

Ispitivanje uticaja galne kiseline na nervno-mišićnu sinapsu

Ispitivan je uticaj galne kiseline na akcioni potencijal u nervno-mišićnoj sinapsi. Kao model-sistem je korišćen nervno-mišićni preparat barske žabe (Rana Esculenta). Meren je akcioni potencijal nerva i mišića. Korišćena je galna kiselina u rasponu koncentracija od 0.5 do 5 mM. Za poređenje efekta je korišćen kalcijumski antagonist Cortiazem retard. Pokazano je da galna kiselina pri svim koncentracijama snižava akcioni potencijal nerva, kao i da je efekat pri koncentracijama 3.24 ± 1.41 mM uporediv sa efektom Cortiazem-a. Ispitivanjem je utvrđeno da galna kiselina vezuje ekstracelularni kalcijum iz nervno-mišićne sinapse i na taj način remeti konduktivnost sinapse, što predstavlja novi podatak u neurofiziologiji i može biti od značaja za dalja istraživanja.

Uvod

Nervno-mišićna sinapsa je mesto prenosa akcionog potencijala nervnog impulsa sa terminalnog dugmeta nerva na mišić. Prenos se odvija otpuštanjem određene količine neurotransmitera iz presinaptičkog dela nerva. Neurotransmitter prenosi informaciju o akcionom potencijalu na mišićnu ćeliju i time omogućava provodjenje signala efektorskom organu.

U funkcionisanju sinapse važnu ulogu igra kalcijum. Ekstracelularni kalcijum nakon otvaranja kalcijum-selektivnih voltažno-zavisnih kanala ulazi u presinaptički deo nerva. Ovi kanali se otvaraju pri promeni potencijala membrane koja je izazvana akcionim potencijalom. Otvaranje kalcijum-selektivnih voltažnih kanala stvara kaskadnu reakciju koja

omogućava ispuštanje neurotransmitera u sinaptičku pukotinu.

Tanini su složena, polifenolna jedinjenja bez azota, molekulske mase od 500 do 3000. Na osnovu gradivnih jedinica i hemijske prirode, mogu se izdvojiti dve osnovne grupe tanina: hidrolizirajući (pirogalni) i kondenzovani (katehinski) tanini.

Uticaj kondenzovanih tanina iz zelenog čaja na enzime koji učestvuju u inhibiciji neurotransmitera ispitan je na seminaru humane biohemije 2005 godine (Tomić 2005). U svetlu ranijih istraživanja (Kim 2004, Hillhouse 2004), u ovom radu smo pretpostavili da i hidrolizirajući tanini zbog svoje grade mogu imati uticaja na konduktivnost neuromišićne sinapse.

Galna kiselina, ili 3,4,5 trihidrobenzoeva kiselina, osnovni je gradivni molekul hidrolizirajućih tanina. Usled prisustva nekoliko kiseonikovih atoma koji doprinose negativnom naelektrisanju ovog molekula moguće je vezivanje pozitivnih metalnih jona, kao što su joni kalcijuma ili magnezijuma (Grujić-Injac 1983). Joni kalcijuma u sinapsi su ekstracelularni, tako da postoji mogućnost da se vežu za dodatu galnu kiselinu, što bi moglo da se uoči promenama u provođenju akcionog potencijala.

Cilj ovog istraživanja je kvalitativno i kvantitativno određivanje dejstva galne kiseline na provođenje akcionog potencijala kroz nervno-mišićnu sinapsu.

Materijal i metode

Kao model sistem korišćen je nervno-mišićni preparat žabe (*n. ischiadicus* sa *m. gastrocnemius*). Izolovanje nerva vršeno je po standardizovanom protokolu (www.biopac.com). Tokom izolacije preparat je prelivan Ringerovim rastvorom da bi se održala fiziološka aktivnost. Za vreme rada preparati su čuvani u Ringerovom rastvoru na sobnoj temperaturi na tamnom mestu.

Tijana Jevtić (1987), Valjevo, Suvoborska 45/b, učenica 4. razreda Valjevske gimnazije

Korišćen je Ringerov rastvor sastava 120 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 5 mM Tris-HCl u destilovanoj vodi.

Korišćeni Ringerov rastvor je modifikovan u odnosu na standardni Ringerov rastvor, jer je zbog specifičnosti eksperimenta neophodno da ne sadrži jone kalcijuma.

Rastvori galne kiseline pravljani su u modifikovanom Ringerovom rastvoru.

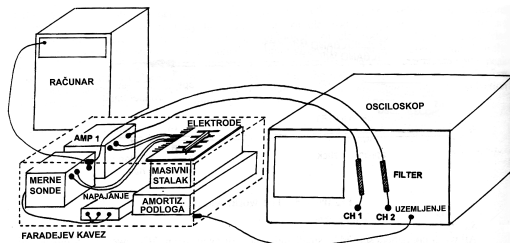
Kao referentni standard korišćen je komercijalni lek Cortiazem retard®, koji je antagonist kalcijuma. Zajedničko za sve komercijalne antagoniste kalcijuma je mehanizam delovanja koji se ogleda u blokiranju receptora na površini ćelije.

Kadica za merenje akcionog potencijala postavljena je na masivni stalak (slika 1). Prve dve, od pet bakarnih žica u kadici, povezane su sa stimulatornim osciloskopom. Nerv je stimulisan pravougaonim signalom naizmenične struje amplitude 300-400 mV i frekvencije 1.5 kHz. Stimulus je trajao 100 ms (Drewes 1999).

Standardne osciloskopske merne sonde povezane su sa preostale tri žice tako da je između dve koje mere voltažu postavljeno uzemljenje. Nedostatak korišćenih sondi je visok nivo generisanog šuma. Nivo šuma je oslabljen postavljanjem celokupne aparature u Faradejev kavez.

Kako nivo generisanog šuma nije bio dovoljno oslabljen za kvalitetnu obradu rezultata, pre dalje analize signal je filtriran.

Pošto je realizacija efikasnog filtera jednostavnija ako je signal diskretizovan po vremenu i amplitudi, odnosno ako je reč o digitalnom signalu, neophodno je konvertovati signale sa mernih sondi. U tu svrhu



Slika 1. Skica aparature

Figure 1. Instrumental setup

je korišćena osmobitna kartica GageScope, koja predstavlja A/D konvertor. Kartica ima mogućnost podešavanja dinamičkog opsega ulaznog analognog signala, tako da je moguće u nekoj meri kompenzovati kvantizacione efekte koji su posledica nedovoljnog broja bita za digitalnu predstavu vrednosti merenog signala. Učestanost odabiranja (engl. *sample rate*) od 1 MHz je sasvim dovoljna za efikasnu obradu signala.

Filter je realizovan u programskom paketu Matlab 6.5 korišćenjem njegovog sastavnog dela za dizajn i analizu digitalnih filtera (*Filter Design and Analysis Tool*). Pošto je bilo potrebno eliminisati visokofrekventni šum, korišćen je niskofrekventni filter.

Pri merenju preparat je postavljan u kadicu tako da nerv naleže na dve stimulatorne, jednu mernu žicu, i uzemljenje, dok je na drugu mernu žicu postavljan mišić. Akcioni potencijal je meren u odnosu na uzemljenje. Prva sonda beleži napon nerva, a druga napon između tačke na nervu i mišiću (Drewes 1999).

Sinaptički prenos akcionog potencijala, kao i sam akcioni potencijal, specifični su za različite jedinice i nervno-mišićne preparate. Za različite nervno-mišićne preparate žabe opseg amplitude akcionog potencijala varira za 0.006 mV, što nije zanemarljivo u odnosu na srednju vrednost od 0.024 mV.

Iz tih razloga akcioni potencijal svakog preparata meren je dva puta i to:

- prvo merenje je kontrolno merenje preparata
- drugo merenje je merenje preparata tretiranog odgovarajućim rastvorom.

Nakon kontrolnog merenja preparat je postavljan u neprozirnu posudu sa pripremljenim rastvorom supstance, gde je inkubiran 3 minuta na sobnoj temperaturi (Sivoňová *et al.* 2004).

Korišćene su koncentracije galne kiseline od 5, 2.5, 1 i 0.5 mM. Ove koncentracije su izabrane tako da odgovaraju koncentraciji kalcijuma u sinapsi (oko 5 mM). Od raspoloživih 20 preparata po 6 je izabrano za merenje sa najvećom i najmanjom koncentracijom galne kiseline, dok je za međukoncentracije izvršeno po 4 merenja.

Izvršeno je i 6 merenja na preparatima tretiranim rastvorom Cortiazem-a. Koncentracija rastvora Cortiazem-a koja je korišćena iznosi 0.4 mg/mL i odgovara terapijskoj dozi kod čoveka.

Posle obrade i filtriranja signala sa mernih sondi dobijeni su grafici zavisnosti voltaže akcionog potencijala od vremena. Na njima se jasno izdvaja

oblik krive koji odgovara krivi akcionog potencijala. Očitavane su vrednosti amplitude akcionog potencijala i vremena njegovog trajanja. Upoređivane su amplitude akcionog potencijala pre i posle tretiranja pojedinačnog preparata.

Rezultati i diskusija

Dobijene vrednosti amplitude kontrolnih akcionih potencijala i akcionih potencijala na nervima nakon tretiranja preparata rastvorima galne kiseline imaju istu vrednost, što potvrđuje pretpostavku da galna kiselina utiče na sinaptičke procese, a ne utiče na provođenje akcionog potencijala nerva.

Obradom vrednosti amplitude akcionog potencijala kontrolne grupe i grupe preparata tretiranih Cortiazem-om (korišćen je Wilcoxon-ov test vezanih parova) dobijena je statistički značajna razlika ($p < 0.03$) u vrednosti amplitude između akcionog potencijala kontrolnog i tretiranog nerva.

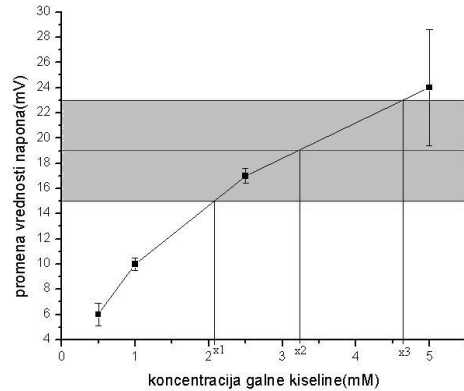
Isti test primenjen je i pri obradi rezultata za različite koncentracije galne kiseline. Statistički značajna razlika ($p < 0.03$) dobijena je u grupama sa koncentracijama galne kiseline 5 i 0.5 mM. U druge dve grupe, sa koncentracijama od 2.5 i 1 mM nije dobijena statistički značajna razlika ($p = 0.07$), najverovatnije zbog malog uzorka.

Zavisnost promene srednje vrednosti amplitude akcionog potencijala od koncentracije galne kiseline kojom je preparat tretiran data je na slici 3.

Sa grafikom na slici 3 uočava se da se kriva bliži asimptoti (zasićenju) pri vrednostima galne kiseline od oko 5 mM, što odgovara koncentraciji ekstracelularnog kalcijuma u sinapsi. Koncentracija Cortiazem od 0.4 mg/mL delovala je na nerv približno podjednako kao galna kiselina koncentracije 3.2 ± 1.4 mM.

Ukoliko bi galna kiselina blokirala kalcijum-zavisne kanale, vrednost za koncentraciju pri kojoj dolazi do zasićenja bi verovatno bila znatno niža, usled malog broja kanala u odnosu na koncentraciju kalcijuma. Ne može se isključiti mogućnost da kanali za kalcijum imaju nizak afinitet za galnu kiselinu, pri čemu pokazuju prividno veliku vrednost koncentracije neophodnu za zasićenje. Da bi se ova hipoteza odbacila neophodno je izvršiti protein-ligand "docking" simulacije i ustanoviti afinitet kanala za galnu kiselinu.

Dobijeni rezultati govore da galna kiselina dovodi do promena u provođenju akcionog potencijala na sinapsi, vezivanjem jona kalcijuma iz sinaptičke



Slika 3. Zavisnosti promene amplitude akcionog potencijala od koncentracije galne kiseline sa prikazanim dejstvom kortiazema i pojasom greške

Figure 3.. Dependence of amplitude change of action potential from galic acid concentration with marked cortiasem action

pukotine. Smanjenjem koncentracije raspoloživog kalcijuma dolazi do smanjenog otpuštanja neurotransmitera i manjeg intenziteta signala u mišićnoj ćeliji.

Zaključak

Ustanovljeno je da galna kiselina remeti normalno provođenje akcionog potencijala, što ide u prilog našoj pretpostavci da hidrolizirajući tanini imaju uticaj na konduktivnost nervno-mišićne sinapse. Pretpostavlja se da to dejstvo ostvaruje vezivanjem jona kalcijuma. Kao referentni standard korišćen je komercijalni lek Cortiazem retard[®] u koncentraciji 0.4 mg/mL. Koncentracije galne kiseline od oko 5 mM izazivaju značajan pad vrednosti amplitude akcionog potencijala. Utvrđeno je da Cortiazem retard[®] u korišćenju koncentraciji ostvaruje isti efekat na promenu akcionog potencijala kao galna kiselina u koncentraciji 3.2 ± 1.4 mM.

Dobijeni rezultati ukazuju da galna kiselina utiče na provođenje nervnog impulsa. Ovo otvara mogućnosti za istraživanja u kojim bi se razmotrila eventualna terapijska primena galne kiseline u lečenju nervnih oboljenja. U daljim istraživanjima bi trebalo povećati broj merenja i broj različitih koncentracija galne kiseline. Sem toga, potrebno je izvršiti kompjuterske simulacije da bi se utvrdio tačan mehanizam dejstva galne kiseline.

Literatura

Drewes C. 1999. Non-invasive Recording of Giant Nerve Fiber Action Potentials from Freely Moving Oligochaetes. Department of Zoology and Genetics Iowa State University. Dostupno na: <http://www.zoo.utoronto.ca/able/volume/vol-20/2-drewes.pdf>

Grujić-Injac B. 1983. *Hemija prirodnih proizvoda*. Niš: Filozofski fakultet

Hillhouse B. J., Ming D. S., French C. J., Towers G. H. N. 2004. Acetylcholine Esterase Inhibitors in *Rhodiola rosea*. *Pharmaceutical Biology*, **42** (1): 68–72

<http://www.biopac.com/bslprolessons/a02/bslproao2.htm>

<http://www.engin.brown.edu/courses/en123/MuscleExp/Dissection.htm>

<http://www.hiim.hr/images/nastava/tnz/Temelji%20neuroznanosti%20-%2010%20poglavlje.pdf>

Kim H. K., Kim M., Kim S., Kim M., Chung J. H. 2004. Effects of Green Tea Polyphenol on Cognitive and Acetylcholinesterase Activities. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **68** (9): 1977.

Sivoňová M. Waczulíková I. Kilanczyk E. Hrnčiarová M. Bryszewska M. Klajnert B. Ľuračková Z. 2004. The Effect of Pycnogenol on the Erythrocyte Membrane Fluidity. *Gen. Physiol. Biophys.*, **23**: 39.

Tomić G. 2005. Ispitivanje kinetike inhibicije aktivnosti enzima acetilholinesteraze polifenolima zelenog čaja. *Petničke sveske*, 58: 227

Tijana Jevtić

Effect of Gallic Acid on Neuromuscular Synapse

Neuromuscular synapse is the place where an action potential is transferred from nerve to muscle. The most important ion in the synapse is calcium. It causes the release of neurotransmitters that carry information about action potential to the muscle.

Tannins are complex, polyphenolic compounds without nitrogen, with molecular weight ranging from 500 to 3000. Tannins are usually divided into hydrolysable tannins and condensed tannins. Gallic acid is the primary building block of hydrolysable tannins. Gallic acid contains several oxygen atoms in its hydroxyl group, so it can bind calcium and other metal ions. Numerous papers investigate the effect of condensed tannins on the inhibition of enzymes that regulate neural transmission.

The purpose of this study is to determine the quantitative and qualitative effect of Gallic acid on the conductivity of neuromuscular synapse.

Neuromuscular preparation of the frog (*n. ischiadicus* with *m. gastrocnemius*) is used as a model system for measuring action potential. Commercial medicine Cortiazem retard, which is a calcium antagonist, is used for comparing the effect on synaptic transmission with gallic acid. Concentrations of gallic acid were 5 mM, 2.5 mM, 1 mM, 0.5 mM. The concentration of Cortiazem retard was 0.4 mg/mL. Action potentials were recorded in a custom-made apparatus for signal detection and amplification. GageScope and MatLab toolkits were used for signal filtering and processing.

We have concluded that gallic acid does not affect the nerve, and that the changes in action potential amplitude result from changes in the synaptic transmission. Amplitudes of action potential decreased significantly ($p < 0.03$) at 5mM concentration. This concentration corresponds to that of extracellular calcium in synapse. A 3.2 ± 0.4 mM concentration of gallic acid achieved the same effect as the used concentration of Cortiazem retard.

It is possible that gallic acid binds extracellular calcium from the synapse and disturbs normal crossing of action potential through the synapse. Further analyses should be carried out in order to clarify the exact binding mechanism of gallic acid and calcium.