

Konstanty Wiśniewski, Maria Borawska

WPLYW ANG.II I JEJ FRAGMENTÓW NA POALKOHOLOWE USZKODZENIE PROCESÓW UCZENIA SIĘ I PAMIĘCI

Podstawowa funkcja mózgu polegająca na gromadzeniu, selekcjonowaniu, integrowaniu i przesyłaniu informacji od wielu lat jest przedmiotem intensywnych badań. Uzyskane wyniki pozwalają obecnie zrozumieć niektóre aspekty procesu uczenia się i pamięci oraz przyczyn ich zaburzeń w stanach patologicznych.

Obecnie akceptowana jest hipoteza, że impulsy nerwowe są przekazywane z jednego neuronu do drugiego (lub innej komórki efektorowej) przez substancje chemiczne uwalniane w synapsach. Znamy dziś wiele biologicznie aktywnych substancji, które występują w OUN i biorą udział w przekazywaniu informacji /43, 4, 14, 19, 32, 17/.

Wśród biologicznie aktywnych substancji dominującą grupę stanowią peptydy /43,4,17,32/. W ostatnim dziesięcioleciu obserwuje się wręcz eksplozję badań nad peptydami ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Zidentyfikowano ponad 100 bardzo aktywnych peptydów (hormonów, neuropeptydów) w OUN. Określono ich właściwości farmakologiczne oraz rolę niektórych peptydów w stanach patologicznych OUN. Wykazano, że wiele klasycznych hormonów peptydowych (hormony przysadki, podwzgórza) wykazują działanie pozahormonalne na OUN /43,14,32,26,27,40,41/. Stwierdzono, że w wielu neuronach występują równocześnie neurotransmitter (DA, ACh) i neuropeptyd i zachodzi między nimi czynnościowa interakcja /43,35/. Wykazano ponadto, że niektóre peptydy (neuropeptydy) posiadają wybitnie silne właściwości biologiczne. Neuropeptydy wydzielane są do przestrzeni synaptycznej w 1000 krotnie mniejszych ilościach niż klasyczne neuromediatory (DA, ACh) i mimo to aktywują receptory /43,26,27/.

Uwzględniając powyższe, należy sądzić, że neuropeptydy w istotny sposób mogą wpływać na aktywność OUN.

Wykazano, że neuropeptydy wywierają znaczny wpływ na proces uczenia się i pamięci. Stwierdzono, że takie peptydy jak: ACTH i jego fragmenty, wazopresyna, oxytocyna, substancja P, TRH, CCK i endogenne opioidy wpływają na proces uczenia się i pamięci /42,25,33,34,37,2/. Są to tylko przykłady peptydów o dobrze udokumentowanym profilu działania. Należy przypuszczać, że inne neuropeptydy spośród 100 wyizolowanych z tkanki nerwowej mogą mieć podobny znaczący wpływ na wyższe funkcje mózgu.

Angiotensyna II (Ang.II) jest znanym peptydem od dawna i znane są jej klasyczne aktywności biologiczne. Peptyd ten podwyższa ciśnienie krwi, zwiększa pragnienie, zwiększa wydzielanie ACTA i wazoprezyny. W poprzednich naszych eksperymentach wykazaliśmy, że Ang.II przyspiesza proces nabywania warunkowych odruchów unikania i przedłuża wygasanie odruchów /3/. Antagonista receptora Ang.II - Salarazyna znosiła klasyczne efekty działania Ang.II (wzrost ciśnienia krwi, wzrost pragnienia) nie miała jednak wpływu na jej działanie behavioralne. Zastosowana nawet sama Salarazyna wywierała podobne do Ang.II działanie ośrodkowe /3,5,38/. Salarazyna - ośmio aminokwasowy - peptyd różni się od Ang.II /1-8/ tylko pierwszym i ósmym aminokwasem.

Experymenty powyższe wykazały, że Ang.II wpływa na proces uczenia się i pamięci. Jest to zatem nowa aktywność tego peptydu. To działanie nie zależy od związania się Ang.II z własnym receptorem. Pierwszy i ósmy aminokwas nie jest niezbędny do ośrodkowego działania Ang.II.

Powstało pytanie jaka sekwencja aminokwasów w cząsteczce Ang.II jest odpowiedzialną za jej efekty ośrodkowe ?

Aby odpowiedzieć na to pytanie, w dalszych badaniach stosowano fragmenty cząsteczki Ang.II zsyntetyzowane przez Profesora Kupryszewskiego (Uniwersytet Gdański) i dr Koziolkiewicza (Akademia Medyczna Łódź). Każdy fragment był pozbawiony o jeden następny aminokwas. Do doświadczeń używano: Ang.II₁₋₈, Ang.III₂₋₈, Ang.IV₃₋₈, Ang.V₄₋₈, Ang.VI₃₋₇, /6,7,8,39/. Podsumowanie uzyskanych wyników przedstawia tabela 1.

Stwierdzono przede wszystkim, że tylko Ang.II i minimalnie Ang.III - podwyższały ciśnienie krwi i zwiększały pragnienie (klasyczne efekty). Ang.IV, V i VI - nie wywoływały tych efektów. Ang.IV i VI podobnie jak Ang.II wywierały działanie na ośrodkowy układ nerwowy, zwiększając znacznie proces uczenia się i pamięci. Tylko Ang.V posiadała znacznie słabsze działanie ośrodkowe. Fragment ten pozbawiony był trzeciego aminokwasu - Valiny, który jak się okazało jest niezbędny do działania ośrodkowego fragmentów Ang.II. Można zatem stwierdzić, że za ośrodkowe działanie (uczenie się i pamięć) Ang.II odpowiedzialny jest jej fragment: 3-7 (Ang.II).

Od dawna wiadomym jest zarówno z wyników badań eksperymentalnych jak też obserwacji klinicznych /20,24,36,13,10,30,18/, że długotrwałe picie alkoholu prowadzi do znacznego upośledzenia procesu uczenia się i pamięci.

Wielu autorów powyższe skutki działania alkoholu wiąże z jego wpływem na układy neurotransmisyjne mózgu. Alkohol jak wykazano wpływa na jonowy kanał chlorowy receptora GABA /28/, na układ KA /31/, opioidowy /21/. Ponadto alkohol przerywa stymulację fosfatydilinozytolową /22/ i wybiórczo hamuje

aktywność MAO-₃ w ośrodkowym układzie nerwowym /35/. Ostatnie dane wykazują, że alkohol może wpływać na NMDA receptor /23/.

Wyniki tych badań, uzyskanych w wielu laboratoriach, różnią się znacznie a często są przeciwstawne i nie pozwalają obecnie na wyciągnięcie wniosków dotyczących biochemicznych podstaw behavioralnych zmian zachodzących pod wpływem alkoholu.

Niewiele jest danych dotyczących wpływu alkoholu na neuropeptydy ośrodkowego układu nerwowego. Wiemy tylko, że alkohol hamuje uwalnianie wazopresyny /22/. Pobudza wydzielanie prolaktyny i hormonu luteinizującego /15/ oraz wpływa na układ opioidowy /21/. Nieliczne są również informacje o zastosowaniu terapeutycznych neuropeptydów w poalkoholowym uszkodzeniu procesów uczenia się i pamięci /29/.

W poprzednich badaniach wykazano /3,5,38,7,8,39/, że Angiotensyna II i jej fragmenty korzystnie wpływały na proces uczenia się i pamięci. Wyniki tych doświadczeń były powtarzalne a siła ich działania znaczna. Biorąc pod uwagę te interesujące właściwości Angiotensyny II i jej fragmentów przeprowadzono ocenę jej wpływu na poalkoholowe uszkodzenia procesów uczenia się i pamięci u szczurów.

Odruchy warunkowe unikania czynnego (CAR) wykonano metodą Ferster'a i Skimer'a /16/, unikania biernego według Adera i wsp. /1/. Zwierzęta alkoholizowano przewlekłe (5 tygodni) zgodnie z metodą Wajda i wsp. /44/. (Szczegółowe dane dotyczące metod oraz uzyskanych wyników przedstawione są w publikacjach - 9,11,12).

Podsumowanie uzyskanych wyników z wpływem Ang.II i jej fragmentów na wytwarzanie odruchów unikania czynnego przedstawia tabela 2.

Stwierdzono przede wszystkim, że przewlekłe podawany alkohol obniżał około 50% zdolności nabywania odruchów u szczurów. Ang.II (podana jednorazowo w pierwszym dniu eksperymentu trwającego 9 dni) nie tylko eliminowała poalkoholowe uszkodzenie procesu uczenia się lecz także zwiększała ten proces ponad wartości kontrolne. Podobne efekty obserwowano po podaniu Ang.II, Ang.IV i Ang.VI. Tylko Ang.V nie wykazywała tego działania zarówno u zwierząt kontrolnych jak i alkoholizowanych.

Wykazano również, że Ang.II i jej fragmenty zwiększały konsolidację (pamięć) nabytych odruchów u szczurów alkoholizowanych (tabela 3). Jedyne Ang.V nie wpływała na ten proces.

Przeprowadzono również badania nad wpływem Ang.II i jej fragmentów na przypominanie w ocenie odruchu unikania biernego u szczurów alkoholizowanych zwiększały zdolność przypominania zarówno u zwierząt kontrolnych jak i alko-

holizowanych. Słabsze efekty obserwowano po podaniu Ang.V.

Przedstawione wyniki badań wykazały, że Ang.II oprócz działania klasycznego wpływa na ośrodkowy układ nerwowy zwiększając uczenie się, pamięć i przypominanie. Efekty te nie zależą od jej wiązania z klasycznym receptorem. Do ośrodkowego działania nie są niezbędne wszystkie aminokwasy cząsteczki Ang.II /1-8/. Drobne jej fragmenty jak Ang.III, Ang.IV i Ang.VI identycznie wpływają na proces uczenia się pamięci. Należy podkreślić, że fragmenty Ang.II nie posiadają klasycznych właściwości i nie wpływają na ciśnienie krwi i pragnienie.

Enzymy proteolityczne ustroju w sposób ciągły i szybko degradują Ang.II do drobniejszych jej fragmentów, które mogą mieć istotny wpływ na wyższe funkcje ośrodkowego układu nerwowego. Istotnym praktycznym aspektem tych badań jest wykazanie, że Ang.II i jej fragmenty eliminowały poalkoholowe uszkodzenie procesu uczenia się i pamięci. Szczególnie fragmenty Ang.II - Ang.III, IV i VI pozbawione klasycznych właściwości Ang.II (ciśnienie krwi) mogą być rozpatrywane jako potencjalne nietoksyczne leki.

THE INFLUENCE OF ANG.II AND ITS FRAGMENTS UPON ETHANOL - INDUCED IMPAIRMENT OF LEARNING AND MEMORY

S U M M A R Y

Angiotensin II (Ang.II) besides its hormonal effects acts upon central nervous system. The main action of this peptide is to enhance learning and memory in laboratory animals and humans. These effects are not related with classic Ang.II receptor sites. This paper describes the central effects of some Ang.II fragments acting selectively upon central nervous system and practically deprived of hormonal efficacy.

PIŚMIENNICTWO

1. Ader B., Weijnen J.A.W.M., Moleman P.: Retention of a passive avoidance response as a function of the intensity and duration of electric shock. *Psychon. Sci.*, 1972, 26, 125-129.
2. Alkic W., Waston S., Young E., Lewis M.E., Kachaturian H., Walker M.: Endogenous opioids: Biology and function. *Ann Rev. of Neurosciences*, 1984, 7, 223-255.
3. Baranowska D., Braszko J.J., Wiśniewski K.: Effect of angiotensin II and vazopressin on acquisition and extinction of conditioned avoidance in rats. *Psychopharmacology*, 1983, 81, 247-251.
4. Barchas I.D., Glen H.A., Elliot R., Holman R.B., Watson Sr.J.: Behavioral Neurochemistry: Neuroregulators and behavioral states, science, 1978, 200, 964-973.
5. Braszko J.J., Wiśniewski K.: Effect of angiotensin II and salarasin on motor activity and the passive avoidance behavior of rats. *Peptides*, 1988, 9, 475-479.
6. Braszko J.J., Wiśniewski K., Kupryszewski G., Witczuk B.: Psychotropic effects of angiotensin II and III in rats: locomotor and exploratory vs cognitive behaviour. *Behavioural. Brain Res.*, 1987, 25, 195-203.
7. Braszko J.J., Kupryszewski G., Witczuk B., Wiśniewski K.: Angiotensin II (3-8) - Hexapeptide affects motor activity, performance of passive avoidance and a conditioned avoidance response in rats. *Neuroscience*, 1988, 27, 777-783.
8. Braszko J.J., Własienko J., Kupryszewski G., Witczuk B., Wiśniewski K.: Behavioral effects of Angiotensin II and Angiotensin II-(4-8) - pentapeptide in rats. *Physiol.Behavior.*, 1988, 44, 324-332.
9. Borawska M., Kucharewicz G., Wiśniewski K.: Effects of Angiotensin II on the acquisition of conditioned avoidance response in alcohol - dependent rats. *Pol.Pharmacol.Pharm.*, 1985, 37, 903-908.
10. Butters N., Cermak L.S.: *Alcoholic Korsakoff's syndrome*. Academic Press, New York, 1979.
11. Borawska M., Kucharewicz G., Wiśniewski K.: The role of dopamine in the facilitatory effect of angiotensin II on impaired learning in rats chronically treated with ethanol. *Psychopharmacology*, 1989, 96, 500-504.
12. Borawska M.: Wpływ Angiotensyny II i jej fragmentów na upośledzone procesy uczenia się i pamięci u szczurów w wyniku długotrwałego podawania etanolu, 1989. (rozprawa habilitacyjna).
13. Chmielewski C., Golden C.J.: Alcoholism and brain damage: an investigation using the Luria - Nebraska neuropsychological battery. *Int.J.Neurosci.*, 1980, 10, 99-105.
14. Emson P.C.: Peptides as neurotransmitter candidates in the mammalian CNS. *Progress in Neurobiology*, 1979, 13, 66-116.
15. Emanuelle M.A., Mectafte L., Soneru I., Reda D., Kirsteius L., Emanuelle N.V., Lawrence A.M.: The effect of ethanol on prolactin release from pituitary cells *in vitro*. *Alcohol*, 1987, 4, 429-432.
16. Ferter C.B., Skimer B.F.: Schedules of reinforcement. *Appleton - Century - Crofts*, 1957, New York.
17. Florey E.: Neurotransmitters and modulators in the animal Kingdom. *Fed.Proc.*, 1957, 26, 4, 1164-1178.
18. Franceschi M., Truci G., Comi G., Lozza L., Marchinetti P., Galaroli G., Smirne S.: Cognitive deficits and their relationship to other neurological complications in chronic alcoholic patients. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiat.*, 1984, 47, 1113-1137.
19. Gainer H.: Peptides and neuronal function. *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, 1976, 15, 193-212.
20. Goodwin D.W., Will S.Y.: Chronic effect of alcohol and other psychoactive drugs on intellect, learning and memory in. *Alcohol drugs and Brain damage*. Ed. Rankin G., Addition Research Foundation, 1975.
21. Hiller J.M., Augel L.M., Simon E.J.: Multiple opiate receptors: alcohol selectivity inhibits binding to delta receptors. *Science*, 1981, 214, 468-469.
22. Hoffman P.L., Moes F., Luthin G.R., Tabakoff B.: Acute and chronic effects of ethanol on receptor-mediated phosphatidylinositol 4, 5-bis-phosphate breakdown on mouse brain. *Mol.Pharmacol.*, 1986, 30, 13-18.
23. Hoffman P.L., Rabe C.S., Grant K.A., Valverins P., Hudspith M., Tabakoff B.: Ethanol and the NMDA receptor. *Alcohol*, 1990, 7, 229-231.
24. Kleinknect R.A., Goldsten S.G.: Neuropsy-

- psychological deficit associated with alcoholism. *J.Stud.Alcohol*,1972,33,999-1019. 25. Koob G.F.,Dantzer R.,Bluthe R.M.,Leburn C.,Bloom F.E.,Le Moal M.: Central injection of arginine vasopressin prolong extinction of active avoidance, 1986,7, 213-218. 26. Krieger D.T.,Martin J.B.: Brain peptides, *New England J.Med.*,1981,304, 876-885. 27. Krieger D.T.,Martin J.B.: Brain peptides, *New England J.Med.*,1981,304, 944-951. 28. Liljequist S.,Culp S.,Tabakoff B.: Effect of ethanol on the binding of (35 S) + - butylbicyclophosphorothionate to mouse brain membranes. *Life Sci.*,1986, 38,1931-1939. 29. Montastruc P.,Farach M.,Montastruc J.L.: Essai de traitement par la vasopressine de l'alcoolisme chronique. *Terapic*, 1982,37, 103-108. 30. Petros T.V.,Kerbel N.,Beckwith B.E.,Saes G.,Sarafolean M.: The effects of alcohol on prospective memory, *Physiol.Behav.*,1985,35, 43-46.
31. Saito T.,Lee J.M.,Tabakoff B.: Ethanol's effects on cortical adenylate cyclase activity. *J.Neurochem.*,1985,44, 1037-1044. 32. Snyder S.H.: Brain peptides as neurotransmitters. *Science*, 1980,209, 976-983. 33. Simasko S.M.,Weiland G.A.: Effect of neurotensin, substance P and TRH on the regulation of dopamine receptors in rat brain. *Eur.J.Pharmacol.*,1984,106, 653-657. 34. Stanbly U.,Huston J.P.: Facilitation of learning by post-trial injection of substance P into the medial septal nucleus. *Behav.Brain Res.*,1980,1, 245-255. 35. Tabakoff B.,Lee J.M.,DeLeon-Jones F.,Hoffman P.L.: Ethanol inhibits the activity of the B-form of monoamine oxidase in human platelet and Brain Tissue. *Psychopharmacology*, 1984, 20, 481-484. 36. Tarter R.E.: Psychological deficit in chronic alcoholics. A review. *Int.J.Addict.*,1975,10, 327-368. 37. Wetzel W.,Matties H.: Effect of substance P on the retention of brightness discrimination task in rats. *Acta Biol.Med.Der.*,1982,41, 647-652. 38. Wiśniewski K.,Braszko J.J.: Some aspects of the modulatory action of peptides in CNS. *Beitr.Wirkst.Forsch.*,1985,H,24, 113-124. 39. Wiśniewski K.,Braszko J.J.: Behavioural effects of Angiotensin II and its fragments, in *Peptides*, eds.Penke, Török., Walter de Gruyter Co.,Berlin, New York, 1988, 211-216. 40. De Wied D.,Versteeg D.H.G. Neurohypophysial principles and memory, *Fed.Proc.*,1989,38, 2348-2354.
41. De Wied D.,Jolles J.: Neuropeptides derived from proopiomelanocortin: Behavioral, physiological and neurochemical aspects. *Physiol.Rev.*,1982, 62, 976-1059. 42. De Wied D.,Bochus B.: Modulation of memory processes by neuropeptides of hypothalamic-neurohypophysial origin, *Liz Brain mechanisms in memory and learning* Ed. Brazier MAB.,Raven Press, New York, 1979. 43. Wärfelt T.,Johansson O.,Lundberg J.M.,Schultzberg M.: Peptidergic neurons. *Nature*, 1980, 284,5756, 515-521. 44. Wajda I.I.,Manignault I.,Hudick J.P.: Dopamine levels in the striatum and the effect of alcohol and reserpine. *Biochem.,Pharmacol.*,1977,26, 653-655.

Tabela 1. Wpływ Ang.II i jej fragmentów na ciśnienie krwi, pragnienie i zachowanie się szczurów

	Zastosowane peptydy				
	Ang.II	Ang.III	Ang.IV	Ang.V	Ang.VI
Efekty behavioralne					
aktywność psychoruchowa	+	+	+	0	+
stereotypia	++	++	++	++	++
nabywanie odruchów warunkowych (CAR)	++	++	++	0	++
przypominanie biernych odruchów	+++	+++	+++	+	+++
Efekty klasyczne					
ciśnienie krwi	++++	+++	0	0	0
pragnienie	++++	+++	0	0	0

(+) - słabe pobudzenie

(++) - średnie pobudzenie

(+++) - silne pobudzenie

(++++) - bardzo silne pobudzenie

(0) - brak efektu

Tabela 2. Wpływ Ang.II i jej fragmentów na wytwarzanie odruchu unikania czynnego u szczurów (CAR)

Zwierzęta		Zastosowane peptydy				
		Ang.II	Ang.III	Ang.IV	Ang.V	Ang.VI
Grupa kontrolna (nie alkoholizowana)		+++	+++	+++	0	+++
Grupa alkoholizowana	- - -	+++*	+++	+++	0	+++

(+++) - znaczne pobudzenie

(- - -) znaczne zahamowanie

(0) brak efektu

(*) efekt Ang.II podobny do efektu obserwowanego w gr.zw.kontrolnych

Tabela 3. Wpływ Ang.II i jej fragmentów na konsolidację wytworzonych odruchów warunkowych (CAR) u szczurów

Zwierzęta		Zastosowane peptydy				
		Ang.II	Ang.III	Ang.IV	Ang.V	Ang.VI
Grupa kontrolna (nie alkoholizowana)	0	+++	+++	+++	+++	+++
Grupa alkoholizowana	0	+++	+++	+++	0	+++

(+++) znaczne zwiększenie

(0) brak efektu

Tabela 4. Wpływ Ang.II i jej fragmentów na przypominanie odruchu unikania biernego u szczurów

Zwierzęta		Zastosowane peptydy				
		Ang.II	Ang.III	Ang.IV	Ang.V	Ang.VI
Grupa kontrolna (nie alkoholizowana)		+++	+++	++	+	+++
Grupa alkoholizowana	- - -	++	+++	+++	++	+++

- (+) słabe zwiększenie
 (++) średnie zwiększenie
 (+++) duże zwiększenie
 (- - -) duże zmniejszenie