)	> 0,3
aminogvanidin	1 \times 100 i. p.	2,2(\pm 0,707-20)	2,1(\pm 0,169-20)	> 0,5
aminogvanidin	1 \times 100 i. p. 24h prije BT	2,3(\pm 0,152-20)	1,4(\pm 0,124-20)	< 0,01
aminogvanidin	2 \times 100 i. p. 24h prije BT	2,2(\pm 0,276-20)	2,1(\pm 0,169-20)	> 0,5
aminogvanidin	1 \times 100 i. p. 48h prije BT	2,4(\pm 0,163-20)	2,1(\pm 0,152-20)	> 0,1
CuCl ₂	1 \times 10 i. p.	2,1(\pm 0,152-20)	1,9(\pm 0,145-20)	> 0,5
aminogvanidin + CuCl ₂	1 \times 100 i. p. 1 \times 10 i. p.	1,9(\pm 0,152-20)	1,7(\pm 0,145-20)	> 0,8
histamin	1 \times 25 i. p.	2,2(\pm 0,213-20)	2,1(\pm 0,163-20)	> 0,8
aminogvanidin + histamin	1 \times 100 i. p. 1 \times 25 i. p.	2,4(\pm 0,220-20)	2,3(\pm 0,169-20)	> 0,4
histidin	1 \times 100 i. p. 60' prije BT	1,9(\pm 0,182-20)	1,8(\pm 0,124-20)	> 0,5
aminogvanidin + histidin	1 \times 100 i. p. 1 \times 100 i. p. 60' prije BT	2,2(\pm 0,276-20)	2,1(\pm 0,042-20)	> 0,5
armin ¹ / ₄ LD ₅₀	1 \times 0,12 s. c.	2,1(\pm 0,179-20)	2,1(\pm 0,179-20)	> 0,8
aminogvanidin + armin ¹ / ₄ LD ₅₀	1 \times 100 i. p. 1 \times 0,12 s. c.	2,0(\pm 0,105-20)	1,8(\pm 0,133-20)	> 0,1
oksotremorin	1 \times 0,5 i. p.	2,1(\pm 0,175-20)	2,0(\pm 0,105-20)	> 0,5
aminogvanidin + oksotremorin	1 \times 100 i. p. 1 \times 0,5 i. p.	2,2(\pm 0,169-20)	2,1(\pm 0,145-20)	> 0,5

* SE = standardna greška srednje vrijednosti

n = broj eksperimentalnih životinja

p = vjerojatnost za slučajnu razliku.

je donekle razumljivo kada se zna da je AG za sada najjači inhibitor DO (8, 11, 14).

Budući da se radi o procesu izvan CNS-a, vjerojatno se taj proces odigrava na receptoru za Ach u motornoj ploči, pa i one male količine Ach što se još uvijek oslobađaju dok životinja živi, podražuju bolje receptor. Isto tako se može pretpostaviti da H barem dijelom uklanja inhibiciju oslobađanja Ach.

Posebno želimo istaknuti da H nije djelovao na Renshaw stanice, kako je to pokazao *Eccles* (15). Podražaj Renshaw stanica morao bi prema našem mišljenju potencirati toksičnost BT (16), no u našim pokusima CuCl_2 nije imao nikakvog učinka. Na Renshaw stanice H i BT trebalo se osvrnuti budući da jedan ogranak motoneurona – iako pripada centralnom nervnom sistemu a ne periferiji – oslobađa Ach primajući impuls od α -motorne stanice u istom momentu kad i završeci motornih nerava, gdje je mjesto djelovanja BT (17).

Poznato je da H inhibira kolinesterazu, ali vrlo slabo (17). Djelovanje H na produženje života miševa ne možemo pripisati učinku na kolinesterazu, jer i mnogo jači inhibitor, armin, nema nikakvog djelovanja.

Napominjemo da smo već ranije uspjeli nekim trunkvilantima što izazivaju rigor [flufenazin, trifluperazin, haloperidol (18, 19), tricianoaminopropen (20)] produžiti život miševa otrovanih sa BT, ali taj mehanizam je centralnog porijekla i posve različit od učinka AG.

ZAKLJUČAK

Povećana količina histamina u tkivima izazvana pomoću aminogvanidina, inhibitora diaminooksidaze, signifikantno produžuje život miševa otrovanih botulinus toksinom.

LITERATURA

1. *Wright, G. P.*: Pharmacol. Rev., 7 (1955) 413.
2. *Bayer, W., Wenzel, T.*: Arch. exper. Path. Pharmacol., 172 (1936) 533.
3. *Somjen, G., Uyldeert, I. E.*: Brit. J. Pharmacol., 10 (1955) 431.
4. *Szaba, B., Szilágyi, T., Kövér, A., Csongeor, J.*: Acta physiol. acad. Sc. Hung., 23 (1963) 397.
5. *Werle, E., Lorenz, W.*: Arch. int. Pharmacodyn., 161 (1966) 477.
6. *Snyder, S. H., Axelrod, J.*: Fed. Proc., 24 (1965) 774.
7. *White, T.*: Disertation, Lund, 1961.
8. *Roberts, M.*: J. Endocrin., 11 (1954) 338.
9. *Zeller, E.*, u: CIBA Foundation Symposium on Histamine, Little, Brown u. Co., Boston, 1956, str. 339.
10. *Zeller, E., Barsley, J., Fouts, J., Kirhenheimer, W., van Orden, L.*: Experientia 8 (1952) 349.

11. Schayer, R., Wu, K., Smiley, R.: Am. J. Physiol., 179 (1954) 481.
12. Stern, P.: Wien. klin. Wschr., 80 (1968) 181.
13. Holmstedt, B., Lundgren, G., in: Mechanisms of Release of Biogenic Amines 439, Pergamon Press, New York, London, Paris, (1965).
14. Angelakos, E. T., Loew, E. R.: Arch. int. Pharmacodyn., 117 (1958) 277.
15. Eccles, J. C., u: Proceedings of the First International Pharmacological Meeting, Pergamon Press, Oxford, 1962, str. 157.
16. Stern, P.: u pripremi za štampu.
17. Haas, H.: Histamine und Antihistamine, Cantor, Aulendorf, 1951.
18. Stern, P., Boras, J.: Proc. of the European Society for the Study of Drug Toxicity Ics, 9 (1968) 189.
19. Boras, J., Stern, P.: Iug. Physiol. et Pharmacol. Acta, 3 (1967) 225.
20. Stern, P., Boras, J.: Toxicon, 5 (1968) 187.

Summary

THE EFFECT OF INCREASED HISTAMINE CONTENT IN THE MOUSE TISSUE ON ACUTE TOXICITY OF BOTULINUS TOXIN

It is known that histamine is capable of inducing tissue sensitization to acetylcholine. The phenomenon has been used in the poisoning of mice with Botulinus Toxin Type A. This toxin prevents the liberation of acetylcholine on motor nerve ends. It was shown that aminoguanidine – the inhibitor of diaminoxidase which destroys histamine in the periphery, significantly prolongs the life of mice poisoned with Botulinus Toxin. CuCl_2 – the inhibitor of imidazol-N-methyl-transferase enzyme which destroys histamine in the central nervous system, has shown no effect.

*Institute of Pharmacology,
Medical Faculty, Sarajevo*

*Received for publication
June 19, 1968.*



NOVO

GEOKORTON[®] SPRAY

Po svome sastavu GEOKORTON spray djeluje dvojako: sprečava ili liječi infekciju (oksi-tetraciklin) i djeluje protuupalno na procese na koži (hidrokortizon). Zbog toga se vrlo uspješno primjenjuje kod: primarno i sekundarno inficiranih dermatitoza; raznih dermatoza alergijske ili druge etiologije koje su sklone infekcijama zbog popratnog pruritusa; kod kontaktnih dermatitisa izazvanih biljkama, lijekovima, detergentima, odjećom, kemikalijama; kod nespecifičnog pruritusa ani, vulvae, scroti; kod ulcera cruris; dekubitusa; opeklina.

Pakovan je u bočici od 50 ml

GEOKORTON spray ima velike prednosti zbog načina aplikacije koji omogućuje brzo i efikasno liječenje. Neposredno raspršivanje lijeka onemogućuje mehaničko nadraživanje kože, čime se izbjegava i mogućnost sekundarnog inficiranja rana.