

Uticaj dimetil-sulfoksida na kondukciju signala u nervnoj ćeliji

*Normalan rad nervne ćelije je od suštinskog značaja za rad organizma kao celine. Skorija istraživanja ukazuju na analgetičke osobine dimetil-sulfoksida (DMSO). Ovo istraživanje se bavi ispitivanjem efekata DMSO na nervnu transmisiju kroz uočavanje promena u perifernim nervima. Brzina i amplituda akcionog potencijala su mereni osciloskopom, pri čemu je kao model sistem korišćen scijatični nerv zelene žabe (*Rana esculenta*). Uzorci su tretirani vodenim rastvorima DMSO u rasponu od 0.1 do 1.1%. Rezultati pokazuju da blokada nerva zavisi od primenjene doze DMSO. Koncentracije preko 0.9% izazivaju konduktivni blok. Pretpostavlja se da DMSO blokira kalijumove kanale, čime smanjuje provodljivost nervnog impulsa.*

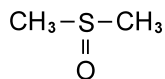
Uvod

Nervni signali se prenose akcionim potencijalima koji predstavljaju brze promene membranskog potencijala. Stadijumi akcionog potencijala su stadijum depolarizacije, repolarizacije i hiperpolarizacije. Neophodan učesnik u uzrokovanju repolarizacije su voltažno-zavisni kalijumovi kanali. Tokom stanja mirovanja kalijumov kanal je zatvoren, a pri promeni voltaže dolazi do konformacionog otvaranja kanala i povećane difuzije kalijuma. Voltažno-zavisni kalijumov kanal (Kv) ima šest transmembranskih regiona: S1-S6. Četiri subjedinice okružuju centralnu poru, a između poslednja dva regiona nalazi se hidrofobni selektivni filter (P). Deo kanala koji je osetljiviji na promene voltaže jeste S4 region i on sadrži pozitivno naelektrisane aminokiseline Gly-Tyr-Gly koje privlače nukleofile (<http://www.neuro.wustl.edu>).

Dimetil-sulfoksid (slika 1) pripada grupi organskih jedinjenja sa sumporom. U ovom molekulu atom sumpora je vezan za elektronegativniji kiseonik pa zbog slobodnog elektronskog para ovo jedinjenje ima nukleofilni karakter. DMSO je izrazito polarni, alifatični rastvarač koji ima visoku vrednost dielektrične konstante. Koristi se u eksperimentalnoj toksikologiji i farmakologiji, u *in vivo* i *in vitro* eksperimentima i kao rastvarač za hidrofobne supstance (<http://www.dms.org>). Utiče na propustljivost membrane, membranski transport, vazodilataciju, izaziva mišićnu relaksaciju i nervnu blokadu (analgeziju). Kliničke studije o upotrebi DMSO-a pokazale su da 6% DMSO smanjuje brzinu provođenja išijadičnog nerva za 40% (Evans *et al.* 1992). Uticaj DMSO-a na brzinu provodljivosti nervnog impulsa nije do kraja razjašnjen. Smatra se da dolazi do redukcije brzine nervnog impulsa, a jedno od mogućih objašnjenja jeste to da produžena depolarizacija membrane olakšava inaktivaciju natrijumovih kanala i kao rezultat toga dolazi do usporavanja akcionog potencijala (Evans *et al.* 1992). Dalja istraživanja su pokazala da je koncentracija DMSO-a neophodna za blokadu mišićnog refleksa neuro-mišićnog preparata žabe oko 50% (Davis 1967). Pretpostavlja se da se mehanizam delovanja DMSO-a zasniva na inhibiciji i blokadi voltažno-zavisnih K-kanala. DMSO smanjuje membranske konduktanse usporavajući repolarizaciju akcionog potencijala. "Voltage clamp" studije su pokazale da DMSO usporava tok kalijumovih struja smanjujući protok jona kalijuma kroz kanale (Evans *et al.* 1992). Eksperimentalno je utvrđeno da koncentracija DMSO-a oko 2% ne dovodi do strukturnih promena u išijadičnom nervu pacova, a kod tretiranja 7.2% DMSO-om primećeno je oštećenje mijelinskog omotača (Cavaletti 2000).

Marija Raković (1986), Lazarevac, Kolubarski trg 36A, učenica 4. razreda Gimnazije u Lazarevcu

Struktura DMSO izgleda:



Cilj rada je određivanje neurofizioloških promena u perifernim nervima indukovanih primenom različitih koncentracija DMSO.

Materijal i metode

Kao eksperimentalni model korišćene su žabe vrste *Rana esculenta* L. Žabe su sakupljane u periodu od 6. do 15. avgusta 2005. godine na Petničkom jezeru. Za izvođenje eksperimenta uzeto je deset žaba približno iste veličine, težine 80-100 gr i iz njih je izolovan *nervus ishiadicus* od lumbalnog pleksusa od kolenskog zgloba (Nešić 2000).

Priprema Ringerovog fiziološkog rastvora za žabu

Ringerov rastvor za žabu sadrži: 120 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM CaCl₂ i 5 mM TRIS-HCl. Napravljen je 1 L rastvora pH 7.4.

Pravljenje rastvora dimetil-sulfoksida

Za ispitivanje uticaja dimetil-sulfoksida na kondukciju signala u nervnoj ćeliji napravljeno je po 100 mL rastvora sledećih koncentracija: 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9% i 1.1% DMSO-a.

Merenje komponenti akcionog potencijala

Za elektrofiziološka merenja korišćeni su elektonski stimulator (SMR-01) i osciloskop (Tetronix, type 502 A, Dual Beam oscilloscope) koji su povezani sa komorom za registrovanje. Komora sadrži pet srebrnih elektroda preko kojih su postavljani preparati tako da se svaka promena može beležiti na osciloskopu. Na stimulatoru su podešeni frekvencija na 40 Hz, trajanje signala na 0.2 ms, a kašnjenje na 1.5 ms. Vrednosti intenziteta praznog stimulusa kretale su se od 1 do 2 V, a supramaksimalnog 2 do 3 V.

Za svaku koncentraciju rastvora DMSO-a merene su brzina i amplituda akcionog potencijala *n. ischiadicus*-a. Brzina se računa na osnovu formule (Nešić 2000):

$$v = s/t,$$

gde je v – brzina propagacije, s – pređeni put (16 mm u korišćenom sistemu), a t – vremenski interval između mesta stimulacije i vrha talasa prve faze zapisa akcionog potencijala na ekranu osciloskopa.

Vreme i brzina su varijable i zavise od intenziteta stimulusa koji se podešava na stimulatoru i od prirode nervnog vlakna. Pre svakog merenja, nerv je stavljen u komoru za registrovanje i očitane su vrednosti brzine i amplitude koje su korišćene kao kontrolne. Potom je stavljen u Petri šolju sa rastvorom DMSO-a gde je držan 2 minuta. Posle toga je nerv ponovo postavljen u komoru i vrednosti komponenti akcionog potencijala (brzina i amplituda) su očitavane nakon desetog minuta. Ovaj period, kao i period inkubacije od 2 minuta utvrđen je predeksperimentalnim merenjima. Isti postupak je ponovljen za svaku koncentraciju.

Neurofiziološke promene praćene su i kroz promene u vrednostima amplitude i na osnovu njih je izračunat konduktivni blok.

$$\text{Konduktivni blok} = ((V_{\text{control}} - V)/V_{\text{control}}) \times 100$$

gde je V_{control} – amplituda signala pre tretiranja rastvorom DMSO-a, a V – amplituda signala posle tretiranja rastvorom DMSO-a.

Rezultati i diskusija

Vrednosti dobijenih brzina za prazne i za supramaksimalne stimuluse nalaze se u tabeli 1. Podaci iz tabele pokazuju da koncentracija rastvora 0.1% DMSO-a pri praznom stimulusu smanjuje brzinu provođenja akcionog potencijala na 74.13%, a pri supramaksimalnom stimulusu brzina se smanjuje na 78.66%. 0.3% DMSO smanjuje brzinu provođenja pri praznom stimulusu na 66.63%, a pri supramaksimalnom stimulusu na 79.16%, dok 0.5% DMSO smanjuje brzinu na 49.92% pri praznom i na 66.02% pri supramaksimalnom. Brzina akcionog potencijala posle tretiranja 0.7% DMSO-om pri praznom stimulusu se smanjuje na 50%, a pri supramaksimalnom na 58.33%. Pri koncentracijama rastvora DMSO od 0.9% i 1.1% postignut je konduktivni blok, tako da preparat nije mogao da se pobudi ni praznim ni supramaksimalnim stimulusom. To se potvrđuje činjenicom da se prilikom očitavanja javlja samo artefakt koji povećanjem intenziteta stimulusa raste, a signal koji opisuje akcioni potencijal se ne javlja.

Na osnovu podataka iz tabele 1 nacrtan je grafikon (slika 1).

Tabela 1. Vrednosti brzina akcionih potencijala za pražne i supramaksimalne stimuluse

ponavljanje	koncentracija DMSO-a [%]	brzina za pražne stimuluse [mm/ms]		relativna brzina [%]	brzina za supramaksimalne stimuluse [m/s]		relativna brzina Š[%]
		pre tretiranja	posle tretiranja		pre tretiranja	posle tretiranja	
	0.1			25.87			21.34
1		80	53.3		80	64	
2		80	64		80	64	
3		80	53.3		80	53.3	
4		64	53.3		72.72	64	
	0.3			33.37			20.84
1		80	53.3		80	64	
2		80	53.3		80	64	
3		80	53.3		80	53.3	
4		80	53.3		80	72.72	
	0.5			50.08			33.98
1		106.67	53.3		80	59.26	
2		80	53.3		80	64	
3		106.67	64		133.3	80	
4		80	61.54		160	80	
	0.7			50			41.67
1		160	80		160	80	
2		160	80		160	106.67	
3		160	80		160	80	
4		160	80		160	106.67	

Na osnovu krivih zavisnosti može se zaključiti da sa povećanjem koncentracije rastvora DMSO dolazi do očekivanog smanjenja brzine kondukcije signala u nervnoj ćeliji, dok se pri tretiranju preparata koncentracijama 0.9 i 1.1% javlja blok u provođenju. Dobijeni rezultati mogu ukazati na inhibitorno dejstvo DMSO na K^+ -kanale, kao i na to da može doći do produžene depolarizacije membrane i inaktivacije natrijumovih kanala, jer i ove pojave vode ka usporavanju akcionog potencijala (Evans *et al.* 1992).

Vrednosti amplituda su očitavane uporedno sa vrednostima brzina kako pri pražnom, tako i pri supramaksimalnom stimulusu za sve koncentracije osim za 0.9% i 1.1% DMSO jer su ove koncentracije izazvale blok i signal nije zabeležen. Vrednosti am-

plituda pri pražnom i supramaksimalnom stimulusu date su u tabeli 2.

Na osnovu podataka iz tabele zaključuje se da 0.1% DMSO pri pražnom stimulusu smanjuje amplitudu provođenja akcionog potencijala na 65%. Pri supramaksimalnom stimulusu ista koncentracija smanjuje amplitudu na 98.99%. Amplituda pri pražnom stimulusu za koncentraciju od 0.3% DMSO-a se smanjuje na 50%, a pri supramaksimalnom stimulusu na 71.36%. 0.5% DMSO smanjuje amplitudu na 56.66% pri pražnom, a na 78.8% pri supramaksimalnom stimulusu. Koncentracija DMSO-a od 0.7% smanjuje amplitudu na 54.18% pri pražnom stimulusu, odnosno na 62.64% pri supramaksimalnom stimulusu.

Tabela 2. Vrednosti amplituda akcionih potencijala za pražne i supramaksimalne stimuluse

ponav ljanje	koncentracija DMSO-a [%]	amplituda za pražne stimuluse [mV]		relativna amplituda [%]	amplituda za supramaksimalne stimuluse [mV]		relativna amplituda [%]
		pre tretiranja	posle tretiranja		pre tretiranja	posle tretiranja	
0.1							
1	1	0.7	35	4	3.7	11.01	
2	1	0.5		4	3.5		
3	1	0.5		5	4		
4	1	0.9		4.5	4.3		
0.3							
1	1	0.5	50	4	5	28.64	
2	1	0.5		4	4.5		
3	1	0.5		5.5	4		
4	1	0.5		5	3.5		
0.5							
1	1	0.6	43.34	3.5	3.5	21.2	
2	0.75	0.5		4.5	4		
3	1	0.5		4	3.5		
4	1	0.5		5	3		
0.7							
1	0.75	0.5	45.82	3.5	2	37.36	
2	1	0.5		3	2		
3	1	0.5		5	3		
4	1	0.5		4.5	3		

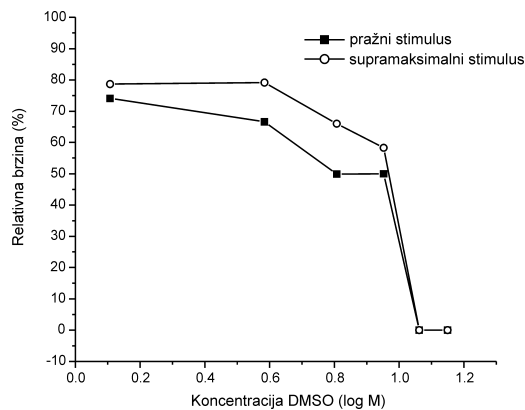
Dobijene vrednosti amplituda i njihovih promena prikazane su na slici 2.

Krive zavisnosti pokazuju da sa porastom koncentracije rastvora DMSO opada vrednost amplitude akcionog potencijala do konduktivnog bloka koji se javlja kod tretiranja preparata 0.9 i 1.1% DMSO-om.

Zaključak

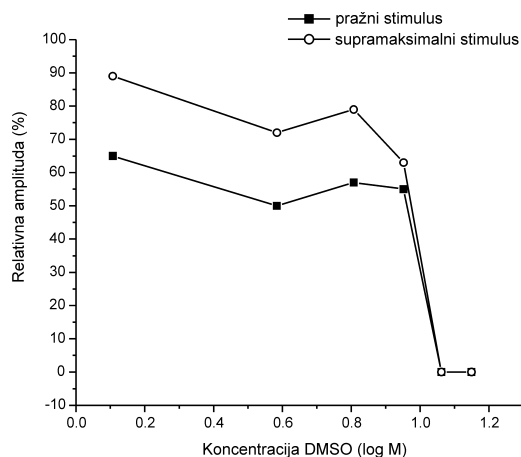
Dimetil-sulfoksid je pokazao određeni uticaj na kondukciju signala u nervnoj ćeliji. Taj uticaj se može zasnovati na inhibiciji voltažno-zavisnih kalijumovih kanala ili na izazivanju produžene depolarizacije što dovodi do smanjenja vrednosti komponenti akcionog potencijala. Može se zaključiti da se vred-

nosti brzina i amplituda provođenja nervnog impulsa kako pri pražnom tako i pri supramaksimalnom stimulusu smanjuju sa povećanjem koncentracije rastvora DMSO sve do bloka. Konduktivni blok postignut je posle tretiranja preparata 0.9% i 1.1% DMSO. Na osnovu gore dobijenih rezultata može se pretpostaviti da DMSO kao nukleofilni reagens vezivanjem za voltažno-zavisni K-kanal izaziva konformacione promene kanala koje dovode do njegovog postepenog zatvaranja i redukcije provodljivosti nervnog impulsa kroz isti kanal. Utvrđeno je da DMSO izaziva neurofiziološke promene u perifernim nervima, ali da bi se postigao bolji uvid u te procese potrebna su učestalija merenja i složeniji tehnički pristup koji bi obuhvatao i određene citohistološke metode.



Slika 1. Krive zavisnosti brzine akcionog potencijala od logaritma koncentracije DMSO-a pri praznim i supramaksimalnim stimulusima

Figure 1. Dependence of action potential speed from logarithm of DMSO concentration at threshold and supramaximal stimuli



Slika 2. Krive zavisnosti amplitude akcionog potencijala od logaritmovane koncentracije DMSO-a pri praznim i supramaksimalnim stimulusima

Figure 2. Dependence of action potential amplitude from logarithm of DMSO concentration at threshold and supramaximal stimuli

Literatura

Cavaletti G., Oggioni N., Sala, F., Pezzoni G., Cavalletti Marmiroli P., Petruccioli M. G., Frattola L., Tredici G. 2000. Effect on peripheral nervous system of systematically administered dimethylsulfoxide in the rat: a neurophysiological and pathological study. *Toxicology Letters*, **118**: 103-107

Davis H. L., Davis, N.L., Clemons, A. L. 1967. Procoagulant and nerve-blocking effects of DMSO. *Ann.N.Y. Acad Sci*, **141**: 310-325

Evans M. S., Reid K. H., Sharp J. B. 1992. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Blocks Conduction in Peripheral Nerve C Fibers: a Possible Mechanism of Analgesia. *Neurosci. Lett.* **150** (2): 145-8

Nešić O., Antić S., Gašić-Milenković J., Radenović L., Anđus P. 2000. *Eksperimentalna fiziologija I sa praktikumom. Beograd: Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu*

<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/chan.html#k>

<http://www.dmsol.org/subLevels/what.htm>

Marija Raković

Influence of Dimethyl Sulfoxide on Nerve Cell Signal Transduction

Normal functioning of the nerve cell is very important for normal functioning of the whole organism. Many different factors affect nerve transmission. Recent studies propose analgetic characteristics of dimethyl-sulfoxide (DMSO). This study investigated effects of DMSO on nerve transmission through observing neurophysiological changes in peripheral nerves. Velocity and amplitude of the action potential were measured by oscilloscope using frog sciatic nerve as the model system. Samples were treated with 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7%, 0.9% and 1.1% DMSO. The results show dose-dependant particular or total inhibitory effects of DMSO on nerve transmission and some neurophysiological changes. Concentration higher than 0.9% induce conductive blockade. Presumably, DMSO interacts with potassium channels, thus lowering the nerve conductance.