

EFEKAT SNIŽENE KONCENTRACIJE KALIJUMA NA KADMIJUMOM IZAZVANU EPILEPTIFORMNU AKTIVNOST RECIJUSOVIH NEURONA PIJAVICE

AUTORI

Milićević Nebojša¹, Stanojević Marija², Spasić Svetolik², Jovanović Zorica³, Prostran Milica⁴, Lopičić Srđan²

¹ Univerzitet u Prištini, Medicinski fakultet, Institut za patološku fiziologiju, Srbija

² Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za patološku fiziologiju „Ljubodrag Buba Mihailović“, Srbija

³ Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet, Institut za patološku fiziologiju, Srbija

⁴ Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet, Institut za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju, Srbija

KORESPONDENT

NEBOJŠA MILIĆEVIĆ

Medicinski fakultet Priština,
Univerzitet u Prištini

✉ neboomilk@mts.rs

SAŽETAK

Veliki socio-medicinski značaj epilepsija refraktarnih na terapiju zahteva detaljno izučavanje ćelijskih mehanizma njihovog nastanka. Sve važnije mesto u ovim istraživanjima zauzimaju i toksini iz životne sredine a posebno industrijski toksini. Zbog toga je cilj našeg rada bio da ispitamo značaj Cd^{2+} u nastanku epileptiformne električne aktivnosti neurona, kao ulogu Na^+/K^+ pumpe u mehanizmima koji dovode do zaustavljanja ovakve aktivnosti. Eksperimenti su izvedeni na Recijusovim (Retzius) neuronima pijavice *Haemopsis sanguisuga*. Pomoću intraćelijski postavljenih mikroelektroda registrovane su promene membranskog potencijala ćelije po primeni Cd^{2+} (100 $\mu\text{mol/l}$) i iste koncentracije Cd^{2+} u rastvoru sa sniženom koncentracijom K^+ (1 mmol/l). Na našem modelu 100 $\mu\text{mol/l}$ Cd^{2+} dovodi do nastanka ritmične repetitivne oscilatorne aktivnosti. Ova aktivnost mnogome podseća na pojavu paroksizmalnih depolarišućih pomeranja (paroxysmal depolarizing shift - PDS) koja predstavljaju celularnu osnovu epilepsija. Epileptiformna aktivnost izazvana Cd^{2+} imala je sledeće odlike: frekvencija je bila $3,9 \pm 0,8$ PDS-ova u minuti, trajanje PDS-ova je bilo $4,0 \pm 0,3$ s, a njihova amplituda $8,1 \pm 0,7$ mV. Cd^{2+} izazvava efekte slične Ni^{2+} i Co^{2+} , ali u 30 puta manjoj koncentraciji. Primena Cd^{2+} u rastvoru sa niskom koncentracijom K^+ dovela je do statistički značajnog smanjenja frekvencije PDS (za $2,34 \pm 0,55$ PDS/minuti, $p < 0,05$, Studentov t-test), visoko statistički značajnog produženja trajanja trajanja PDS-ova (za $2,84 \pm 0,23$ s, $p < 0,01$, Studentov t-test) i visoko statistički značajnog smanjenja amplitude PDS-ova (za $1,91 \pm 0,33$ mV, $p = 0,01$, Studentov t-test). Naši rezultati pokazuju da je Cd^{2+} vrlo potentan uzročnik epileptiformne aktivnosti, kao i da Na^+/K^+ pumpa bitno utiče na parametre ove aktivnosti i ima potencijalno važnu ulogu u mehanizmima koji dovode do njenog prekida.

Ključne reči: kadmijum, epilepsija, Na^+/K^+ pumpa, pijavica

UVOD

Osnovu za nastanak epilepsija predstavlja povećana ekscitabilnost neurona koja se manifestuje iznenadnom pojavom talasa produžene depolarizacije u toku kojih se pojavljuje visokoučestalo pražnjenje akcionih potencijala. Ovi talasi produžene depolarizacije registrovani su na neuronima u penicilinskim epileptičkim fokusima neokorteksa mačke i označeni su kao iznenadna depolarizaciona pomeranja-paroxysmal depolarization shifts (PDS) [1].

Mehanizmi nastanka PDS studirani su na velikom broju eksperimentalnih modela.

Za ispitivanje su korišćeni neuroni kako kičmenjaka tako i bezkičmenjaka i ogledi su rađeni kako u in vivo tako i u in vitro uslovima.

Neuroni izolovanih ganglija bezkičmenjaka, puževa *Helix pomatia* i *Caucasotachea atrolabiata* [2,3,4] i pijavice *Hirudo medicinalis* [5] pokazali su se kao dobar

model za ispitivanja mehanizama epileptogeneze. Utvrđeno je da epileptiformna aktivnost registrovana na neuronima bezkičmenjaka korespondira u svim aspektima epileptiformnoj aktivnosti izazvanoj na neuronima kičmenjaka uključujući i sisare [2].

Na Recijusovim neuronima pijavice (RNP) *Hirudo medicinalis* epileptiformna aktivnost sa pojavom PDS može se izazvati aplikacijom niza agenasa kao što su penicilin, bemegrid, FMRF amid i joni prelaznih metala Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , La^{3+} , Cd^{2+} [5,6] tako da RNP predstavljaju pogodan model za ispitivanje celularnih mehanizama epileptogeneze.

Epileptogeni efekat jona Cd^{2+} nedovoljno je ispitano. Praktično su samo započeta ispitivanja na RNP *Hirudo medicinalis* [6]. Na našem modelu RNP *Haemopsis sanguisuga* rađeno je ispitivanje efekta Ni^{2+} [7], ali nije rađeno ispitivanje efekta Cd^{2+} . Zato smo preduzeli seriju ogleda sa Cd^{2+} da bi smo utvrdili da li joni ovog prelaznog metala mogu izazvati epileptiformnu aktivnost na našem modelu.

Takođe smo ispitivali i mehanizme Cd^{2+} izazvane epileptogeneze, odnosno PDS. Nastanak, trajanje i završetak PDS određeni su grupom različitih membranskih struja i membranskih transportnih sistema koji se naizmenično aktiviraju i deaktiviraju. Svaki PDS sastoji se iz (a) faze depolarizacije, (b) faze platoa i (c) faze repolarizacije [2]. Za prvu fazu (faza depolarizacije- početak PDS) odgovorne su ulazne Na^+ i Ca^{2+} struje [5,6,8] a za treću fazu PDS-a (završetak PDS-faza repolarizacije) odgovorne su Ca^{2+} -zavisne- K^+ izlazne struje i elektrogeni transportni sistemi kao što je Na^+/K^+ pumpa [6,9,10]. Za normalnu aktivnost Na^+/K^+ pumpe neophodno je održavanje stalne koncentracije jona K^+ . Sniženje koncentracije ekstraćelijskog K^+ inhibiše Na^+/K^+ pumpu [11]. Stoga smo preduzeli i drugu grupu ogleada da bi smo ispitali efekat sniženja koncentracije ekstraćelijskog K^+ na Cd^{2+} izazvanu epileptiformnu aktivnost RNP.

CILJ RADA

Veliki socio-medicinski značaj epilepsija refraktarnih na terapiju zahteva detaljno izučavanje ćelijskih mehanizma nastanka ovog poremećaja. Sa druge strane, sve važnije mesto u istraživanjima zauzimaju toksini iz životne sredine a posebno industrijski toksini i bolesti i stanja do kojih oni dovode. Zbog toga je cilj našeg rada bio da ispitamo mogući značaj Cd^{2+} u nastanku epileptiformne električne aktivnosti neurona, kao i da rasvetlimo ulogu Na^+/K^+ pumpe u mehanizmima koji dovode do zaus-tavljanja ovakve aktivnosti

MATERIJAL I METODE

Eksperimenti su izvedeni na Recijusovim (Retzius) neuronima pijavice *Haemopsis sanguisuga*. Ogledi su izvedeni na sobnoj temperaturi 18-25°C.

Disekcija je vršena standardnom metodom [12] i u skladu je sa pravilnikom Medicinskog fakulteta za rad sa eksperimentalnim životinjama.

Izolovani segmenti nervne vrpce od 3-4 ganglije postavljani su u komoricu zapremine 2,5 ml koja je bila ispunjena Ringerovim rastvorom za pijavice. Nervna vrpca sa ganglionima u komorici je fiksirana pomoću žice od nerđajućeg čelika. Identifikacija i penetracija neurona je vršena je pod stereomikroskopom (MBS-9, USSR). Recijusovi neuroni su identifikovani na osnovu njihove veličine, položaja u gangliji i bioelektričnih osobina.

Zamena rastvora vršena je ubrizgavanjem novog rastvora u komoricu pomoću šprica uz istovremeno usisavanje rastvora koji se prethodno nalazio u komorici. Usisavanje rastvora je obavljano pomoću vakuum pumpe. Komorica sa ganglionima postavljena je u uzemljen Faradejev kavez koji je bio postavljen na gumene lop-tice da bi se smanjio uticaj vibracija.

Elektrofiziološke registracije

Membranski potencijal je registrovan korišćenjem standardnih staklenih mikroelektroda koje su pravljene od borosilikatnih staklenih cevčica sa ugrađenim mikro-filamentom (Harvard Apparatus GC150F-10, Engleska).

Borosilikatne cevčice su postavljane u izvlačač sa podesivim grejanjem i silom izvlačenja (Narishige, Japan) gde je vršeno izvlačenje mikroelektroda koje su zatim punjene rastvorom 3 mol/l KCl.

Za ogledne su korišćene mikroelektrode koje su imale otpor od 20-30 MΩ i potencijal vrha do 5 mV.

Ubacivanje mikroelektroda u ćelije vršeno je pomoću mehaničkog mikromanipulatora (Leitz, Nemačka). Za pojačanje signala korišćen je pretpojačivač sa visokim ulaznim otporom (model 1090 Winston Electronics, USA).

Mikroelektrode su povezivane sa pretpojačivačem preko srebro-srebrohlorid (Ag-AgCl) žice. Elektroda za uzemljenje od srebro-srebrohlorid (Ag-AgCl) žice bila je smeštena u zasebnoj komorici koja je bila ispunjena standardnim Ringerovim rastvorom.

Komorica sa preparatom i komorica sa elektrodom za uzemljenje bile su povezane pomoću mosta koji se sastojao od staklene cevčice ispunjene rastvorom 3 mol/l KCl u 3% agaru. Registrovanje membranskog potencijala i akcionih potencijala vršeno je na osciloskopu (Hameg HM 205-3, Nemačka) i istovremeno beleženo kako na termičkom pisaču osciloskopa (Hameg HM8148-2 graphic printer, Nemačka) tako i na standardnom mehaničkom pisaču (Linseis, Nemačka).

Rastvori

U ogledima su korišćeni sledeći rastvori:

- standardni Ringerov rastvor za pijavice (R_i , u mmol/l): NaCl 115,5; KCl 4,0; $CaCl_2$ 2,0; Na_2HPO_4 1,2; NaH_2PO_4 0,3 (pH 7,2),

- Ringerov rastvor sa niskom koncentracijom kalijuma (low K^+ R_i) imao je isti sastav kao i standardni Ringerov rastvor, sem što je koncentracija KCl bila 1 mmol/l

- rastvori sa Cd^{2+} pravljani su dodavanjem 100 μ mol/l $CdCl_2$ u standardni Ringerov rastvor ili Ringerov rastvor sa niskom koncentracijom K^+ .

Statistička analiza rezultata

Rezultati su prikazani broičano i grafički. Broičane vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost \pm standardna greška. Za statističku analizu korišćen je Studentov t-test. Statistički značajnom smatrana je verovatnoća nul-te hipoteze $p < 0,05$, a visoko statistički značajnom - verovatnoća $p < 0,01$.

REZULTATI

Efekat Cd^{2+} na membranski potencijal i spontanu aktivnost RNP.

U ovoj grupi ogleada mirovni membranski potencijal RNP u standardnom Ringerovom rastvoru bio je $-45,7 \pm 2,6$ mV ($n=6$). Primena 100 μ mol/l $CdCl_2$ dovela je do inicijalne depolarizacije praćene prolaznom hiperpolarizacijom i najzad stabilizacijom membranskog potencijala sa postepenim razvojem ritmične repetitivne oscilatorne aktivnosti. Ova repetitivna oscilatorna aktivnost opstajala je sve vreme primene Cd^{2+} . Svaki ciklus oscilacija započinjao je brzom depolarizacijom koju je pratio plato sa učestalim javljanjem akcionih potencijala, a završavao se brzom repolarizacijom (Slika 1.).

Opisana oscilatorna aktivnost umnogome podseća na pojavu paroksizmalnih depolarišućih pomeranja (paroxysmal depolarizing shift - PDS) koja predstavljaju celularnu osnovu epilepsija. Epileptiformna aktivnost izazvana Cd^{2+} imala je sledeće odlike: frekvencija je bila $3,9 \pm 0,8$ PDS u minuti, trajanje PDS je bilo $4,0 \pm 0,3$ s, a njihova amplituda $8,1 \pm 0,7$ mV.

Tabela 1. Usporedni prikaz parametara PDS izazvanih primenom Cd^{2+} , Ni^{2+} i Co^{2+}

Supstancija	Frekvencija PDS-a (PDS/min)	PDS amplituda (mV)	Trajanje PDS-a (s)
Kadmijum (100 μ mol/l)	3.9 \pm 0.7	8.1 \pm 0.7	4.0 \pm 0.3
Nikl (3 mmol/l)	5.5 \pm 0.4	12.9 \pm 0.8	5.4 \pm 0.3
Kobalt (3 mmol/l)	3.6 \pm 0.4	6.1 \pm 1.1	3.7 \pm 0.3

PDS - paroksizmalno depolarišuće pomeranje. Vrednosti prikazane kao srednja vrednost \pm standardna greška srednje vrednosti.

Tabela 2. Uticaj Ringerovog rastvora sa niskim K^+ na epileptiformnu aktivnost izazvanu Cd^{2+}

	Kadmijum	Kadmijum u low K^+ Ri	Δ	p	n
Frekvencija PDS (PDS/min)	2.9 \pm 0.6	0.6 \pm 0.3	2.34 \pm 0.55	<0.05	74
Amplituda PDS (mV)	8.0 \pm 0.9	5.1 \pm 0.7	2.84 \pm 0.23	<0.01	22
Trajanje PDS (s)	3.9 \pm 0.5	5.8 \pm 0.4	1.91 \pm 0.33	=0.01	23

PDS-paroksizmalno depolarišuće pomeranje, Ri - Ringerov rastvor, Δ - razlika između vrednosti parametara u standardnom Ringerovom rastvoru i Ringerovom rastvoru sa niskim K^+ , p - nivo značajnosti t-testa, n - za frekvencu broj minuta, za amplitudu i trajanje broj PDS na kojima je vršeno merenje. Vrednosti prikazane kao standardna greška \pm standardna greška srednje vrednosti.

Poređenje epileptiformne aktivnosti izazvane Ni^{2+} , Co^{2+} i Cd^{2+} .

Pošto smo u prethodnim ogledima pokazali da slična repetitivna aktivnost može biti izazvana i drugim prelaznim metalima, tj. Ni^{2+} i Co^{2+} [7], sada smo poredili učinke Cd^{2+} sa učincima Ni^{2+} i Co^{2+} . Cd^{2+} dovodi do nastanka repetitivne aktivnosti u mnogo nižoj koncentraciji (100 μ mol/l) nego Ni^{2+} i Co^{2+} koji su bili primenjivani u koncentraciji od 3 mmol/l. Kao što Tabela 1. i Grafikon 1. pokazuju, 30 puta manja koncentracija Cd^{2+} dovodi do nastanka PDS niže frekvencije, manje amplitude i kraćeg trajanja od onih izazvanih Ni^{2+} , dok su svi parametri veći nego kod Co^{2+} izazvane aktivnosti.

Uticaj Ringerovog rastvora sa sniženom koncentracijom K^+ na Cd^{2+} izazvanu epileptiformnu aktivnost.

U ovoj grupi ogleda smo ispitivali uticaj ekstraćelijske koncentracije K^+ na karakteristike Cd^{2+} izazvane epileptiformne aktivnosti. RNP mirovnog membranskog potencijala od -45,8 \pm 2,5 mV (n=6) prvo su tretirani sa 100 μ mol/l $CdCl_2$ u standardnom Ringerovom rastvoru. Po razvoju i stabilizaciji epileptiformne aktivnosti primenjen je 100 μ mol/l $CdCl_2$ u Ringerovom rastvoru sa sniženom koncentracijom K^+ (1 mmol/l) a zatim su mereni parametri PDS koji su prikazani u Tabeli 2. Snižena koncentracija vanćelijskog K^+ dovela je do statistički značajnog smanjenja frekvencije i produženja trajanja trajanja PDS i visoko statistički značajnog smanjenja amplitude PDS (Grafikon 2.). Reprezentativan snimak ovih ogleda prikazan je na Slici 2.

DISKUSIJA

Poznavanje mehanizama epileptogeneze predstavlja osnovu za adekvatnu terapiju epilepsija. Uprkos velikim naporima istraživača još od 60-ih godina prošlog veka, i dalje nisu poznati svi mehanizmi koji dovode do epileptogeneze [13, 14]. Neuronu bezkičmenjaka predstavlja dobar model za izučavanje ovih mehanizama, a među njima posebno mesto zauzima RNP [5]. U ovom radu ispitivali smo značaj Cd^{2+} za nastanak epileptiformne aktivnosti na modelu RNP.

Ranije je pokazano da blokada Ca^{2+} kanala jonima Ni^{2+} ili Co^{2+} kod RNP dovodi do pojave talasa tj. platoa produžene depolarizacije tokom kojih se javljaju salve akcionih potencijala [5,7]. Ovi platoi imaju sve karakter-

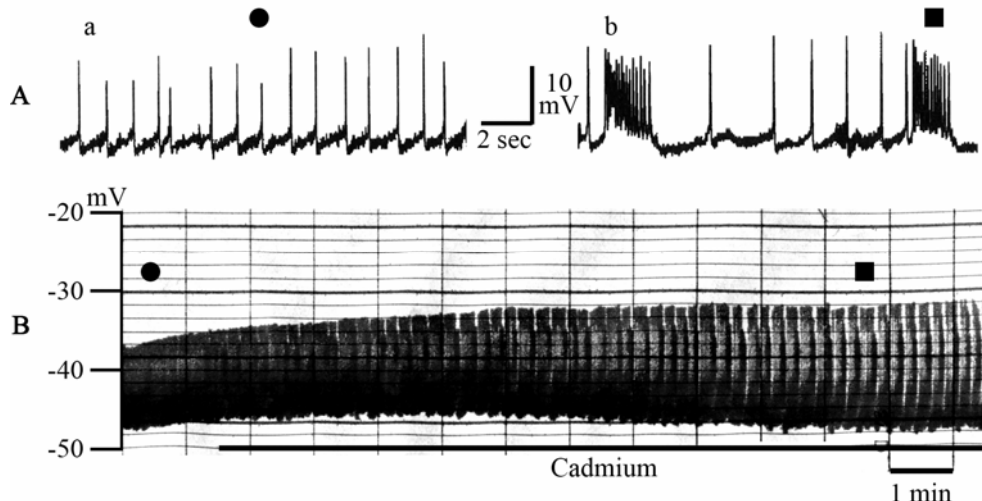
istike PDS koji predstavljaju ćelijsku osnovu epilepsije. Pretpostavljeni mehanizam nastanka PDS kod RNP je da blokada Ca^{2+} kanala dovodi do demaskiranja perzistentne Na^+ struje koja depolariša membranu RNP i dovodi do nastanka PDS [5,6]. Tome u prilog idu i nalazi da rilusol koji deluje kao blokator perzistentne Na^+ struje dovodi do inhibicije eksperimentalno izazvane epileptiformne aktivnosti motoneurona pijavice [15]. Tokom PDS dolazi do nakupljanja Na^+ i Ca^{2+} u ćeliji. Porast intraćelijske koncentracije Na^+ aktivira Na^+/K^+ pumpu, dok porast intraćelijske koncentracije Ca^{2+} aktivira Ca^{2+} -zavisne K^+ kanale. Zajedno, aktivirana pumpa i efluks K^+ kroz otvorene Ca^{2+} -zavisne K^+ kanale prevazilaze depolarizacione procese, pre svega perzistentnu Na^+ struju, i dovode do prekida PDS sa nastankom naknadne hiperpolarizacije [6]. Sledstvena normalizacija intraćelijskog jonskog miljea dalje uzrokuje smanjenje izlaznih K^+ struja, i zaustavlja aktivnost pumpe, što omogućava da perzistentna Na^+ struja ponovo deode do punog izražaja i prouzrokuje sledeći PDS.

Kako su i joni Cd^{2+} blokatori Ca^{2+} kanala [16], ispitivali smo efekte jona Cd^{2+} na membranski potencijal RNP i uticaj blokade Na^+/K^+ pumpe na taj efekat.

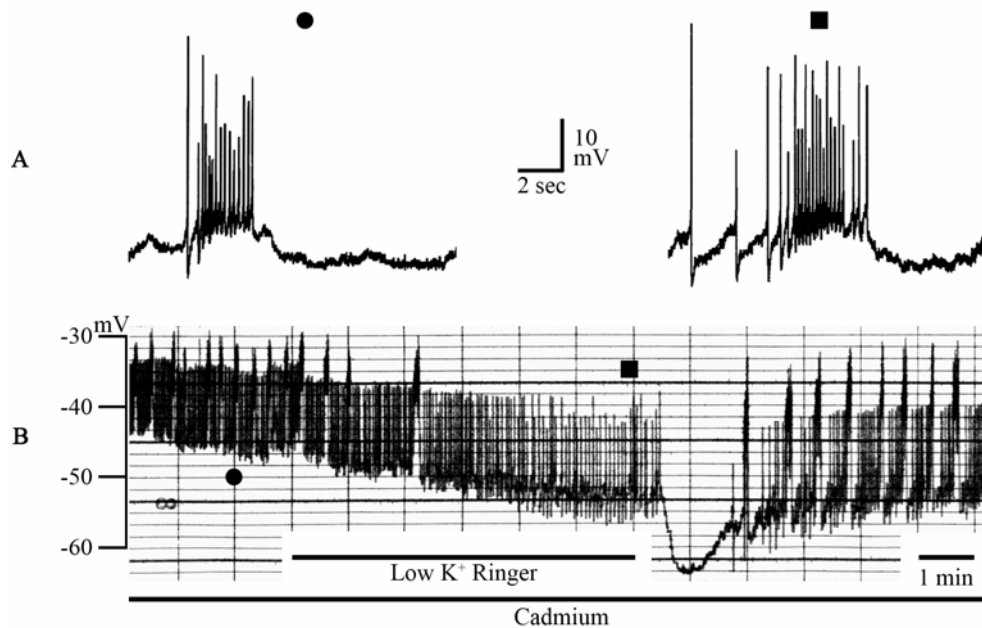
U našem radu pokazali smo da joni Cd^{2+} u koncentraciji od 100 μ mol/l dovode do pojave PDS. Karakteristike i dinamika Cd^{2+} izazvanih PDS slični su karakteristikama epileptiformne aktivnosti izazvane Ni^{2+} u koncentraciji od 3 mmol/l na istom modelu [7]. Razlog zbog koga Cd^{2+} nije takođe primenjen u dozi od 3 mmol/l je taj što je pokazano da u većim dozama Cd^{2+} može ispoljiti svoje efekte na druge jonske kanale. Naime, u visokim dozama Cd^{2+} blokira Na^+ kanale, i to posebno tetradotoksin rezistente Na^+ kanale [17] među koje spadaju i sporo inaktivišući Na^+ kanali koji leže u osnovi perzistentnih Na^+ struja. Kako se pretpostavlja da perzistente Na^+ struje predstavljaju osnovni pokretač epileptiformne aktivnosti na našem modelu, to je moguće da u višim koncentracijama Cd^{2+} blokira i sam mehanizam nastanka PDS, zbog čega bi došlo do smanjenja njegove potentnosti u ovom smislu.

Obzirom da joni Cd^{2+} u našim ogledima izazivaju epileptiformnu aktivnost u 30 puta manjoj dozi od jona Ni^{2+} ili Co^{2+} , naši rezultati ukazuju da je Cd^{2+} potentniji od pomenuta dva metala, što je u saglasnosti sa nalazima Angstadta i saradnika [6].

U izučavanjima mehanizama nastanka epileptogeneze od posebnog značaja su faktori koji dovode do



Slika 1. Aplikacija $100 \mu\text{mol/l}$ CdCl_2 indukuje epileptiformnu aktivnost RNP. Donji zapis (B) je registracija sa mehaničkog pisača, dok gornji zapisi (Aa i Ab) predstavljaju registracije sa termalnog printera osciloskopa. U standardnom Ringer-ovom rastvoru RNP spontano okidaju pojedinačne akcijske potencijale (gore levo - Aa), dok u prisustvu Cd^{2+} dolazi do razvoja oscilatorne epileptiformne aktivnosti sa ritmičnom pojavom PDS (gore desno - Ab)



Slika 2. Rastvor sa niskom koncentracijom K^+ (1 mmol/l) usporava Cd^{2+} -indukovanu epileptiformnu aktivnost RNP. Donji zapis (B) je registracija sa mehaničkog pisača, dok gornji zapisi (Aa i Ab) predstavljaju registracije sa printera osciloskopa. Po indukciji epileptiformne aktivnosti primenom Cd^{2+} , ispiranje preparata rastvorom sa niskim sadržajem K^+ dovodi do smanjenja frekvencije i amplitude indukovanih PDS i produžava njihovo trajanje (gore desno Ab), u poređenju sa kontrolom (gore levo Aa). U toku oglada sve vreme je održavano prisustvo Cd^{2+} u rastvoru

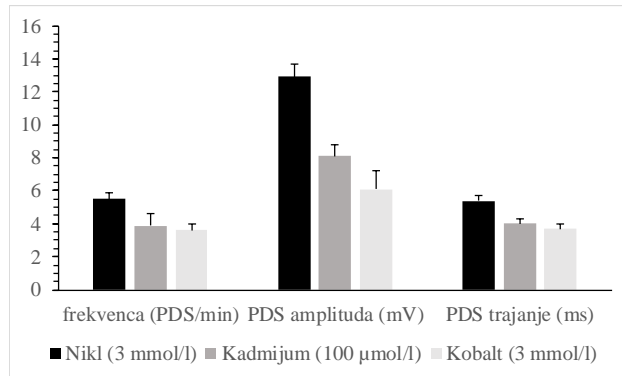
zaustavljanja ovog procesa, pre svega zbog potencijalne primene u terapiji epilepsija [18,19]. Kao što je već diskutovano, jedan od pretpostavljenih mehanizama koji dovode do prestanka PDS-a i nastanka repolarizacije membrane je aktivacija Na^+/K^+ pumpe. Na ovaj zaključak ukazuje produženje trajanja PDS-ova prilikom blokiranja pumpe uabainom [5]. Kako uabain dovodi do nagomilavanja intracelularnog Na^+ , njegova primena može dovesti do aktivacije Na^+ zavisnih K^+ kanala ili drugih Na^+ zavisnih procesa koji mogu igrati ulogu u zaustavljanju epileptiformne aktivnosti. Zbog toga smo se mi opredelili za blo-

kadu pumpe niskim koncentracijama vanćelijskog K^+ , pošto je dokazano da se na ovaj način može suprimirati aktivnost pumpe za 50% ili više [11], a bez aktivacije drugih procesa od značaja za epileptoidnu aktivnost na našem modelu [6].

Naši rezultati pokazuju da se primena Ringerovog rastvora sa niskim koncentracijama K^+ statistički značajno menja karakteristike Cd^{2+} izazvane epileptiformne aktivnosti u smislu produženja trajanja PDS, tj. da blokada pumpe remeti proces prekidanja epileptiformne aktivnosti. Smanjenje frekvencije PDS je najverovatnije

funkcija njihovog produženog trajanja, dok se smanjenje amplitude PDS može objasniti smanjenjem elektrohemijske vučne sile za Na^+ zbog intraćelijskog nakupljanja Na^+ usled produženog trajanja PDS.

Grafikon 1. Uporedni prikaz parametara PDS izazvanih primenom Ni^{2+} , Cd^{2+} i Co^{2+}



Error barovi predstavljaju standardnu grešku srednje vrednosti

Najzad treba pomenuti potencijalni značaj ovih istraživanja u humanoj patologiji. Prisustvo perzistentne Na^+ struje, za koju se pretpostavlja da stoji u osnovi epileptiformne aktivnosti na našem modelu, dokazano je u hipokampalnim i kortikalnim neuronima sisara [20,21]. Štaviše, ovi neuroni pokazuju oscilacije membranskog potencijala i epileptiformnu aktivnost kada se izlože rastvorima sa niskom koncentracijom Ca^{2+} [22]. Od blokatora Ca^{2+} kanala prisutnih u životnoj sredini Cd^{2+} zaslužuje posebnu pažnju. Epidemiološke studije su pokazale da je veliki deo populacije stalno izložen toksičnom delovanju Cd^{2+} u radnoj i životnoj sredini, preko vode, hrane i naročito cigareta, kao i da Cd^{2+} dovodi do neuroloških poremećaja [23]. U kontekstu naših istraživanja posebno je interesantno da ponavljana primena Cd^{2+} kod pacova

dovodi do promena u spontanoj aktivnosti korteksa sa povećanjem frekvencije talasa na elektrokortikogramu [24] kao i do pojave epileptiformne aktivnosti na EEG-u [25].

ZAKLJUČAK

U ovom radu smo, po prvi put na modelu RNP *Haemaphysalis sanguisuga*, ispitivali uticaj Cd^{2+} na nastanak epileptiformne aktivnosti, kao i uticaj Na^+/K^+ pumpe u procesima koji utiču na intenzitet ove aktivnosti. Naši rezultati pokazuju da je Cd^{2+} vrlo potentan uzročnik repetitivne električne aktivnosti neurona, koji u koncentraciji 30 puta manjoj od Ni^{2+} ili Co^{2+} dovodi do izražene promene spontane električne aktivnosti neurona u smislu nastanka PDS, koji predstavljaju ćelijsku osnovu epileptogeneze. Takođe smo pokazali da Na^+/K^+ pumpa bitno utiče na parametre ove aktivnosti i ima potencijalno važnu ulogu u mehanizmima koji dovode do prekida PDS.

Uzimajući u obzir sve veći stepen populacione izloženosti toksičnom delovanju Cd^{2+} , kao i mehanizme epileptogeneze uopšte, smatramo da su neophodna dalja istraživanja na resvetljavanju punog obima efekata Cd^{2+} kao i tačnog mehanizma njegovog delovanja.

LITERATURA

- Matsumoto H. Intracellular events during the activation of cortical epileptiform discharges. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1964;17:294-307.
- Altrup U. Epileptogenicity and epileptic activity: mechanisms in an invertebrate model nervous system. *Curr Drug Targets.* 2004;5(5):473-84.
- Zeraatpisheh Z, Vatanparast J. Eucalyptol induces hyperexcitability and epileptiform activity in snail neurons by inhibiting potassium channels. *Eur J Pharmacol.* 2015; 764:70-8.
- Vatanparast J, Andalib-Lari F. Camphor elicits epileptiform discharges in snail neurons: The role of ion channels modulation. *NeuroToxicology.* 2015; <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.012>
- Angstadt JD, Friesen WO. Synchronized oscillatory activity in leech neurons induced by calcium channel blockers. *J Neurophysiol.* 1991;66:1858-73.
- Angstadt JD, Choo JJ, Saran AM. Effects of transition metal ions on spontaneous electrical activity and chemical synaptic transmission of neurons in the medicinal leech. *J Comp Physiol. A.* 1998;182:389-401.
- Stanojevic M, Lopovic S, Jovanovic Z, Pathak D, Pavlovic D, Spasic S, Nedeljkovic V, Prostran M. Magnesium effect on nonsynaptic epileptiform activity in leech *Retzius* neurons. *Folia Biologica (Krakow).* 2015;63:301-6.
- Marley R, Baines R. Increased persistent Na^+ current contributes to seizure in the slamdance bang-sensitive *Drosophila* mutant. *J Neurophysiol.* 2011;106(1):18-29
- Mehranfard N, Gholamipour-Badie H, Motamedi F, Janahmadi M, Naderi N. Long-term increases in BK potassium channel underlie increased action potential firing in dentate granule neurons following pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Neurosci Lett.* 2015;585:88-91.
- N'Gouemo P. Targeting BK (big potassium) channels in epilepsy. *Expert Opin Ther Targets.* 2011;15(11):1283-95.

11. Skou JC, The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺/K⁺-pump. FEBS Lett.1990;268:314-24.
12. Beleslin B. Effects of different external media on the leech ganglion cells interaction.Period. Biol. 1971;73:63-7.
13. Lasoń W, Chlebicka M, Rejdak K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. Pharmacol Rep. 2013;65(4):787-801.
14. Stafstrom CE, Carmant L. Seizures and epilepsy: An Overview for neuroscientists. Cold Spring Harb Perspect Med. 2015;5:a022426.
15. Crisp KM, Gallagher BR, Mesce KA. Mechanisms contributing to the dopamine induction of crawl-like bursting in leech motoneurons. J Exp Biol. 2012;215:3028-36.
16. Viarengo AS, Nicotera P. Possible role of Ca²⁺ in the heavy metal cytotoxicity. Comp. Biochem. Physiol. 1991;100:81-4.
17. Leffler A, Herzog R I, Dib-Hajj SD, Waxman SG, Cummins TR. Pharmacological properties of neuronal TTX-resistant sodium channels and the role of a critical serine pore residue Pflugers Arch. 2005;451(3):454-63.
18. Lin W, He M, Baines R. Seizure suppression through manipulating splicing of a voltage-gated sodium channel. Brain. 2015;138(4):891-901.
19. Anderson L, Thompson C, Hawkins N, Nath R, Petersohn A, Rajamani S et al. Antiepileptic activity of preferential inhibitors of persistent sodium current. Epilepsia. 2014;55(8):1274-83.
20. Ren S, Chen P, Jiang H, Mi Z, Xu F, Hu B, et al. Persistent sodium currents contribute to AB1-42-induced hyperexcitation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. Neurosci Lett. 2014;580:62-7.
21. Seigneur J, Timofeev I. Synaptic impairment induced by paroxysmal ionic conditions in neocortex. Epilepsia. 2011;52:132-9.
22. Wang T, Wang J, Cottrell JE, Kass IS. Small physiologic changes in calcium and magnesium alter excitability and burst firing CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slices. J Neurosurg Anesthesiol. 2004;16:201-9.
23. Wang B, Du Y. Cadmium and Its Neurotoxic Effects. Oxid Med Cell Longev. 2013;2013:1-12.
24. Papp A, Oszlanczi G, Horváth E, Paulik E, Kozma G, Sápi A, Kónya Z, Szabó A. Consequences of subacute intratracheal exposure of rats to cadmium oxide nanoparticles: Electrophysiological and toxicological effects. Toxicol Ind Health. 2012;28:933-41.
25. Vataev SI, Malgina NA, Oganessian GA, The effect of cadmium on the structure of the circadian cycle of waking-sleep and on the EEG in Wistar rats. Zh Evol Biokhim Fiziol. 1994;30(3):408-19.

ENGLISH

EFFECT OF LOW POTASSIUM CONCENTRATION ON CADMIUM INDUCED EPILEPTIFORM ACTIVITY OF LEECH RETZIUS NEURONS

Milićević Nebojša¹, Stanojević Marija², Spasić Svetolik², Jovanović Zorica³, Prostran Milica⁴, Lopičić Srđan²

¹ University of Pristina, Faculty of Medicine, Department of Pathological Physiology - Kosovska Mitrovica, Serbia

² University of Belgrade, Faculty of Medicine, Institute for Pathological Physiology „Ljubodrag Buba Mihailović“ - Belgrade, Serbia

³ University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pathological Physiology - Kragujevac, Serbia

⁴ University of Belgrade, Faculty of Medicine, Institute for Pharmacology, Clinical Pharmacology and Toxicology - Belgrade, Serbia

SUMMARY

Epilepsies have a large significance and require detailed investigation of cellular mechanisms that lead to this disorder. Environmental, especially industrial, toxins are having increasingly more prominent role in these investigations. The aim of our research was to investigate the significance of Cd²⁺ in generation of epileptiform electrical activity of neurons, and the role of Na⁺/K⁺ pump in mechanisms that lead to cessation of this activity. Experiments were performed on Retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. Intracellularly placed microelectrodes were used to measure membrane potential changes upon administration of Cd²⁺ (100 μmol/l), and the same concentration of Cd²⁺ in low K⁺ (1 mmol/l) solution. In our experiments Cd²⁺ led to generation of rhythmic repetitive oscillatory activity. This activity closely resembles paroxysmal depolarizing shifts (PDS) which represent the cellular basis of epilepsy. Cd²⁺ induced epileptiform activity had the following characteristics: frequency of 3.9±0.8 PDS/minute, PDS duration of 4.0±0.3 s, and PDS amplitude of 8.1±0.7 mV. Cd²⁺ induces effects similar to those of Ni²⁺ and Co²⁺, but in 30 times smaller concentration. Application of Cd²⁺ in low K⁺ solution led to a significant reduction of PDS frequency (by 2.34±0.55 PDS/minute, p<0.05, Student's t-test), highly significant increase in PDS duration (by 2.84±0.23 s, p<0.01, Student's t-test) and highly significant reduction in PDS amplitude (by 1.91±0.33 mV, p=0.01, Student's t-test). Our results show that Cd²⁺ is a potent initiator of epileptiform activity, and that Na⁺/K⁺ pump significantly affects this activity and has a potentially important role in mechanisms that lead to its cessation. Keywords: epilepsy, Na⁺/K⁺ pump, leech