
Vanja Radišić

Sinergistički uticaj valproinske kiseline i glicina na sadržaj gama-aminobuterne kiseline u mozgu laboratorijskog pacova (Wistar rat)

Ispitan je sinergistički uticaj valproinske kiseline (VPA) i glicina na koncentraciju gama-aminobuterne kiseline (GABA) u mozgu laboratorijskog pacova (Wistar rat). U eksperimentu je 9 životinja podeljeno u tri grupe od kojih je jedna bila kontrolna. Koncentracije GABA-e u mozgu pacova tretiranih VPA-om i glicinom upoređena je sa koncentracijom GABA-e u mozgu pacova tretiranih samo VPA-om i netretiranih pacova. Koncentracija GABA-e određena je HPLC analizom homogenata mozгова. Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon tretmana došlo do povećanja koncentracije GABA-e. Veći porast koncentracije ovog neurotransmitera primećen je kod životinja tretiranih VPA-om i glicinom nego kod onih tretiranih samo VPA-om. Utvrđeno je da je sadržaj GABA-e u mozgu pacova tretiranih VPA-om 10 puta veći nego kod netretiranih pacova, a kod onih tretiranih obema supstancama sadržaj je povećan 17 puta.

Uvod

Valproinska kiselina (VPA), sintetička razgranata masna kiselina, je efikasan i često upotrebljavan lek u tretmanu epilepsije i bipolarnog poremećaja (Rogiers *et al.* 1995). Mehanizam delovanja valproata zasniva se na povećanju koncentracije inhibitornog neurotransmitera gama-aminobuterne kiseline (GABA-e) koje nastaje

usled inhibicije GABA-transaminaze ovim jedi-njenjem. Osim toga, valproinska kiselina blokira voltažno zavisne kanale za natrijum i voltažno zavisne kanale za kalcijum T tipa, što je čini često korišćenim antikonvulzivom. Danas su komercijalno dostupne različite varijante valproata, od kojih je jedan i EFTIL, koji je korišćen u ovom istraživanju. U EFTIL-u se uz valproinsku kiselinu koristi i njena natrijumova so. Valproinska kiselina se u tretmanima primanjuje kao jedini lek ili uz dopunu drugim lekovima sličnih svojstava.

Ranija istraživanja su pokazala da sistemsko tretiranje laboratorijskih životinja amino kiselinama koje imaju svojstva inhibitornih neurotransmitera (pre svega glicinom) izazivaju značajno povećanje njihove koncentracije u mozgi (Toth i Lajtha 1981). Glicin u dozama od 10 mmol/kg ili većim pokazao se kao dobar antikonvulziv (Curtis *et al.* 1971). Istraživanje koje su sproveli Seiler i Sarhan 1984. godine pokazuje da glicin u sinergiji sa inhibitorima GABA-transaminaze izaziva značajno povećanje u količini GABA-e u mozgu životinja.

Na osnovu toga što se valproinska kiselina ponaša kao inhibitor GABA-transaminaze, a glicin u sinergiji sa inhibitorima ovog enzima izaziva povećanje sadržaja GABA-e u mozgu, pretpostavljeno je da će valproinska kiselina uz koju je kao dopunsko sredstvo korišćen glicin, izazvati značajnije povećanje sadržaja ovog neurotransmitera od samostalno korišćene valproinske kiseline.

Vanja Radišić (1995), Arilje, Dragojla Stojića 2, učenica 3. razreda Srednje škole „Sveti Ahilje” u Arilju

MENTORI:

Aleksandar Đurić, student Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Luka Mihajlović, diplomirani biohemičar, Katedra za biohemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Materijal i metode

U istraživanju je korišćen lek EFTIL (Zorka, Šabac) koji u jednoj tableti sadrži 333 mg valproinske kiseline i 145 mg natrijum valproata i glicin.

Formiranje grupa pacova i njihovo tretiranje

Za eksperiment je korišćeno 9 muških albino pacova (Wistar rat) mase između 250 i 350 g. Hrana i voda su davane *ad limitum*. Pacovi su podeljeni u tri grupe od po 3 jedinke. Prva grupa je tretirana valproinskom kiselinom, druga valproinskom kiselinom i glicinom, dok je treća grupa bila kontrolna. Tretman životinja trajao je tri dana. Obe supstance su davane oralno, jednom dnevno između 21 i 22 h. Doza valproata je povećavana u toku trajanja tretmana, pa je prvog dana iznosila 150 mg/kg, drugog 300 mg/kg, a trećeg 600 mg/kg, preračunato na masu EFTIL-a. Doza glicina se nije menjala i iznosila je 10 mmol/kg. Glicin i valproat su životinjama davani oralno, u vidu tableta, koje su pravljene od spršenih tableta EFTIL-a i glicina, pomešanih sa pomešanih sa komercijalnom kakao tablom, kako bi bila dobijena konzistentna smeša. Kontrolna grupa pacova tretirana je komercijalnom kakao tablom, bez lekova, oblikovanom na isti način kao i za grupu koja je primala lek.

Žrtvovanje životinja

Nakon trodnevnog tretmana, životnje su žrtvovane po grupama. Svaka životinja je anestezirana etrom i dekapitovana. Dekapitovanoj životinji disekovan je mozak koji je zatim homogenizovan u 2 mL 80% etanola. Dobijeni homogenati su centrifugirani 15 minuta na 13 500 G. Nakon centrifugiranja, supernatant je dekantovan i čuvan na -80°C do početka daljih analiza.

Određivanje sadržaja GABA-e u homogenatu mozga

Sadržaj GABA-e u homogenatu mozga određen je HPLC analizom. Iz spektra dobijenih hromatografijom, izvojeni su joni srednje molarne mase 104 g/mol i upoređena njihova retenciona vremena.

Rezultati

U tabeli 1 prikazane su srednje retenciono vreme i površina ispod pikova dobijenih HPLC analizom homogenata mozгова. Na osnovu iste vrednosti retencionog vremena jona mase 104 g/molu u različitim uzorcima, pretpostavljeno je da se radi o GABA-i. Najveća površina ispod pika predstavlja najveću koncentraciju ovog neurotransmitera u uzorku. Najmanja koncentracija GABA-e izmerena je u netretiranim životinjama, dok je najveća zabeležena u životinjama tretiranim i valproinskom kiselinom i glicinom. Koncentracija GABA-e u mozgu pacova se povećala 17 puta nakon tretmana glicinom i VPA-om, dok je nakon tretiranja samo VPA-om povećanje bilo 10 puta.

Tabela 1. Retenciono vreme i površina GABA pikova iz uzoraka dobijenih HPLC-om

Uzorak	Retenciono vreme	Površina pika
Kontrolna grupa	1.8±0.1	23 000±1000
VPA	1.8±0.1	247 000±700
VPA+glicin	1.8±0.1	393 900±500

Diskusija

Farmakologijom i mogućim mehanizmima delovanja valproinske kiseline bavila su se mnoga istraživanja rađena tokom poslednje decenije (Johannessen *et al.* 2000; Löscher 1999). Pokazalo se da ovaj lek ima različite efekte kako na sintezu GABA-e, tako i na njene receptore. Brojne studije su pokazale da VPA, čak i u malim dozama, veoma brzo dovodi do značajnog povećanja sadržaja ovog neurotransmitera u nervnom tkivu smanjujući njegovu degradaciju inhibiranjem GABA transaminaze (Löscher 1993; Larsson *et al.* 2004) ili povećavajući njegovu sintezu aktiviranjem dekarboksilaze glutaminske kiseline (Löscher 1981; Wikinski *et al.* 1996). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju u skladu su sa ranije dobijenim rezultatima, jer se pokazalo da je koncentracija GABA-e u mozgu pacova tretiranih VPA znatno veća od koncentracije GABA-e u mozgu netretiranih životinja.

Mehanizam delovanja glicina kao inhibitornog neurotransmitera zasniva se na njegovom vezivanju za ligand zavisne jonske kanale za Cl^- . Vezujući se za jonske kanale, glicin čini membranu permeabilnijom za jone hlora što dovodi do hiperpolarizacije i smanjuje mogućnost nastanka akcinog potencijala. U skladu sa ranijim istraživanjima (Seiler i Sarhan 1984), naši rezultati takođe pokazuju da sinergija glicina i VPA izaziva značajno povećanje GABA koncentracije, ne samo u odnosu na koncentraciju GABA-e u netretiranim životinjama, već i u odnosu na koncentraciju GABA-e u životinjama tretiranim samo VPA.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da VPA u sinergiji sa glicinom izaziva značajnije povećanje koncentracije GABA-e u mozgu pacova od samostalno korišćene VPA. Mehanizam delovanja glicina na povećanje koncentracije GABA-e nije ispitan i mogao bi biti predmet budućih istraživanja.

Literatura

Curtis W. R., Duggan A. W., Johnston G. A. R. 1971. The specificity of strychnine as a glycine antagonist in the mammalian spinal cord. *Exp. Brain. Res.*, 12: 547.

Johannessen J. O., McGlashan T. H., Larsen T. K. 2000. Early detection strategies for untreated first-episode psychosis. *Schizophrenia Research*, 51: 39.

Larsson K. H., Larsson E., Koljalg U. 2004. High phylogenetic diversity among corticoid homobasidiomycetes. *Mycological Research*, 108: 983.

Löscher W. 1981. Valproate induced changes in GABA metabolism at the subcellular level. *Biochemical Pharmacology*, 30: 1364.

Löscher W. 1993. GABA in plasma and cerebrospinal fluid of different species. Effects of γ -acetylenic GABA, γ -vinyl GABA and sodium valproate. *Journal of Neurochemistry*, 32: 1587.

Löscher W. 1999. 3-Mercaptopropionic acid: convulsant properties, effects on enzymes of the γ -aminobutyrate system in mouse brain and antagonism by certain anticonvulsant drugs, aminoxyacetic acid and gabaculine. *Biochemical Pharmacology*, 28: 1397.

Rogiers V., Akrawi M., Vercruyse A., Phillips I. R., Shephard E. A. 1995. Effects of the anticonvulsant, valproate, on the expression of components of the cytochrome-P-450-mediated monooxygenase system and glutathione S-transferases. *European Journal of Biochemistry*, 231: 337.

Seiler N., Sarhan S. 1984. Synergistic anticonvulsant effects of GABA-T inhibitors and glycine. *Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 326 (1): 49.

Toth E., Lajtha A. 1981. Elevation of cerebral levels of nonessential amino acid *in vivo* by administration of large doses. *Neurochemical Research*, 6: 1309.

Wikinski S. I., Acosta G. B., Rubio M. C. 1996. Valproic acid differs in its *in vitro* effect on glutamic acid decarboxylase activity in neonatal and adult rat brain. *Genetical Pharmacology*, 27: 635.

Vanja Radišić

Synergistic Effect of Glycine and Valproic Acid on GABA Content in Rat Brain (Wistar rat)

Synergistic influence of valproic acid (VPA) and glycine on GABA content in rat brain was investigated. Nine albino rats (Wistar rat) were divided into groups of three. The first group was treated with VPA and glycine, the second only with VPA, and the third was the control group. GABA content was determined by HPLC analysis of the rat brains' homogenates. The results showed that the treatment of animals caused increase of GABA content in the brain. A higher level of increase was noticed after the treatment of animals with both VPA and glycine than only with VPA. After the treatment with VPA, GABA content increased 10 times, and after the treatment with VPA and glycine it increased 17 times. 