Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXI, knj. 23.

Grujica Žarković

1986

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/0b90ada0-dcbb-442a-88d3-7b1322fdbc8b

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

YU ISSN 0350-0071

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXI

ODJELJENJE MEDICINSKIH NAUKA

Knjiga 23

Redakcioni odbor
JAKOB GAON, DŽEMAL REZAKOVIĆ i GRUJICA ŽARKOVIĆ

ANU BiH АНУ БиХ

Urednik
GRUJICA ŽARKOVIĆ,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

SARAJEVO
1986.

MARIJA KESER-STANKOVIĆ i DRAGAN STANKOVIĆ

EVALUACIJA PROTEKTIVNIH EFEKATA d-PENICILAMINA I CISTEAMINA (MEA) NA POTENCIJAL MIROVANJA NA MEMBRANI GLATKIH MIŠIĆNIH ĆELIJA IZLOŽENIH DJELOVANJU OLOVA

APSTRAKT. U radu su proučavani i komparirani protektivni efekti d-pencilamina i cisteamina (MEA) na membranski potencijal glatkih mišićnih ćelija u uslovima aplikacije olovnih iona. D-penicilamin i MEA, kao SH protektori na ćelijskoj membrani, poslije dodavanja iona olova ispoljili su različite efekte. D-penicilamin u startu izaziva snažnu depolarizaciju membrane glatkih mišićnih ćelija ileuma. Smanjenje membranskog potencijala je bilo od 42 mV na 15 mV. Nakon dodavanja iona olova potencijal mirovanja se potpuno regeneriše.

Cisteamin u startu izaziva smanjenje potencijala mirovanja od 42 mV na 20 mV. Dodavanje iona olova na cisteamin uslovilo je ireverzibilnu redukciju membranskog potencijala glatkih mišićnih ćelija.

Polazeći od poznatih činjenica da su SH grupe enzimskog sistema na ćelijskoj membrani osjetljive na djelovanje teških metala, posebno olova, primjena ovih antidota, koji posjeduju SH grupe, proizvela je različite efekte: d-penicilamin ispoljio je protektivno djelovanje na ćelijskoj membrani, dok cisteamin nije pokazao inhibitorne efekte na toksično djelovanje olova.

Primjena kelata u trovanju teškim metalima pokazala je da su kelatogeni agensi dobri antidoti u trovanju olovom. Dosadašnja istraživanja (Rothstein, 1967; Keser-Stanković, 1977) dokazala su da olovo posjeduje poseban afinitet prema ćelijskim membranama. Baltrop et al. (1971), Brun et al. (1972) ustanovili su da se olovo veže za mitohondrijalnu komponentu i lizozome. Eksperimentalna istraživanja (Alvares et al., 1972) u intoksikaciji olovom ukazuju na poremećaj prenosa iona i reakcije sa SH skupinama. Sa biološkog stanovišta, SH grupe imaju posebne funkcije u ćelijskoj membrani, različitim subcelularnim dijelovima, u različitim tkivima, uključujući i krv. Izučavajući biohemiju SH grupa membrane, Jocelyn (1972) našao je da su neke od njih potrebne za integritet funkcije Na/K pumpe, difuziju glikoze i aktivnosti membranske ATP-aze. D-penicilamin je sulfamino kiselina srodna cisteinu. Pretežno je ispitivan u tertpiji trovanja olovom, naročito u mobilizaciji olova iz depoa u kostima i organima (Glodberg et al., 1963; Wyllie, 1963; Walshe, 1968) bez dubljeg ulaženja u mehanizme djejstva. Protektivni efekti aminotiola cisteamina (MEA) eksperimentalno su istraživani naročito u radijacionoj

zaštiti. Sugahar et al. (1971) davali su SH protektore cistamin i cisteamin na ćelije kripta duodenuma prije injiciranja spojeva koji blokiraju tiole i uočili njihov zaštitni efekat. Papović i sar. (1978) ispitivali su preživljavanje kontraktilne vakuole paramecium caudatum u uslovima eksperimentalne intoksikacije olovom. Uvođenjem cisteina (0,274 mM) i EDTA (18,58 mM) u inkubacioni medijum našli su da ove supstance doprinose preživljavanju populacija paramecijuma pri dozama olova koje su inače letalne. Protektivno djejstvo ovih supstanci manifestovalo se i na ubrzanje frekvencije pulzacija kontraktilne vakuole. Protektivni efekat bio je ovisan o koncentraciji olovog acetata. Jamakosmanović i sar. (1975), izučavajući parametre združenog akcionog potencijala u uslovima različitih doza UV zračenja, što je uslovilo značajan pad amplitude akcionog potencijala, našli su da je inkubacija nerva u rastvor cisteamina (MEA) 15 minuta prije UV-zračenja zaštitila akcioni potencijal od UV-efekata. Fox et al. (1975) referisali su o značajnim protektivnim efektima cisteamina (MEA) na akcioni potencijal nerva zračenog različitim dozama UV-zračenja. Rezultati istraživanja (Jamakosmanović et al., 1982) ukazuju da je inkubacija nerva u većoj koncentraciji cisteamina i cistamina prije UV-zračenja ispoljila manje protektivno djelovanje, koje je bilo naglašeno pri svim ispitivanim dozama UV-zračenja.

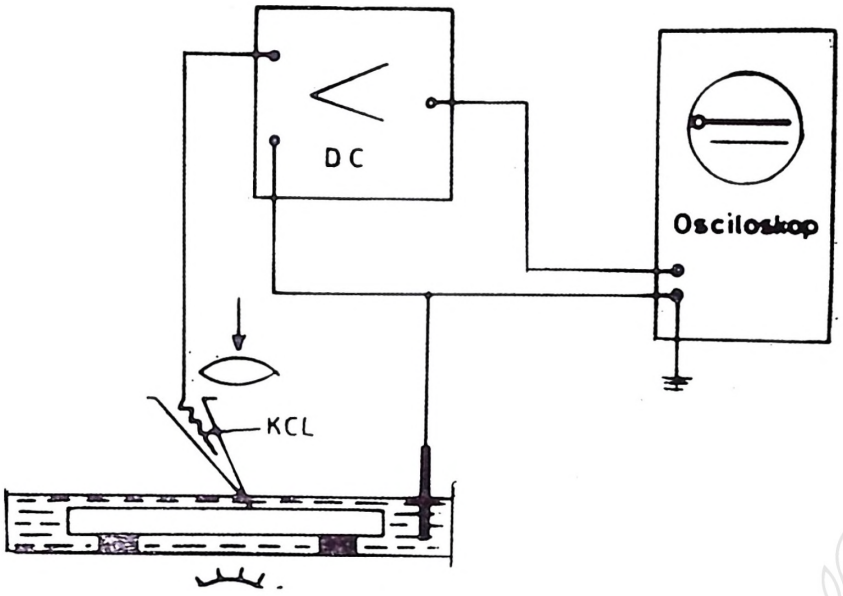
Zaštitno djelovanje cisteamina u trovanju teškim metalima nije izučavano. Naše istraživanje interakcije cisteamina i olova na neuromišićnoj transmisiji smo već ranije referisali (Keser-Stanković, 1980). U organizmu kelatizirajući agensi djeluju kompetitivno sa tjelesnim konstituentima, vezujući toksične supstance. Kelatizirajući agensi posjeduju izraženu selektivnost za određene toksične supstance. Reaktivne SH grupe koje posjeduju d-penicilamin i cisteamin (MEA) uvjetuju njihov afinitet za teške metale, pa i za olovo. Efekti ovih supstanci, kao i njihovo uzajamno djejstvo sa olovom na nivou ćelije, još su uvijek nedovoljno jasni. Dosadašnja istraživanja nisu kompleksno sagledala varijacije u veličini membranskog potencijala u uslovima djelovanja ovih antidota i interakcije olova i antidota. Bilo je od interesa ispitati efekte ovih SH protektora na ćelijskoj membrani glatkih mišićnih ćelija i njihovo ponašanje u prisustvu olovnih iona.

Materijal i metode

Za mjerenje membranskog potencijala u eksperimentu koristili smo izolovani ileum dužine 3 cm. koji smo inkubirali u 20 ml. Tyrodeovog rastvora, premostili i učvrstili preko mostića pluta iznad izvora svjetlosti u polju stereomikroskopa. Sistem za mjerenje membranskog potencijala uključuje staklenu mikroelektrodu ispunjenu sa 3 M. KCL, sa prečnikom vrha ispod 0,5 mikrona i otporom od 10—20 M. Ohma. Mikroelektroda je preko DC-pojačala vezana na katodni osciloskop, a preparat je uzemljen Ag/AgCl elektrodom uronjenom u rastvor (slika 1).

Postupak mjerenja membranskog potencijala obuhvata testiranje potencijala vrha elektrode u rastvoru i dovođenje instrumenta na nultu liniju. Prije mjerenja potencijala mirovanja utvrđeno je da olovo i korištene supstance ne izazivaju varijacije u nultom položaju uređaja

za mjerenje. Membranski potencijal je mjeren uvođenjem mikroelektrode pomoću hidrauličkog sistema za mikromanipulaciju na Brinkmanovom postolju, uz vizuelnu kontrolu položaja vrha elektrode.



Slika 1. — Shematski prikaz uređaja za mjerenje membranskog potencijala

Očitavanje membranskog potencijala vršeno je registrovanjem elektronegativnosti defleksijom elektronskog mlaza u odnosu na nultu liniju, uz korekciju za faktor pojačanja (DC). Registracija membranskog potencijala vršena je svake minute u toku pet minuta. Eksperimentalni period za svaku ispitivanu supstancu iznosio je ukupno 20 minuta (ukupno je izvršeno po 10 mjerenja za svaku supstancu). U toku prvih pet minuta vršena su mjerenja membranskog potencijala u fiziološkom rastvoru, sljedećih pet minuta u prisustvu noradrenalina (NA) u finalnoj koncentraciji 10^{-6} M. odmah, i to svaki 15 sec. do jedne minute a zatim svake minute u toku pet minuta. Kako prilikom ovih mjerenja nisu nađene varijacije u vrijednosti potencijala, u posudu sa izolovanim ćelijama davali smo ispitivane supstance u određenoj koncentraciji i registrovali vrijednosti membranskog potencijala u istom vremenskom periodu. Da bismo ispitali uzajamne efekte antidota i olova na potencijal mirovanja, na ispitivane antidote bez ispiranja dodavali smo olovne ione u finalnoj koncentraciji 10^{-5} M. i registrovali njihove uzajamne efekte na isti način kao pri ispitivanju efekata svake pojedine supstance na potencijal mirovanja.

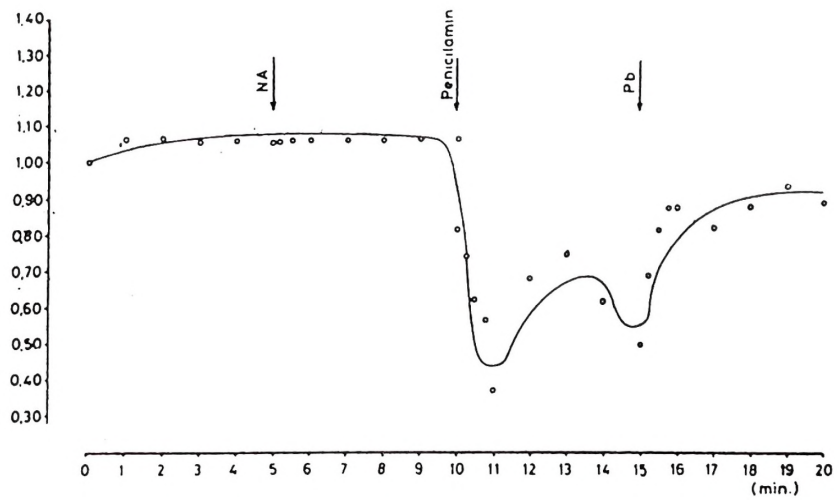
ANU BiH АНУ БиХ

Rezultati

Radi sagledavanja efekata antidota i njihovog protektivnog djejstva u prisustvu olova na membranski potencijal, rezultati su svedeni na relativne vrijednosti membranskog potencijala glatkih mišićnih ćelija ileuma. Vrijednosti membranskog potencijala u prvih pet minuta mjerenja kretale su se od 40—40,2 mV. Da bi se inhibirali peristaltički pokreti ileuma i nesmetano mjerio membranski potencijal, dodali smo NA u finalnim koncentracijama 10^{-6} M. Vrijednosti membranskog potencijala se nisu mijenjale i iznosile su 40—40,2 mV. U 10. minuti eksperimenta dodat je d-penicilamin u finalnoj koncentraciji 10^{-5} M., koji je u startu izazvao pad membranskog potencijala na 82% stantnih vrijednosti. Nakon 15 sec. vrijednosti su bile 75%, u 30. sec. 62%, u 45. sec. 50%, i na kraju prve minute vrijednosti su bile svega 37% od startne vrijednosti potencijala mirovanja; sa 42,5 mV potencijal mirovanja je pao na 15 mV.

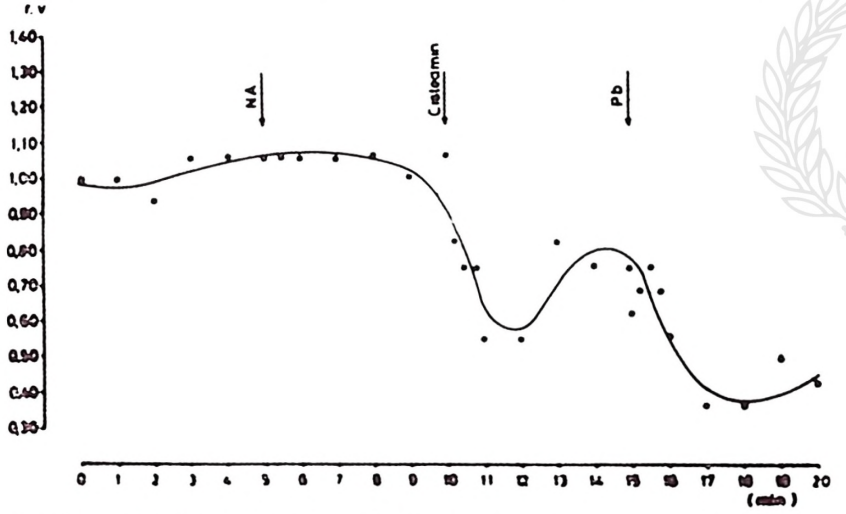
Međutim, u drugoj minuti aplikacije d-penicilamina membranski potencijal se regeneriše na 69%, u 3. minuti na 75%. U 4. i 5. minuti potencijal mirovanja ponovo opada na 50% vrijednosti potencijala mirovanja.

Aplicirano olovo na d-penicilamin u startu regeneriše membranski potencijal na 63%, nakon 15 sec. 69%, nakon 30 sec. na 82%, da bi na kraju prve minute poslije aplikacije olovnih iona vrijednosti potencijala mirovanja iznosile 88% startne vrijednosti. U daljih pet minuta mjerenja potencijal mirovanja se progresivno regeneriše i dostiže 94% startne vrijednosti membranskog potencijala (slika 2).



Slika 2. — Efekti d-penicilamina i interakcije d-penicilamina i olova na membranski potencijal

Fiziološke varijacije potencijala mirovanja u prvih pet minuta mjerenja kretale su se u dijapazonu od 37 do 42,5 mV. Dodavanjem NA vrijednosti su se kretale od 40 do 42,5 mV. Aplicirani cisteamin (MEA) u finalnim koncentracijama od 10^{-5} M. u startu izaziva pad potencijala mirovanja na 75% startnih vrijednosti, u 15. sec. se regeneriše na 82%, u 45. sec. ponovo opada na 75% i na kraju prve minute poslije aplikacije cisteamina (MEA) iznosi 50% startnih vrijednosti membranskog potencijala. U drugoj minuti poslije aplikacije cisteamina vrijednosti potencijala mirovanja ostaju iste, tj. sa 42,5 mV vrijednosti potencijala mirovanja iznosio je 20 mV. U trećoj minuti poslije aplikacije cisteamina potencijal mirovanja se regeneriše na 82%, zatim ponovo opada i na kraju pete minute aplikacije MEA iznosi 75% startne vrijednosti. Olovo dodato na cisteamin u startu uzrokuje pad potencijala mirovanja na 62%, u 15. sec. se regeneriše na 69%, u 30. sec. na 75%, u 45. sec. ponovno opada i na kraju prve minute poslije aplikacije olovnih iona na cisteamin (MEA) vrijednosti potencijala mirovanja bile su 56% startnih vrijednosti. U 2. i 3. minuti aplikacije olovnih iona na cisteamin nastavlja se progresivno opadanje potencijala mirovanja do 37% startnih vrijednosti. Međutim, u 4. minuti dolazi do ponovne regeneracije, tako da su na kraju pete minute nakon aplikacije olovnih iona na cisteamin (MEA) vrijednosti potencijala mirovanja iznosile 44% polaznih vrijednosti membranskog potencijala (slika 3).



Slika 3. — Efekti cisteamina i interakcije cisteamina i olova na membranski potencijal

Diskusija i zaključci

Analiza rezultata ukazuje da d-penicilamin i cisteamin (MEA) kao protektori na ćelijskoj membrani u prisustvu olovnih iona ispoljavaju različite efekte. D-penicilamin uzrokuje snažnu inicijalnu depolarizaciju membrana glatkih mišićnih ćelija ileuma (od 42,5 na 15 mV), ali u toku eksperimenta potencijal mirovanja pokazuje tendenciju ka regeneraciji. Dodavanjem olovnih iona dolazi do gotovo potpune resti-

tucije membranskog potencijala. Protektivni efekti d-penicilamina na membrani glatkih mišićnih ćelija u skladu su sa kliničkim zapažanjima o protektivnom djelovanju d-penicilamina u intoksikaciji sa olovom (Goldberg, Wallie, Walshe). Aminotiol cisteamin (MEA) u startu izaziva pad membranskog potencijala na 75% startnih vrijednosti, a do kraja prve minute poslije aplikacije cisteamina i na 50% (20 mV). U toku eksperimenta potencijal mirovanja se postepeno regeneriše. Međutim, dodavanje olovnih iona uzrokuje ireverzibilnu redukciju membranskog potencijala glatkih mišićnih ćelija ileuma. Rezultati naših istraživanja protektivnih mogućnosti cisteamina (MEA) nisu u skladu sa rezultatima Papovića i sar., koji su primjenom cisteina i EDTA u određenim koncentracijama u prisustvu olovnih iona uočili protektivni efekat. Upoređujući rezultate naših istraživanja s rezultatima ovih autora, pretpostavljamo da je taj protektivni efekat bio rezultat prisutne komponente EDTA. Ispoljeni zaštitni efekti cisteamina u uslovima UV-zračenja na akcionom potencijalu (Jamakosmanović i sar.) nisu se mogli dokazati na membranskom potencijalu glatkih mišićnih ćelija u prisustvu olovnih iona. Depolarizirajući efekti d-penicilamina i MEA na membrani glatkih mišićnih ćelija vjerovatno su posljedica pojačane difuzibilnosti tih spojeva kroz ćelijsku membranu. Polazeći od poznatih činjenica da su SH grupe encimskih sistema na ćelijskoj membrani i konstituenata ćelije osjetljive na djelovanje teških metala, pa i olova, primjena ovih antidota koji posjeduju SH grupe pokazala je različite efekte.

D-penicilamin ispoljio je protektivno djejstvo na ćelijskoj membrani dok cisteamin nije inhibirao toksične efekte olova. Različiti efekti ovih supstanci vjerovatno su posljedica različitog afiniteta vezivanja Pb iona na SH grupe d-penicilamina, odnosno cisteamina. SH grupe d-penicilamina jače vežu Pb ione i na taj način pokazuju veći protektivni efekat. Kelatogeni mehanizmi ovih SH protektora trebalo bi da budu predmet daljeg istraživanja.

SUMMARY

EVALUATION OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF d-PENICILLAMINE AND CYSTEAMINE (MEA) ON THE MEMBRANE RESTING POTENTIAL OF THE SMOOTH MUSCLE CELLS

In this work the protective effects of d-Penicillamine and cysteamine (MEA) on the membrane resting potential of smooth muscle cells after application of lead ions was studied. D-Penicillamine and MEA. like SH protectors on the cell membrane, after lead ions were added, showed different effects. D-Penicillamine causes strong initiale membrane repolarisation of the smoouth muscle cells of ileum (the decrease of membrane potential was from 42 mV to 15 mV).

Foflowing application of lead ions the resting membrane potential was totally regenerated. Cysteamine at the start causes the decrease of the membrane resting potential (from 42,5 mV to 20 mV). During the course of the experiment the resting potential was gradually regenerated. Applied lead ions on cysteamine caused ireversible reduction of the membrane potential of smooth muscle cells Starting from the known facts that SH groups of enzymatic systems on the cell membrane are susceptible to the action of the heavy metals, particularly the lead, the application of those antidots which possess SH groups showed different effects. D-Penicillamine showd the protective effects on the cell membrane and cysteamine did non inhibit the toxic effect of the lead.

LITERATURA

Alvares, A. P., Leight, S., Cohn, J., Kappas, A. (1972): *Lead and methyl mercury: Effects of acute exposure on cytochrome P-450 and mixed function oxydase system in the liver.* J. Exp. Med. 135, 1406.

Baltrop, D., Smith, A. (1972): *Lead binding to human haemoglobin.* Experientia 28, 76.

Brun, U., Brun, A. (1972): *Histochemical evidence for lysosomal uptake of lead in tissue cultured fibroblasts.* Histochemie, 29, 140.

Fox, J., Hof, D., Schwarz, W. (1975): *Localization and characterization of ultraviolet photoreactions in the nerve membrane.* 5th Internat Biophysics Congress Copenhagen, Abstract 480.

Goldberg, A., Smith, J. A., Lochhead, A. C. (1963): *Treatment of lead poisoning with oral penicillamine.* Brit. Med. J. 1, 1270.

Jamakosmanović, A., Leicher, Z., Nakaš, M., Drecun, M. (1975): *Protective effects of Cysteamine on the action potential of nerve against UV radiation.* 5th Internat Biophysics Congress, Copenhagen, Abstract 237.

Jamakosmanović, A., Nakaš, M. and Mara Drecun. (1982): *Protective action of mixed disulphides and thiols on the compound action potential of nerve against UV radiation Period.* Biol. Vol. 84. No 2 136—139.

Jamakosmanović, A., Nakaš, M., Drecun M. (1978): *The protective effect of mercaptoethylamine on the appearance of block bioelectrical nerve activity evoked by varying doses of UV radiation.* Period, biol. 80 : 87.

Jocely, P. C. (1972): *Biochemistry of the SH group.* Acad Press. New York.

Keser-Stanković, M. (1977): *Lead effects on the membrane potential of smouth muscle cells.* Folia Medica, Vol. XII, 81—90.

Keser-Stanković, M., Stanković, D. (1980): *Interakcija cisteamina i olova na izolovanom ileumu normalnih i tretiranih životinja.* Radovi LI, knj. 18. Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine, 65—73.

Papović, R., Rozhaja and Jablanović M. (1978): *Behaviour of parameciium caudatum populationas under conditions of experimental lead poisoning.* Acta. Biol. Med. Exp. Vol. 3, 83—88.

Rothstein, A. (1961): *The cellmembrane as the site of action of heavy metals.* AEC. Research and Development Report Ur — 459.

Willie, J., Petermann, H., Petermann, E. (1963): *Effects of penicillamine in promoting lead excretion.* Car. Med. Ass. J. 88, 1155.

Walshe, J. M. (1968): *Toxic reactions to penicillamine in patients with Wilson's disease.* The Postgrad. Med. J. Supp. v. 44, 6.