Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

ISTRAŽIVANJE DJELOVANJA TEŠKIH METALA NA MEMBRANSKI I AKCIONI POTENCIJAL

MARIJA KESER-STANKOVIC
Institut za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 616 : 612.014.2

Apstrakt. Savremenom tehnikom intracelularne registracije membranskog potencijala glatkih mišićnih ćelija i metodom elektrostimulacije i osciolografske analize četiri osnovna parametra združenog akcionog potencijala istraživani su i komparirani toksični efekti iona mangana, kadmija, olova i žive na ove strukture. Nađeno je da manganovi ioni u finalnim koncentracijama od 10^{-5} do 10^{-3} M u startu izazivaju pad membranskog potencijala na 72% startne vrijednosti. Međutim, nakon dvije minute aplikacije manganovih iona, potencijal mirovanja se progresivno regeneriše do polaznih vrijednosti. U akalcičnom mediju u prisustvu manganovih iona vrijednosti membranskog potencijala padaju na 65% startnih vrijednosti da bi od druge minute počeo progresivno da se regeneriše i u desetoj minuti eksperimenta vrijednosti potencijala mirovanja su bile 36% iznad startnih vrijednosti. Dodati kalcijumovi ioni uslovljavaju dalju hiperpolarizaciju, koja se kreće i do 57% iznad polaznih vrijednosti. Kadmijumovi ioni dodati u finalnim koncentracijama od 10^{-5} do 10^{-3} M uzrokuju blagu hiperpolarizaciju. U akalcičnom mediju uzrokuju ireverzibilno opadanje membranskog potencijala na 56% startne vrijednosti bez tendencije za regeneraciju potencijala mirovanja. Olovni ioni dodati u finalnim koncentracijama od 10^{-5} — 10^{-3} M uzrokuju ireverzibilni pad membranskog potencijala na 64% startnih vrijednosti. Toksični efekti živinih iona na ekscitabilne membrane izolovanog nervusa ischiadicus žabe ispoljili su se u snažnoj reverzibilnoj depresiji amplitude akcionog potencijala, produženju latence i prolongiranog praga razdraženja.

Ključne riječi: teški metali, membranski potencijal, akcioni potencijal.

UVOD

Hemijske reakcije iona teških metala sa enzimima ćelijskih membrana mogu izazvati različite štetne efekte kao inhibiciju aktivnosti enzima na površini membrane, inhibiciju transportnog sistema u membrani koji obezbjeđuju pojačanu difuziju i naročito aktivni transport supstanci kroz membranu u ćeliju (elektroliti, šećer, aminokiseline), smanjenje ili povećanje permeabilnosti membrane, promjene bioelektričnog potencijala na membrani i druge efekte (Rothenstein, A., 1959). Rezultati istraživanja elevacije koncentracije iona kalija i kalcija u vanjskom mediju ukazuju da ioni kalija progresivno depolarišu mem-

brane glatkih mišićnih stanica. Dodatak olovnih iona nije modificirao kalijum deplarizaciju potencijala mirovanja glatkih mišićnih ćelija. Međutim, ioni kalcijuma ispoljili su izrazitu stabilizirajuću ulogu na membrani glatkih mišićnih ćelija (Salanki et al., 1984, Keser-Stanković et al., 1976). Manganovi ioni, zavisno od koncentracije u interakciji sa jonskim strujama na membrani glatkih mišića uretera, ireverzibilno blokiraju akcioni potencijal ako su koncentracije velike. U manjim koncentracijama indukuju lagani porast amplitude akcionog potencijala. U fiziološkom rastvoru manganovih ioni u koncentraciji od 2 mM ne uzrokuju promjene u potencijalu mirovanja i otporu membrane glatkog mišića uretera (Bury and Shuba, 1976). Istraživanja toksičnih efekata kadmijumovih, živinih i manganovih iona na neuromišićnoj transmisiji vegetativnih organa (Keser-Stanković et al., 1983, 1984) ukazala su da živini ioni povećavaju efekat holinergične, adrenergične i somatske nervne stimulacije vegetativnih organa, dok manganovi ioni uzrokuju smanjenje efekta nervne stimulacije izolovanog mokraćnog mjehura i duktus deferensa, a povećavaju efekat nervne stimulacije izolovanog želuca. Analiza rezultata ukazuje da su kadmijumovi ioni izraziti inhibitori neuromišićne transmisije ispitivanih organa. Bilo je od interesa ispitati efekte iona teških metala u interakciji sa membranskim potencijalom na membranama glatkih mišićnih ćelija i parametrima združenog akcionog potencijala.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu korišćen je dio intaktnog ileuma dužine 3 cm. Izolovani ileum uronjen je u 20 ml Tyrodeovog rastvora, premošten i učtvršćen preko mostića pluta iznad izvora svetlosti u polju stereomikroskopa u kome je posuda sa izolovanim organom stavljena na pokretni stolić. Sistem za mjerenje membranskog potencijala uključuje staklenu mikroelektrodu ispunjenu sa 3 m KCl sa prečnikom vrha ispod 0,5 mikrona, otporom 10—20 M. Ohma. Elektroda je preko DC pojačala vezana za katodni osciloskop, a preparat je uzemljen Ag/AgCl elektrodom uronjenom u rastvor.

Postupak mjerenja membranskog potencijala obuhvata testiranje potencijala vrha elektrode u rastvoru i dovođenje instrumenta na nultu liniju. Prije vršenja mjerenja membranskog potencijala glatke mišićne ćelije, utvrđeno je da ispitivani ioni teških metala ne izazivaju varijaciju 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. Očitavanje membranskog potencijala vršeno je registrovanjem elektronegativnosti, defleksijom elektronskog mlaza u odnosu na nultnu liniju, uz korekciju za faktor pojačanja (DC). Registracija membranskog potencijala vršena je svake minute u toku 5 minuta, s tim da je u prvoj minuti vršeno mjerenje svakih 15 sekundi. Eksperimentalni period iznosio je ukupno do 20 minuta. U toku prvih 5 minuta vršena su mjerenja membranskog

potencijala u fiziološkom rastvoru, a zatim je apliciran noradrenalin u finalnoj koncentraciji 10^{-6} M. Aplikacija noradrenalina nije mijenjala vrijednosti membranskog potencijala, ali je inhibirala peristaltičke pokrete ileuma i obezbjedila nesmetano mjerenje membranskog potencijala.

U 10. minuti eksperimenta aplicirani su ioni mangana, kadmijuma u standardnom rastvoru sa i bez kalcijumovih iona i olovni ioni u standardnom rastvoru u finalnim koncentracijama od 10^{-5}—10^{-3} M i registrovani njihovi efekti na poteencijal mirovanja. Ispitivanja efekata živinih iona izvršena su na izoliranim n. ischiadious žabe, koji su nakon preparacije inkubirani u Ringerovom rastvoru. Metodom ekstracelularne registracije akcionog potencijala, korištenjem elektrostimulacije i oscilografske analize parametara akcionog potencijala izvršena su mjerenja u nekoliko serija. Prva mjerenja (u nultom vremenu) vršena su u svim serijama u Ringerovom rastvoru, a nakon toga nervi su stavljeni u pripremljeni rastvor sa živinim ionima u koncentraciji $5x10^{-3}$ M sa po 8 nerava. Uzimaju se podaci za cijelu seriju nerava, a postupak se ponavlja nakon 15, 30, 45 i 60 minuta.

Uređaj za mjerenje sastoji se iz stimulatora (Generator Tektronix Type 161 and 162) koji je izvor kvadratičnih impulsa definisanog intenziteta, trajanja i frekvence. Sa izvora stimulatora, preko translatora, veza ide na elektrode za stimulaciju, preko kojih prebačeni nerv prima podražaje. Drugi par su elektrode koje služe za registraciju, a one su spojene za osciloskop.

Inkubirani nervi prebacuju se preko elektroda, nađe se pražni intenzitet stimulusa, a potom pri maksimalnom intenzitetu stimulusa na osciloskopu se očitavaju parametri akcionog potencijala.

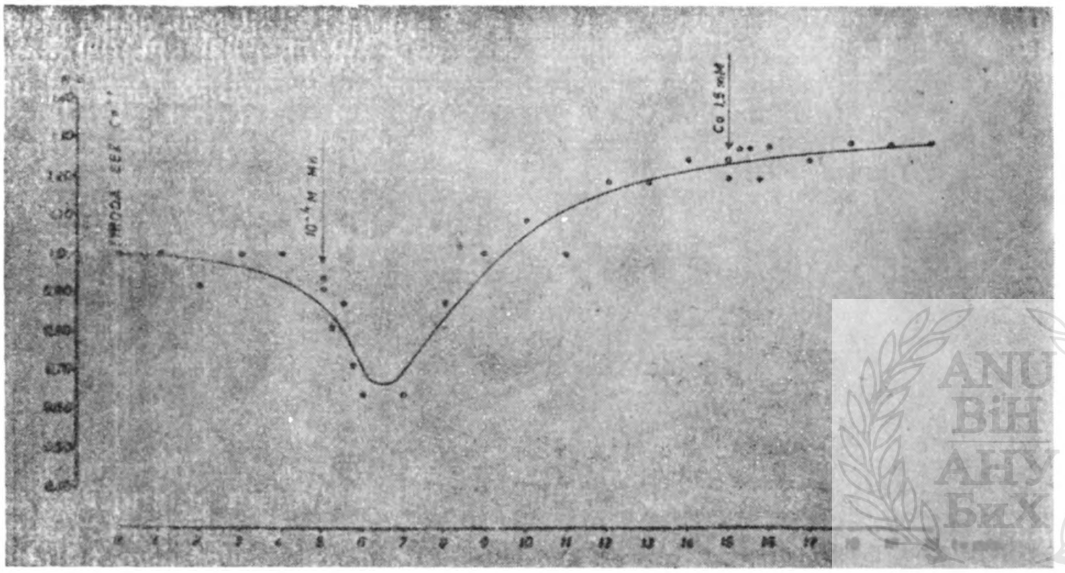
REZULTATI

Rezultati su prikazani grafički u vidu relativnih vrijednosti potencijala mirovanja. Membranski potencijal mjeren u toku pet minuta u fiziološkom rastvoru u svim serijama eksperimenta iznosio je od 39 do 40,2 mV.

Dodati Mn^{2+} ioni u finalnim koncentracijama 10^{-5} M u startu izazivaju neznatan pad potencijala mirovanja, ali nakon 15 sekundi membranski potencijal pada na 92% startne vrijednosti, u 30-toj sekundi na 83%, u 45-toj na 74% i na kraju prve minute aplikacije Mn^{2+} iona vrijednosti potencijala mirovanja iznosile su 72% startne vrijednosti. Međutim, u drugoj minuti aplikacije Mn^{2+} iona membranski potencijal počinje da se progresivno regeneriše i na kraju osme minute nakon aplikacije Mn^{2+} iona potencijal mirovanja se u potpunosti regenerisao. Dodati Ca^{2+} ioni u koncentraciji od 1,5 mM dovode do hiperpolarizacije do 10% iznad početne vrijednosti.

Membranski potencijal pod uticajem Mn^{2+} iona u finalnoj koncentraciji 10^{-4} M u akalcičnom mediju pada u startu na 90% polaznih vrijednosti. Nakon 15 sekundi vrijednosti iznose 88%, u 30-toj sekundi

76% i na kraju prve minute vrijednosti potencijala mirovanja su 65% od startne vrijednosti. U drugoj minuti aplikacije Mn^{2+} iona dolazi do regeneracije potencijala koji se do četvrte minute nakon aplikacije Mn^{2+} regeneriše na startne vrijednosti. U toku daljeg eksperimenta dolazi do postepene hiperpolarizacije, tako da su u 10. minuti nakon aplikacije Mn^{2+} iona vrijednosti membranskog potencijala 36% iznad polaznih vrijednosti. Dodati Ca^{2+} ioni u koncentraciji od 1,5 mM dovode do dalje hiperpolarizacije koja se kreće i do 57% iznad polaznih vrijednosti.



Slika 1. Efekti iona mangana na membranski potencijal u Thyrodeovom rastvoru bez kalcija

Cd^{++} ioni dodati u finalnim koncentracijama od 10^{-5} — 10^{-3} M u normalni rastvor uzrokuju hiperpolarizaciju do 2%. U toku 15, 30 i 45 sekundi nakon aplikacije Cd^{++} potencijal mirovanja zadržava iste vrijednosti, ali nakon prve minute aplikacije Cd^{++} potencijal mirovanja se vraća na polazne vrijednosti i do kraja 15-te minute mjerenja vrijednosti potencijala mirovanja su na nivou kontrolnih vrijednosti.

U akalcičnom mediju vrijednosti potencijala mirovanja iznosile su 35,2 do 36 mV. Dodati Cd^{2+} u finalnim koncentracijama 10^{-5} M + 10^{-3} M uzrokuju pad potencijala mirovanja u startu na 83% kontrolnih vrijednosti. U 45. sekundi vrijednosti su iznosile 70% i na kraju prve minute aplikacije Cd^{2+} 69% startnih vrijednosti. Dalja mjerenja ukazuju na dalji pad potencijala mirovanja i u 10. minuti aplikacije Cd^{++} iznosio je 56% startne vrijednosti.

Membranski potencijal u prisustvu olovnih iona u finalnim koncentracijama od 10^{-5} — 10^{-3} M opada na 64% startne vrijednosti. Ovaj

deprimirajući efekat na potencijal mirovanja je ireverzibilan, jer u toku pet minuta nakon aplikacije olovnih iona nisu se ispoljili znaci regeneracije potencijala mirovanja.

Vrijednosti združenih parametara akcionog potencijala kontrolne grupe mjereni u fiziološkoj otopini prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. SREDNJE VRIJEDNOSTI AKCIONOG POTENCIJALA KONTROLNE GRUPE

vrijeme min.	Prag nadražaja (V)	AP Amplituda (mV)	AP Latenca (μ sec.)	AP Tranjanje (μ sec.)
0	0.43	19.5	386	714
0	0.40	16.5	400	707
15	0.44	18.8	400	700
30	0.43	18.4	364	686
45	0.41	19.8	371	679
60	0.42	19.4	357	709

Srednje vrijednosti efekata Hg^{2+} na združene parametre akcionog potencijala prikazane su na tabeli 2.

Tabela 2. SREDNJE VRIJEDNOSTI EFEKATA Hg^{2+}

Vrijeme min.	Prag nadražaja (V)	AP Amplituda (mV)	AP Latenca (μ sec.)	AP Trajanje (μ sec.)
0	0.42	18.8	457	728
0	0.46	6.4	714	729
15	0.43	16.9	500	793
30	0.51	17.1	457	736
45	0.51	17.0	436	736
60	0.51	18.0	407	714

Evidentan je drastični pad amplitude akcionog potencijala u odnosu na vrijednosti kontrolne grupe od 18,8 na 6,4 mV ($p < 0.001$).

Vrijeme latence je signifikantno prolongirano od 457 μ sec. na 714 μ sec. ($p < 0.001$). Evidentan je efekat Hg^{2+} iona na prag nadražaja od 0.42 V na 0.46 V, ali nije statistički značajan. Toksični efekti Hg^{2+} na združene parametre akcionog potencijala su reverzibilni.

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Analiza rezultata o efektima manganovih iona na potencijal mirovanja ukazuje da ioni mangana u finalnim koncentracijama od 10^{-5} — 10^{-3} M uzrokuju snažnu inicijalnu depolarizaciju membrana glatkih mišića sa izraženom kasnijom potpunom regeneracijom. Zapaženo

ANU BiH АНУ БиХ

je da, ako nema iona kalijuma u vanjskom mediju, membranski potencijal se regeneriše do nivoa značajne hiperpolarizacije. Može se pretpostaviti da manganovi ioni u niskim koncentracijama kompetiraju sa ionima kalcija za isto mjesto vezivanja u membrani. Vjerovatno manganovi ioni mogu u ovome zamjeniti ione kalcija u stabilizirajućim efektima na membrani glatkih mišića ćelija, ali ne i u prenošenju frakcije struje kroz membranu koja inače pripada kalciju kao nosiocu iona. Rezultati naših istraživanja ne slažu se sa rezultatima Burya i Shuba, u kojima navode da ioni mangana ne uzrokuju promjene u potencijalu mirovanja i otporu membrane glatkog mišića. U našem eksperimentu mi smo pratili i registrovali promjene potencijala mirovanja pod uticajem manganovih iona odmah i svakih 15 sekundi u toku prve minute, a zatim svake minute u narednih 10 minuta, što ovi autori vjerovatno nisu činili.

Rezultati istraživanja ukazuju da ioni kadmijuma u interakciji sa membranskim potencijalom ispoljavaju različite efekte u normalnom Tyrodeovom rastvoru i kada u Tyrodeovom rastvoru nema iona kalcijuma. U normalnom Tyrodeovom rastvoru kadmijumovi ioni u koncentraciji 10^{-4} M, izuzev blage inicijalne hiperpolarizacije, potencijal mirovanja ne mijenjaju. Međutim, ako u vanjskom mediju nema iona kalcijuma, ioni kadmijuma uzrokuju značajno povećanje permeabilnosti ćelijskih membrana, pa potencijal mirovanja progresivno opada na 56% startnih vrijednosti bez tendence k regeneraciji membranskog potencijala. Ovi rezultati sugerišu na kompetitivno djelovanje iona kadmijuma na kalcijumove kanale u membrani glatke mišićne ćelije. U interakciji sa ionima kadmijuma na membrani glatkih mišićnih ćelija kalcijumovi ioni sprečavaju redukciju membranskog potencijala blokirajući pore na membrani i tako regulišu permeabilitet za ione. Rezultati ovih istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima Keser-Stanković et al., Salanki et al. o stabilizirajućoj ulozi kalcijumovih iona na ćelijskim membranama, kao i izmijenjenim funkcijama membranskih struktura pod uticajem iona teških metala.

Olovni ioni uzrokuju ireverzibilni pad membranskog potencijala. Ova parcijalna depolarizacija u uslovima aplikacije olovnih iona mogla bi biti u vezi sa registrovanim spastičkim efektima na izolovanom ileumu. Olovo pojačava tonične kontrakcije i istovremeno djeluje na membranu glatkih mišića u cjelini i na dijelove u blizini nervnih završetaka. Očito je da olovni ioni utiču na permeabilnost membrana glatkih mišićnih ćelija. Ova parcijalna depolarizacija vjerovatno je posljedica blokiranja enzimske aktivnosti ATP-aze, čime se remeti mehanizam održavanja jonskih koncentracionih gradijenata membrane. Od mogućih mehanizama o dejstvu olovnih iona može se pretpostaviti da olovni ioni uzrokuju inhibiciju ATP-aze, reducirajući aktivni transport, što dovodi do smanjenog jonskog koncentracionog gradijenta kalijuma na membrani. Inhibicija ATP-aze dovodi do smanjenja energije, pa je onemogućena hidroliza ATP-a, tako da nedostaje energija koja obezbjeđuje aktivni transport. Ova inhibicija dovodi do akumulacije ATP-a u ćeliji uz sinhroni pad intracelularnog kalijuma. Veza između inhibicije ATP-aze i pada kalijuma može se objasniti depresijom membranskog potencijala izazvanog dejstvom olovnih iona i povećanom permeabil-

nošću membrane. Rezultati istraživanja efekata živinih iona na ekscitabilne membrane izolovanog nervus ischiadicus žabe pokazali su da živini ioni uzrokuju reverzibilnu snažnu depresiju amplitude akcionog potencijala, povišenje praga razdraženja i produženje latence. Ovi efekti su vjerovatno posljedica reagovanja živinih iona sa SH ligandima na površini ćelija, što dovodi do poremećaja u funkciji ćelijskih membrana.

THE ESTIMATION OF EFFECTS OF HEAVY METALS ON MEMBRANE AND ACTION POTENTIAL

Summary

Using the technique of intracelular membrane potential registration membrane potential was measured, of the smooth muscle cells in standard Thyrode solution in the presence of Mn^{2+}, Cd^{++} and Pb^{++} as well as in acalcic Thyrode solution without Ca^{++} but in the presence of Mn^{++} and Cd^{++}. Mn^{++} in final concentration of 10^{-5} — 10^{-3} M in standard Thyrode solution at the beginning caused a mild decrease of rest potential and the decrease to reach 72% of the start value at the end of the first minute. However from the second minute after application of Mn^{++} the rest potential was progressive by regenerated and at the end of the eight minute it reached its start value. Ca^{++} added in concentration of 1,5 mM caused hyperpolarisation of 10% over the start value. If Mn^{++} were added in acalcic solution, during the first minute of acalcic state rest potential decreased to 65% of the start value. From the second minute of the application of Mn^{++} membrane potential was regerating and during the fourth minute it reached the start value. In the course of this experiment gradual hyperpolarisation was observed which reached 36% over the start value. Ca^{++} added in Thyrode solution in concentration of 1.5 mM caused further hyperpolarisation to 57% over the start value. Pb^{++} added in the final concentration 10^{-5} — 10^{-3} M in the standard Thyrode solution caused irreversible decrease of the membrane potential to 64% of the start value, This partial depolarisation was maintained during the experiment without tendency to a regeneration of the rest potential. Cd^{++} in the standard Thyrode solutionin concentration 10^{-5} — 10^{-3} M caused a mild initial hiperpolarisation. In acalcic solution the rest potential in the presence of Cd^{++} showed the progressive decrease to 56% of the start value. No tendency of the regeneration of membrane potential was observed. Using the methods of electrostimulation and osciollographic analysis of four essential parametars of the compound action potential, the effects of Hg^{++} on the excitable cell membranes of isolated frog sciatic nerves were studied. The results showed that Hg^{++} in concentration of 5 mM caused a strong depression of amplitude of action potential, an icrease in threshold excitation and prolongation of latency. The changes of amplitude of the action potential and latency were reversible, but the effects of Hg^{++} on threshold excitation were prolonged.

LITERATURA

Bury, V. A. and Shuba, M. F.: In *Physiology of Smooth Muscle.* E. Bulbring and M. F. Shuba. Editors, Raven Press, New York, pp. 65—75, 1976.

Keser-Stanković, Marija., Huković, S., Stanković, D., *Influence of Ions of Heavy Metals on the Effects of Cholinergic, Adrenergic and Somatic Nerve Stimulation. Folia Medica,* Vol. XV, 1, 75—84, 1984.

Keser-Stanković, Marija, Huković, S., Stanković, D.: *Neuromišićna transmisija fetusa različitih životinjskih vrsta u uslovima mijenjanja koncentracije iona kadmija in vitro.* Knjiga zbornika radova Kongresa medicine rada Jugoslavije, Novi Sad, 170—173, 1983.

Keser-Stanković, Marija, Nakaš, M. and Stanković, D.: *Smooth Muscle Cell Membrane Resting Potential at Various Calcium Ions Concentrations.* Periodicum Biologorum PDHI-A, 78, N° 2, 167—168, 1976.

Keser-Stanković, Marija, Nakaš, M., Stanković, D.: *Potassium Depolarization of Smooth Muscle Cell Membranes and Interaction with Application of Lead.* Periodicum Biologorum PDBI-A 78, N° 2, 168—169, 1976.

Rothestein, A.:*Cell Membrane as a Site of Action of Heavy Metals,* Fred. Proc. 18, 1026, 1959.

Salanki, J. and Katalin, S. — Rozsa: *Membrane Efect of Heavy Metals in Molluscan CNS.* Balaton Limnological Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, H-8237 Tihani, Hungary. 8th International Biophysics Congress Book of Abstracts, Bristol 1984.

ANU BiH АНУ БиХ