

per 5×5 cm² area. In two calves the skin before inoculation was additionally heavily soaked with a distilled water.

It was found that the strains of *T. mentagrophytes* were more virulent for guinea pigs than for calves and that they possessed a comparable virulence after inoculation on the depilated and scarified and on non-scarified skin. Differences concerned only the intensity of pathogenic lesions, because lesions appeared earlier and disappeared slower in scarified skin. Infection by introduction of a fungal suspension directly on hairy skin was possible only when 100–1000 times higher dose of the fungus was used.

Calves appeared to be more susceptible to *T. verrucosum* (MID 10³) than to *T. mentagrophytes* (MID 10³). *T. mentagrophytes* induced pathological lesions resembling clinically those caused by *T. verrucosum*, however, they possessed more superficial character and selfcuring appeared earlier than after *T. verrucosum* infection. At a low relative air humidity (54–65%) soaking of skin at a site of inoculation favoured the development of pathological lesions which appeared earlier persisted longer and were more intensive than in animals inoculated on skin soaked with water. The results are discussed with data of literature.

IRENA BOROWICZ

Wpływ toksyny tężcowej na poziom kwasu gammaaminomasłowego (GABA) w mózgu myszy

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Akademii Medycznej
ul. Biernackiego 9, 20-089 Lublin

Toksyna tężcowa, produkt metabolizmu *Clostridium tetani*, odgrywa istotną rolę w patogenezie tężca. Zachorowanie wywołane jest przedostaniem się toksyny z miejsca zranienia do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) drogą obwodowych nerwów ruchowych i przez korzenie przednie do komórek rogów przednich rdzenia kręgowego lub jąder ruchowych nerwów czaszkowych w pniu mózgu (3, 4, 12, 19, 20).

Przy próbach wyjaśniania mechanizmu działania toksyny dużo uwagi poświęcono synapsie nerwowo-mięśniowej (9, 20). Możliwość bezpośredniego jej wpływu na mięśnie została w zasadzie całkowicie wykluczona (11, 14, 20). W chwili obecnej nie ulega jednak wątpliwości, że osłabia ona uwalnianie acetylocholino z zakończeń presynaptycznych, nie blokuje przy tym receptorów cholinergicznym w błonie postsynaptycznej (7, 14, 23). Dochodzi więc do utworzenia typowego bloku presynaptycznego (14, 23). Efekt ten w złączeniu nerwowo-mięśniowym prowadzi do czynnościowego odnerwienia mięśni, dlatego też objawy niekontrolowanej ich aktywności należałoby wiązać nie ze zmianami obwodowymi, ale z procesami zachodzącymi w obrębie niektórych kategorii synaps ośrodkowych. Od dawna zresztą wiadomo, że zagrażające życiu nadmierne napięcie mięśniowe jest wynikiem centralnego działania toksyny tężcowej (9, 14, 20). Powszechnie znany jest również fakt, że toksyna tężcowa wybiórczo znosi hamujące działanie kwasu gammaaminomasłowego (GABA) w OUN poprzez zablokowanie jego uwalniania do przestrzeni synaptycznej (5, 8).

Przypuszcza się, że zwiększona aktywność nerwowa i związana z nią gotowość drgawkowa przynajmniej częściowo wynika z zakłócenia równowagi między zawartością poszczególnych układów neuromediatorów w OUN (1). Stwierdzono, że wzrost stężenia przekaźników pobudzających: glutaminianu i asparagianu, bądź

też obniżenie stężenia przekaźników hamujących: GABA i gliceryny może być powodem wzmożonej częstości wyładowań w neuronach, co w konsekwencji prowadzi do napadów drgawkowych (2).

Na tej podstawie można wnosić, że różne typy zespołów drgawkowych np. wywołane działaniem leków, czy też napady padaczkowe wiążą się między innymi z uszkodzeniem syntezy lub zaburzeniem funkcji synaptycznego GABA (6, 10).

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu różnych dawek toksyny tężcowej na poziom podstawowego neuromediatora hamującego — GABA w mózgu myszy.

Material i metody

Doświadczenia przeprowadzono na białych myszach, samcach szczepu Albino-Swiss, o masie ciała od 16 do 20 g. Zwierzęta przebywały w warunkach standardowych, miały swobodny dostęp do wody i pożywienia. Na 24 godziny przed rozpoczęciem doświadczeń losowo wybrane myszy grupowano w osobnych klatkach, a badania zarówno zwierząt kontrolnych, jak i doświadczalnych wykonywano w jednym czasie. Podczas trwania eksperymentu utrzymywano stałe warunki otoczenia. Badano całe mózgi myszy, które wyprzebarwiano po dekapitacji zwierząt.

Toksynę tężcową serii TTe 6 (Biomed Lublin) podawano dootrzewnowo w objętości 0,1 ml/10 g masy ciała myszy. LD₅₀ obliczano na podstawie działania śmiertelnego toksyny w ciągu sześciu dni obserwacji wg metody Litchfielda i Wilcoxa (17). Poziom GABA oznaczano w mózgu myszy metodą Love (18) w modyfikacji Suttona i Simmondsa (22) po 12, 24, 36, 48, 72 i 96 godzinach od podania toksyny tężcowej w dawkach odpowiadających LD₅₀ i 1/2LD₅₀. Ponadto określano zawartość GABA po 24 godzinach od wstrzyknięcia toksyny tężcowej w następujących dawkach: 1/160LD₅₀, 1/80LD₅₀, 1/16LD₅₀, 1/8LD₅₀, 1/4LD₅₀, 1/2LD₅₀, LD₅₀, 2LD₅₀, 4LD₅₀.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono w oparciu o test t-Studenta sprawdzając istotność różnicy pomiędzy średnimi wartościami GABA w grupach kontrolnych i doświadczalnych.

Wyniki i omówienie

Ostra toksyczność toksyny tężcowej u myszy została określona po 6 dniach obserwacji i wynosiła: $LD_{50} = 0,008$ y/g.

Poziom GABA w mózgu myszy oznaczony po 12, 24, 36, 48, 72 godzinach od zastosowania toksyny tężcowej w dawce LD_{50} .

Po 12 godzinach od zastosowania toksyny tężcowej w dawce LD_{50} nie występowały istotne zmiany w poziomie GABA w odniesieniu do grupy kontrolnej. Natomiast ta dawka toksyny po 24 godzinach powodowała najbardziej wyraźny spadek poziomu GABA (do wartości 73,2%) w zestawieniu z kontrolą. Następnie w kolejnych oznaczeniach po 36, 48 i 72 godzinach zawartość GABA w mózgu myszy stopniowo wzrastała, wynosząc odpowiednio: 78%, 87,5%, 90,2%.

Po 96 godzinach od podania LD_{50} toksyny tężcowej większość zwierząt padła wśród objawów tężca, dlatego też poziom GABA w tym czasie nie określano. Zmiany obserwowane po 24, 36, 48 i 72 godzinach były statystycznie istotne w zestawieniu z kontrolą, przy czym najmniejsze ryzyko błędu $p < 0,001$ miało miejsce u zwierząt, którym oznaczano poziom GABA po 24 i 36 godzinach (tab. 1).

Poziom GABA w mózgu myszy oznaczony po 24, 36, 48, 72 i 96 godzinach od zastosowania toksyny tężcowej w dawce $1/2LD_{50}$.

Najniższą zawartość GABA w porównaniu z grupą kontrolną obserwowano po 24 godzinach od podania toksyny w dawce $1/2LD_{50}$ i wynosiła ona 72,2%. Po 36, 48, 72 i 96 godzinach poziom GABA wzrastał w stosunku do notowanego po 24 godzinach, kształtując się odpowiednio: 82,5%, 87,4%, 90,1%, 90,2%.

Z analizy statystycznej wynika, że istotne ($p < 0,001$) obniżenie poziomu GABA uzyskano po 24 godzinach od podania toksyny tężcowej w dawce $1/2LD_{50}$ w zestawieniu z kontrolą.

Statystycznie istotne różnice wykazano także po 36 i 48 godzinach trwania doświadczenia, natomiast nie występowały one po 72 i 96 godzinach (tab. 2).

Poziom GABA w mózgu myszy oznaczony po 24 godzinach od podania różnych dawek toksyny tężcowej.

Na podstawie dotychczasowych wyników stwierdzono, że statystycznie wysoce znaczące obniżenie zawartości GABA w mózgu myszy w odniesieniu do kontroli wystąpiło po 24 godzinach od podania toksyny tężcowej, zarówno w dawce równej LD_{50} , jak i $1/2LD_{50}$. W związku z powyższym uznano za celowe oznaczenie poziomu GABA w mózgu myszy po 24 godzinach od podania różnych dawek toksyny tężcowej: $4LD_{50}$, $2LD_{50}$, LD_{50} , $1/2LD_{50}$, $1/4LD_{50}$, $1/8LD_{50}$, $1/16LD_{50}$, $1/80LD_{50}$, $1/160LD_{50}$.

Najniższy poziom GABA w mózgu myszy w stosunku do kontroli wystąpił po 24 godzinach od podania toksyny tężcowej w dawce równej $4LD_{50}$ i wynosił 68,8%. Wynik ten cechuje wy-

soka istotność statystyczna. Po zastosowaniu zmniejszających się dawek toksyny tężcowej: $2LD_{50}$, LD_{50} , $1/2LD_{50}$, $1/4LD_{50}$, $1/8LD_{50}$, $1/16LD_{50}$, zawartość GABA w mózgu myszy wynosiła odpowiednio: 71,4%, 73,2%, 77,2%, 77,5%, 78,7%, 80,7% w stosunku do kontroli. Wartości te były statystycznie istotne. Dawki toksyny $1/80LD_{50}$ i $1/160LD_{50}$ spowodowały nieznamienne statystycznie zmniejszenie się poziomu GABA (tab. 3).

Toksyna tężcowa powoduje zaburzenia w przewodnictwie synaptycznym obwodowego i ośrodkowego układu nerwowego, które polegają na przewodzie procesów pobudzenia nad hamowaniem. Zostaje zablokowane uwalnianie neuromediatorów hamujących, takich jak glicyna i GABA w synapsach OUN oraz acetylocholiny (ACH) w płytkach motorycznych (8, 14, 16). Curtis (5) opisał zniesienie przewodnictwa hamującego po bezpośrednim podaniu toksyny tężcowej do mózgu i rdzenia kręgowego, co potwierdza, że jest ona specyficznym blokerem inhibitorów synaptycznych struktur ośrodkowych, rdzeniowych i ponadrdzeniowych. Rozpatrując mechanizm działania toksyny tężcowej na procesy przekazywania należy przyjąć, że wywiera ona wpływ na funkcję różnego typu synaps. Znane są doniesienia sugerujące możliwość oddziaływania toksyny na synapsy pobudzające, które mogą być jednak mniej wrażliwe niż synapsy hamujące (11).

Zaburzenia neuroprzekazywania występujące w tężcu, a dotyczące układu GABA-ergicznego, polegają na upośledzeniu uwalniania tego neuromediatora z pęcherzyków synaptycznych, natomiast wiele danych przemawia, że synteza GABA pozostaje nie zmieniona (23). Przemiany biochemiczne towarzyszące procesowi uwalniania neuromediatorów, w tym również i GABA, pod wpływem toksyny tężcowej mają jeszcze wiele punktów niejasnych.

W niniejszej pracy wykazano, że po podaniu toksyny tężcowej poziom GABA w mózgu myszy ulegał obniżeniu w odniesieniu do kontroli. Po zastosowaniu dawki toksyny tężcowej równej LD_{50} i $1/2LD_{50}$ najniższy poziom GABA w mózgu notowano po upływie 24 godzin od jej podania. W tym czasie obserwowano dopiero pojawienie się pierwszych, niekiedy tylko wyraźnie nasilonych, objawów tężca. Podanie zwierzętom dawek toksyny tężcowej wyrażających wielokrotność lub część LD_{50} pozwoliło stwierdzić, że po 24 godzinach najniższe wartości GABA uzyskano po zastosowaniu $4LD_{50}$, natomiast przy dawce $1/160LD_{50}$ poziom GABA był obniżony mimo, że w sposób statystycznie nieistotny w zestawieniu z kontrolą. W związku z tym nasuwa się uwaga, że nawet bardzo niewielka dawka toksyny oddziałuje na zawartość GABA w mózgu. W późniejszym okresie tężca, mimo występowania wzmożonego napięcia mięśni i przeżeń, można było zauważyć

Tab. 1. Poziom GABA oznaczony w mózgu myszy w różnym czasie po podaniu toksyny tężcowej w dawce LD₅₀

Czas (godz) po podaniu i.p. toksyny tężcowej lub 0,9% Na Cl (kontrola)	Liczba zwierząt	GABA w $\mu\text{g/g}$ tkanki						istotność p
		kontrola			toksyna tężcowa			
		\bar{x}	$\pm(s)$	%	\bar{x}	$\pm(s)$	%	
12	10	772,3	28,9	100	722,6	28,4	93,6	> 0,05
24	10	732,6	36,2	100	536,7	35,1	73,2	< 0,001
36	9	772,3	28,9	100	602,5	25,5	78,0	< 0,001
48	10	772,3	28,9	100	676,3	46,1	87,5	< 0,05
72	10	695,6	11,7	100	627,4	13,2	90,2	< 0,05

Tab. 2. Poziom GABA oznaczony w mózgu myszy w różnym czasie po podaniu toksyny tężcowej w dawce 1/2LD₅₀

Czas (godz) po podaniu i.p. toksyny tężcowej lub 0,9% Na Cl (kontrola)	Liczba zwierząt	GABA w $\mu\text{g/g}$ tkanki						istotność p
		kontrola			toksyna tężcowa			
		\bar{x}	$\pm(s)$	%	\bar{x}	$\pm(s)$	%	
24	9	732,6	36,2	100	566,0	34,7	77,2	< 0,001
36	9	739,0	34,4	100	610,0	16,4	82,5	< 0,01
48	8	687,4	6,1	100	600,6	6,7	87,4	< 0,01
72	8	687,4	6,1	100	620,0	16,1	90,1	> 0,05
96	7	687,4	6,1	100	620,6	23,3	90,2	> 0,05

Tab. 3. Poziom GABA oznaczony w mózgu myszy po 24 godz. od podania różnych dawek toksyny tężcowej

Dawka toksyny tężcowej lub 0,9% Na Cl (kontrola)	Liczba zwierząt	GABA w $\mu\text{g/g}$ tkanki						istotność p
		kontrola			toksyna tężcowa			
		\bar{x}	$\pm(s)$	%	\bar{x}	$\pm(s)$	%	
4LD ₅₀	8	589,7	29,4	100	406,3	26,9	68,8	< 0,001
2LD ₅₀	8	589,7	29,4	100	421,1	22,4	71,4	< 0,001
LD ₅₀	10	732,6	36,2	100	536,7	35,1	73,2	< 0,001
1/2LD ₅₀	9	732,6	36,2	100	566,0	34,7	77,2	< 0,001
1/4LD ₅₀	9	732,6	36,2	100	568,4	14,1	77,5	< 0,001
1/8LD ₅₀	9	739,0	34,4	100	582,0	23,3	78,7	< 0,01
1/18LD ₅₀	9	739,0	34,4	100	597,0	21,7	80,7	< 0,01
1/80LD ₅₀	10	652,8	8,2	100	561,6	13,4	86,0	> 0,05
1/160LD ₅₀	10	652,8	8,2	100	590,4	15,0	90,4	> 0,05

zmniejszenie się zróżnicowania w poziomie GABA między grupą kontrolną a doświadczalną.

W świetle uzyskanych danych wydaje się być słusznym przytoczony uprzednio pogląd, że toksyna tężcowa wpływa nie tylko na synapsy hamujące (11). Należy również przyjąć, że efekt działania toksyny tężcowej stanowi odpowiedź kilku typów neuronów. Znane są powiązania anatomiczne i funkcjonalne między różnie działającymi neuronami; wiadomo także, że mechanizmy interakcji między nimi są złożone i niezupełnie jeszcze wyjaśnione. Zostało udowodnione istnienie łączności w pojęciu morfologicznym i czynnościowym między układami: GABA-ergicznym, serotonergicznym, dopaminergicznym, noradrenergicznym i cholinergicznym (15, 21). Zmiana aktywności jednego z tych układów pociąga za sobą reakcje ze strony pozostałych.

Uzyskane wyniki wskazują, że toksyna tężcowa obniża poziom GABA w mózgu myszy, co potwierdza udział tego neuromediatora w patogeniezie tężca.

Piśmiennictwo

1. Anlezark G., Horton R. G., Meldrum B. S., Sawaya Ch. B.: *Biochem. Pharmacol.* 25, 413, 1976.
2. Balcar V. J., Johnston G. A. R.: *J. Neurochem.* 20, 529, 1973.
3. Brooks V. B., Curtis D. R., Eccles J. C.: *J. Physiol.* 308, 49, 1980.
4. Caban J.: *Pol. Tyg. Lek.* 36, 1397, 1981.
5. Curtis D. R., Felix D., Game G. J. A., McCulloch R. M.: *Brain Res.* 51, 358, 1973.
6. Czajka R.: *Acta Physiol. Pol.* 29, 193, 1978.
7. Da Vanzo J. P., Sydow M.: *Psychopharmacol.* 62, 23, 1979.
8. Davies J., Tongroach P.: *J. Physiol.* 290, 23, 1979.
9. Duchon L. W.: *J. Neurolog. Sci.* 10, 153, 1973.
10. Elliott K. A. C., von Gelder N. M.: *J. Neurochem.* 3, 28, 1958.
11. Habermann E.: *Arch. Pharmacol.* 267, 1, 1970.

12. Helting T. B., Parschat S., Eugelhardt H.: *J. Biol. Chem.* 254, 21, 10728, 1979.
13. Hill R. G., Simmonds M. A., Straughan D. W.: *Br. J. Pharmacol.* 44, 807, 1972.
14. Kaeser H. E., Saner A.: *Europ. Neurol.* 3, 193, 1970.
15. Kleinrok Z., Czajka R.: *Acta Physiol. Pol.* 29, 117, 1978.
16. Krizanowski G. M.: *Biul. Exp. Biol. Med.* 49, 1, 42, 1960.
17. Litchfield J. T., Wilcoxon F.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99, 1949.
18. Love J. P., Robins E., Eyerman G. S.: *J. Neurochem.* 3, 8, 1958.
19. Mellanby J., Green J.: *Neurosci.* 6, 3, 281, 1981.
20. Sedlacek J.: *Cesk. Fysiol.* 31, 73, 1982.
21. Sierostawska J.: *Post. Hig.* 18, 413, 1964.
22. Sutton J., Simmonds M. A.: *Biochem. Pharmacol.* 23, 1801, 1974.
23. Wendon L. M. B., Gill D. M.: *Brain Res.* 238, 292, 1982.

Adres autora: dr Irena Borowicz, ul. Koncertowa 7/219, 20-843 Lublin

Борович И. — Влияние столбнячного токсина на уровень гаммааминомасляной кислоты (GABA) в мозгу мыши

Определялось влияние разных доз столбнячного токсина на уровень гаммааминомасляной кислоты (GABA) в мозгу мыши. В результате проведенных исследований установлено, что столбнячный токсин понижает уровень GABA в мозгу мыши, не отмечено однако отчетливой зависимости между величиной понижения уровня GABA и интенсивностью симптомов столбняка. Весь объем полученных данных подтверждает участие GABA-эргической системы в патогенезе столбняка.

Borowicz I. — The influence of tetanic toxin on the level of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the brain of mice

The influence of different doses of tetanic toxin on the level of gamma-aminobutyric acid (GABA) was determined in the brain of mice. It was found that the tetanic toxin decreased the level of GABA in the brain of mice, however, there was not stated a considerable interrelationship between the degree of GABA's drop and the intensity of tetanic signs. The findings confirm that GABA-ergic system takes place in the pathogenesis of tetanus.

WRATHALL A. E., CARTWRIGHT S. F., WELLS D. E., JONES P. C.: Przeciwciała matczyne dla parwowirusa prosiąt i ich wpływ na odporność czynną po stosowaniu inaktywowanej szczepionki z dodatkiem emulsji olejowej. (Maternally-derived antibodies to porcine parvovirus and their effect on active antibody production after vaccination with an inactivated oil-emulsion vaccine). *Vet. Rec.* 120, 475—478, 1987 (20)

Badania przeprowadzono na 75 prosiątach pochodzących z trzech kolejnych miotów od macior szczepionych inaktywowaną szczepionką przeciwko parwowirusowi prosiąt. Poziom przeciwciał określono metodą hemaglutynacji. U prosiąt w wieku 6 miesięcy miano swoistych przeciwciał wynosiło 160, przy czym prosięta w wieku 9 miesięcy reagowały dodatnio w od-czynie hemaglutynacji. U wszystkich prosiąt posiadających matczyne przeciwciała poddanych szczepieniu przeciwko parwowirusowi 70, 130 i 190 dnia życia szczepionką z dodatkiem zawiesiny olejowej pojawiała się solidna i utrzymująca się przez długi okres czasu odporność. Nawet wysokie miano przeciwciał w surowicy prosiąt szczepionych nie wywierało statystycznie znamiennego wpływu na nasilenie odporności poszczepiennej.

G.

BUXTON D., DONALD K. M., FINLAYSON J.: Monenzin a zwalczanie doświadczalnej toksoplazmozy u owiec. (Monenzin and the control of experimental, ovine toxoplasmosis: A systemic effect). *Vet. Rec.* 120, 618—619, 1987 (26)

Odsetek zamierania płodów na skutek zakażenia *Toxoplasma gondii* może obniżyć się znacznie u owiec, zaś masa noworodków wzrastać przy profilaktycznym stosowaniu u ciężarnych owiec monenzinu. Obserwacje przeprowadzono na ciężarnych owcach, u których stosowano monenzin w dawce 15 mg/zwierzę/dzień codziennie począwszy od 80 dnia ciąży. Owce zaraziło 90 dnia ciąży podskórnie 100 cystami *T. gondii*. U zarazo-nych zwierząt począwszy od 14 dnia po zarażeniu pojawiły się swoiste przeciwciała dla *T. gondii* w klasie IgG. W grupie 7 leczonych owiec uzyskano 9 żywych i 3 martwe jagnięta, w grupie kontrolnej (zwierzęta nie leczone) 5 żywych i 7 martwych jagnięt. W ciągu 72 godzin padły 2 jagnięta z grupy leczonej i 1 z grupy kontrolnej. Średnia długość ciąży w grupie leczonej wynosiła 141 dni, w kontrolnej 138 dni, zaś średnia masa ciała jagnięt w grupie leczonej 3,7 kg, w grupie kontrolnej 3,0 kg.

G.