

Επίδραση του Καδμίου (Cd) στην Δραστικότητα Ενζύμων Εγκεφάλου Επιμύων

Χ.ΚΑΡΑΓΕΩΡΓΙΟΥ, Β.ΤΖΩΤΖΕΣ, Κ.ΠΑΝΤΟΣ, Κ.ΜΟΥΡΟΥΖΗΣ, Π.ΜΩΡΑΙΤΗΣ,

ΣΤ. ΤΣΑΚΙΡΗΣ.

Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Αθηνών, Μικράς Ασίας 75, Γουδή, 11527 Αθήνα .

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το κάδμιο (Cd) ένας συνεχώς αυξανόμενος περιβαλλοντικός ρύπος θεωρείται μεταξύ άλλων και τοξικός για το κεντρικό νευρικό σύστημα.^{1,2} Το Cd επηρεάζει την δομή των πυρηνικών οξέων (DNA, RNA), την δραστικότητα ορισμένων ενζύμων, την πρόσληψη των κατεχολαμινών^{3,4} και τα επίπεδα των νευροδιαβιβαστών⁵. Η νευροτοξική δράση του Cd έχει παρατηρηθεί τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μελέτες^{6,7}. Το Cd αναστέλλει την συναπτική μεταβίβαση στις χολινεργικές και αδρενεργικές συνάψεις στην περιφέρεια *in vitro*⁸. Πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν τον σχηματισμό σχετικώς σταθερών συμπλόκων μετάλλου-χηλικού παράγοντος με ποικίλες χηλικές ενώσεις π.χ. θειόλες, διθειοθρεϊτόλη (DTT) ή L-κυστεΐνη που έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση της συγκεντρώσεως του Cd στους ιστούς. Έχει αναφερθεί ότι οι θειόλες προστατεύουν τα ένζυμα των νεφρών και του εγκεφάλου από την ανασταλτική δράση του Cd (π.χ. Na⁺,K⁺-ATPάση)^{7,9}. Εξάλλου όπως αναφέρεται η χρονία χορήγηση του Cd σε επίμυς κατέληξε σε μείωση της περιεχομένης γλουταθειόνης και ελάττωση της δραστικότητος της υπεροξειδισμούτάσης και της γλουταθειονο-S-τρανσφεράσης στον εγκέφαλο και όρχεις του επίμυος, δείχνοντας ότι το Cd αυξάνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων και το οξειδωτικό stress. Αντιοξειδωτικά (π.χ. β-καροτίνη) ανταγωνίζονται την μείωση της δραστικότητος της ATPάσης και την αύξηση του οξειδωτικού stress, που προκαλούνται από το Cd δηλαδή δρουν προστατευτικά κατά κάποιο τρόπο¹⁰. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου (ROS) και ιδιαίτερα υπεροξειδίων από βαρέα μέταλλα μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση από το Cd¹¹. Η ακετυλχολινεστεράση (AChE) είναι το ένζυμο που υδρολύει την ακετυλχολίνη (νευροδιαβιβαστής απαραίτητος για την ζωή) επηρεάζοντας ακόμη και την απελευθέρωση της ακετυλχολίνης¹² και πιθανόν έχει και νευροτροφικές ιδιότητες. Η Na⁺,K⁺-ATPάση ενέχεται στην νευρωνική διεγερσιμότητα¹³, παραγωγή μεταβολικής ενεργείας¹⁴ και στην απελευθέρωση και πρόσληψη των κατεχολαμινών και της σεροτονίνης^{15,16,17}. Εξάλλου η Mg⁺⁺-ATPάση συμμετέχει στην διατήρηση υψηλών ενδοκυτταρίων επιπέδων του Mg⁺⁺ στον εγκέφαλο, αλλαγές των οποίων μπορεί να επηρεάζουν την σύνθεση πρωτεϊνών και την κυτταρική ανάπτυξη¹⁸.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση: α)της δράσεως του Cd επί της δραστικότητος της AChE, (Na⁺,K⁺)-ATPάσης και Mg⁺⁺-ATPάσης εγκεφάλου επιμύων κατόπιν

χρονίας και οξείας χορηγήσεώς του, β)τις in vitro συγκεντρώσεως εξαρτώμενες δράσεις του Cd επί της δραστικότητας των ιδίων ενζύμων ομογενοποιημένου εγκεφάλου επιμύων, γ)τις in vivo και in vitro δράσεις του αντιοξειδωτικού της κυστεΐνης (Cys) και του συνδυασμού Cys+Cd επί των ανωτέρω ενζύμων, και δ)την αξιολόγηση της ολικής αντιοξειδωτικής καταστάσεως (TAS) του εγκεφάλου μετά από in vivo χορήγηση Cys, Cd, ή του συνδυασμού Cys+Cd, σε επίμυς.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Χρησιμοποιήθηκαν άρρενες επίμυς τύπου Wistar και βάρους 225 ± 10 g. Η φροντίδα των πειραματοζώων ήταν σύμφωνα με τις αρχές του «Guide to the Care and Use of Experimental Animals»¹⁹. Τροφή και ύδωρ παρείχεται ad libitum.

Χορήγηση in vivo Cd και/ή Cys.

Χρονία χορήγηση: Η ομάδα CdSO₄ (n=7) έλαβε θειικό κάδμιο (1mg/kg/day) ενδομυϊκώς (EM) επί 4 μήνες. Η ομάδα των μαρτύρων (n=5) έλαβε καθημερινώς και για το ίδιο χρονικό διάστημα EM διάλυμα NaCl 0.9%.

Οξεία χορήγηση: Η ομάδα CdSO₄ (n=6) έλαβε EM 5mg/kg εφ άπαξ θειικό κάδμιο και θανατώθηκε μετά 8 ώρες. Η ομάδα κυστεΐνης (n=6) έλαβε EM 5mg/kg Cys εφ άπαξ και θανατώθηκε μετά από 8 ώρες. Η ομάδα CdSO₄+Cys (n=6) έλαβε τον συνδυασμό CdSO₄+Cys αλλά από διαφορετική σύριγγα και θυσιάστηκε μετά 8 ώρες. Η ομάδα μαρτύρων (n=6) έλαβε διάλυμα NaCl 0.9% εφ άπαξ και θανατώθηκε μετά 8 ώρες.

Προετοιμασία ιστού.

Οι επίμυες εθυσιάζοντο με αποκεφαλισμό δια λαιμητόμου και ο ολικός εγκέφαλος αφαιρείτο ταχύτατα. Ο ιστός ζυγίζοταν ομογενοποιείται και φυγοκεντρείται στις 1000g για 10 λεπτά ώστε να αφαιρεθούν οι πυρήνες και οι κατεστραμμένοι ιστοί. Λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό και προσδιορίζεται σε αυτό το πρωτεϊνικό περιεχόμενο συμφώνως προς την μέθοδο του *Lowry και συν.*(1951)²⁰.

Προσδιορισμός δραστικότητας των ενζύμων και TAS

Η δραστικότητα των ενζύμων εκτιμήθηκε σε κάθε ομογενοποίημα ολικού εγκεφάλου επίμυος. Επίσης προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεως εξαρτώμενες in vitro δράσεις του θειικού καδμίου επί των καθαρών ενζύμων (eel Electroforus electricus AChE και Na⁺,K⁺-ATPάση από φλοιό εγκεφάλου χοίρου) και επί των εγκεφαλικών μεμβρανών δεσμευθείσης AChE, (Na⁺,K⁺)-ATPάσης και Mg⁺⁺-ATPάσης. Οι δραστικότητες αυτών των ενζύμων προσδιορίστηκαν μετά προεπώαση 1 ώρας του εγκεφαλικού ομογενοποιημένου ή του καθαρού ενζύμου με 10⁻⁵ μέχρι 10⁻² M CdSO₄ στους 37°C. Επί πλέον, CdSO₄ (1mM) και /ή Cys (0.83mM)²¹ προεπώαστηκαν 1 ώρα με 1 ml μείγματος που περιείχε 0.1 mg πρωτεΐνης από ομογενοποίημα εγκεφάλου επιμύων (4 επίμυς) για 4

λεπτά και μετά προσδιορίστηκαν οι δραστηριότητες του ενζύμου. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της ακετυλχολινεστεράσης έγινε σύμφωνα με την μέθοδο του *Ellman και συν.*(1961)²² και της Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης, Mg^{2+} -ΑΤΡάσης σύμφωνα με την μέθοδο των *Bowler και Tirri*(1974)²³ όπως περιγράφεται σε πρόσφατη δημοσίευσή μας^{21,24}.

Μελετήθηκε η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση του εγκεφάλου μετά από οξεία *in vivo* χορήγηση CdSO_4 , Cys και συνδυασμό κυστεΐνης και θεικού καδμίου στους επίμους. Η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση (TAS) εκτιμήθηκε σε κάθε ομογενοποιημένο εγκέφαλο επίμους, όπως περιγράφεται αναλυτικά από τους *Tsakiris και συν.*(2000)²¹. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε προκειμένου να ερευνηθεί η πιθανή παραγωγή ελευθέρων ριζών από το κάδμιο (ανασταλείσα τιμή TAS) και ο πιθανός προστατευτικός ρόλος της κυστεΐνης στον εγκέφαλο (διεγερθείσα τιμή TAS).

Στατιστική ανάλυση

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με την χρήση του two-tailed Student's t-test. Τιμές $p < 0.05$ θεωρήθηκαν ως στατιστικώς σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Πίνακας 1. Χρόνιες *in vivo* δράσεις του Cd (1 mg/Kg/day για 4 μήνες) επί της δραστηριότητας της εγκεφαλικής AChE, (Na^+, K^+)-ΑΤΡάσης και Mg^{2+} -ΑΤΡάσης ενηλίκων επιμύων

Αγωγή	Βάρος (g) εγκεφάλου	Δραστηριότητες		
		AChE ($\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{mg}$ πρωτεΐνης)	Na^+, K^+ -ΑΤΡάση ($\mu\text{mol Pi}/\text{h} \times \text{mg}$ πρωτεΐνης)	Mg^{2+} -ΑΤΡάση ($\mu\text{mol Pi}/\text{h} \times \text{mg}$ πρωτεΐνης)
Μάρτυρες N=5	2.03±0.10	0.765±0.088	4.70±0.38	8.75±0.62
CdSO_4 N=7	1.96±0.08 NS	1.133±0.111*** (+48%)	7.78±0.50*** (+66%)	8.58±0.39 NS

NS: μη στατιστικώς σημαντικό; *** $p < 0.001$; σε σύγκριση με τις τιμές των μαρτύρων.

Πίνακας 2. Οξείες *in vivo* δράσεις του Cd (5 mg/Kg) και/ή της L-κυστεΐνης (5 mg/Kg) επί της δραστηριότητας της εγκεφαλικής AChE, (Na^+, K^+)-ΑΤΡάσης και Mg^{2+} -ΑΤΡάσης ενηλίκων επιμύων

Αγωγή	Δραστηριότητες		
	AChE ($\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{mg}$ πρωτεΐνης)	Na^+, K^+ -ΑΤΡάση ($\mu\text{mol Pi}/\text{h} \times \text{mg}$ πρωτεΐνης)	Mg^{2+} -ΑΤΡάση ($\mu\text{mol Pi}/\text{h} \times \text{mg}$ πρωτεΐνης)
Μάρτυρες N=6	0.700±0.035	5.00±0.35	8.20±0.65
Cys N=6	0.900±0.046*** (+30%)	3.55±0.28*** (-29%)	7.50±0.70 (-8%) NS
Cys και CdSO_4 N=6	0.720±0.043 (+3%) NS	6.00±0.48** (+20%)	8.61±0.86 (+5%) NS
CdSO_4 N=6	0.497±0.040*** (-29%)	15.75±1.58*** (+215%)	21.55±2.37*** (+163%)

NS: μη στατιστικώς σημαντικό; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; σε σύγκριση με τις τιμές των μαρτύρων.

Οι χρόνιες δράσεις του καδμίου επί της δραστηριότητας των ενζύμων

της AChE, (Na^+, K^+)-ΑΤΡάσης και Mg^{2+} -ΑΤΡάσης παρουσιάζονται στον πίνακα 1. Η δραστηριότητα της AChE και της Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης αυξήθηκε κατά 50 και 65% αντιστοίχως ($p < 0.001$), ενώ εκείνη της Mg^{2+} -ΑΤΡάσης δεν επηρεάστηκε. Στον πίνακα 2 παρουσιάζεται η οξεία δράση του Cd επί των ανωτέρω ενζύμων.

Παρατηρείται πτώση της δραστικότητας της AChE κατά 30% περίπου ($p < 0.001$) και ενεργοποίηση της Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης και Mg^{++} -ΑΤΡάσης κατά 215 και 160% αντιστοίχως ($p < 0.001$). Η κυστεΐνη με θειικό κάδμιο ($\text{CdSO}_4 + \text{Cys}$) ανέτρεψε τις ανωτέρω δράσεις του Cd επί των ενζύμων και τις επανέφερε σε αυτές των μαρτύρων. Η αξιολόγηση της εγκεφαλικής TAS κατόπιν οξείας χορηγήσεως του

Πίνακας 3. *In vitro* δράσεις του Cd και/ή της L-κυστεΐνης επί της δραστικότητας της AChE σε ομογενοποίημα εγκεφάλου επιμύων

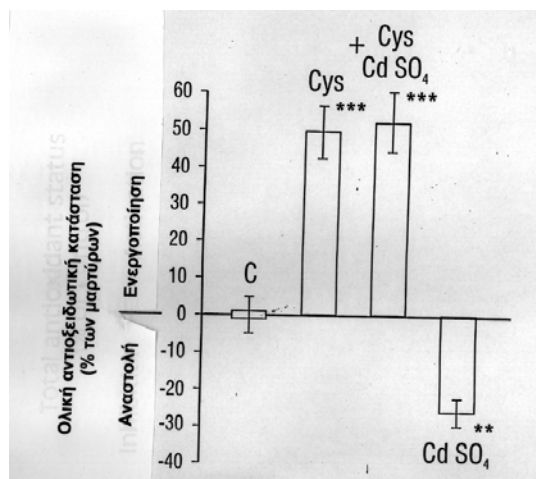
Αγωγή	Δραστικότητα
	AChE ($\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{mg πρωτεΐνης}$)
Μάρτυρες	0.750 ± 0.045
Cys (0.83 mM)	$3.570 \pm 0.250^{***}$ (+375%)
CdSO_4 (1 mM) και Cys (0.83 mM)	$2.550 \pm 0.204^{***}$ (+240%)
CdSO_4 (1 mM)	$0.145 \pm 0.009^{***}$ (-81%)

*** $p < 0.001$; σε σύγκριση με τις τιμές των μαρτύρων.

Cd και ή της Cys παρουσιάζεται στο σχήμα 1. Το Cd μείωσε την TAS κατά 25% περίπου ($p < 0.001$)

δείχνοντας ότι τα ιόντα του Cd προκαλούν οξειδωτικό stress. Η Cys μόνη (ή παρουσία του Cd) μπορεί να ανατρέψει την ανωτέρω αναστολή και να διεγείρει την TAS κατά 50% περίπου ($p < 0.001$) δείχνοντας ότι η Cys μπορεί να έχει προστατευτική αντιοξειδωτική δράση.

Οι συγκεντρώσεως εξαρτώμενες *in vitro* δράσεις του Cd επί της eel electricus καθαρής AChE και της εγκεφαλικής AChE εικονίζονται στο σχήμα 2. Το Cd ανέστειλε την AChE σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0.1mM. Επί πλέον, οι *in vitro* δράσεις του Cd επί της καθαρής Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης και της εγκεφαλικής Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης παρουσιάζονται στο σχήμα 3. Το Cd μέχρι την συγκέντρωση 0.1mM δραστηριοποίησε το ένζυμο κατά 60-70% ($p < 0.001$). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, το ένζυμο του εγκεφάλου ανεστάλη, ενώ το καθαρό ένζυμο διέτηρησε υψηλή δραστικότητα (40%, $p < 0.01$). Αναστολή της ακετυλχολινεστεράσης κατά 80% ($p < 0.001$) προκλήθηκε από 1mM CdSO_4 (πίναξ 3) ενώ η Cys σε συγκέντρωση 0.83mM ανέτρεψε αυτή την δράση και ηύξησε την δραστικότητα του ενζύμου σε τιμές μεγαλύτερες εκείνων του μάρτυρος (+240%, $p < 0.001$). Το γεγονός αυτό ενισχύει τον προστατευτικό ρόλο της Cys επί της ανασταλτικής δράσεως του Cd στην εγκεφαλική ακετυλχολινεστεράση. Ωστόσο, αδρανοποίηση



Σχήμα 1. Οξείες *in vivo* δράσεις του CdSO_4 (5 mg/kg επίμυος) και/ή της L-κυστεΐνης (5 mg/kg επίμυος) (Cys) επί της ολικής αντιοξειδωτικής καταστάσεως (TAS). Στους μάρτυρες χορηγήθηκε EM 0.9% NaCl, ενώ CdSO_4 και/ή Cys χορηγήθηκε εφάπαξ και μετά 8 ώρες τα ζώα θυσιάστηκαν με αποκεφαλισμό. Οι τιμές TAS προσδιορίστηκαν σε κάθε φρέσκο ομογενοποίημα ολοκλήρου εγκεφάλου επίμυος. Η τιμή TAS του εγκεφαλικού ομογενοποιημάτος στον μάρτυρα ήταν $15 \pm 2 \mu\text{mol/g}$ νοπού εγκεφάλου ή $50 \pm 5 \text{mmol/L}$. Κάθε τιμή δεικνύει τον $\text{MO} \pm \text{SD}$ 6 ανεξαρτήτων πειραμάτων (6 επίμυες). Ο MO εκάστου πειράματος προήλθε από 3 μετρήσεις στο ομογενοποίημα του εγκεφάλου κάθε πειραματόζωου. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; σε σύγκριση με τις τιμές των

της Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης και της Mg^{++} -ΑΤΡάσης με 1mM CdSO_4 κατά 85 και 40% αντιστοίχως ($p < 0.001$) δεν κατέστη δυνατόν να αναστραφεί *in vitro* από 0.83mM Cys , ενώ η Cys μόνη της ενεργοποίησε αυτά τα ένζυμα κατά 100-150% ($p < 0.001$) (πίναξ 4).

Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκε, κατά τη χρονία χορήγηση Cd , ελάττωση του βάρους των επιμύων, ελάττωση τόνου και κινητικότητα καθώς και εύκολη απόπτωση τριχώματος. Κατά την οξεία χορήγηση, όλοι σχεδόν οι επίμυες έχαναν άμεσα την κινητικότητα τους, με παράλληλη απώλεια των αισθήσεων τους, ενώ παρατηρήθη και 11% θνητότης σε διάστημα 8 ωρών μετά τη χορήγηση Cd .

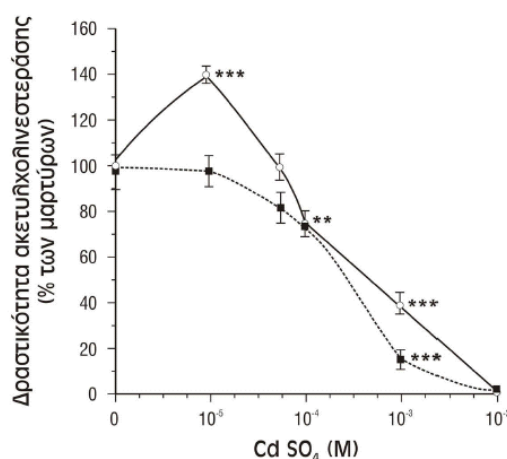
ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανάλυση των ανωτέρω αποτελεσμάτων δεικνύει ότι το Cd είτε σε χρονία είτε σε οξεία χορήγηση προκαλεί σημαντικές αλλαγές στην δραστικότητα των μελετηθέντων ενζύμων - AChE , (Na^+, K^+ -ΑΤΡάση και Mg^{++} -ΑΤΡάση του εγκεφάλου

Πίνακας 4. *In vitro* δράσεις του Cd και/ή της L -κυστεΐνης επί της δραστικότητας της Na^+, K^+ -ΑΤΡάσης και Mg^{2+} -ΑΤΡάσης σε ομογενοποίημα εγκεφάλου επιμύων

Αγωγή	Δραστικότητες	
	Na^+, K^+ -ΑΤΡάση ($\mu\text{mol Pi/h} \times \text{mg πρωτεΐνης}$)	Mg^{2+} -ΑΤΡάση ($\mu\text{mol Pi/h} \times \text{mg πρωτεΐνης}$)
Μάρτυρες	4.85 ± 0.40	8.70 ± 0.60
CdSO_4 (0.01 mM)	$7.83 \pm 0.79^{**}$ (+68%)	8.40 ± 0.67 NS
CdSO_4 (0.1 mM)	$8.08 \pm 0.48^{***}$ (+74%)	8.23 ± 0.74 NS
CdSO_4 (1 mM)	$0.62 \pm 0.02^{***}$ (-87%)	$5.25 \pm 0.31^{***}$ (-40%)
CdSO_4 (1 mM) και Cys (0.83 mM)	$0.65 \pm 0.04^{***}$ (-86%)	$5.00 \pm 0.35^{***}$ (-42%)
Cys (0.83 mM)	$11.63 \pm 1.04^{***}$ (+150%)	$17.40 \pm 1.57^{***}$ (+100%)

NS: μη στατιστικώς σημαντικό; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; σε σύγκριση με τις τιμές των μαρτύρων.

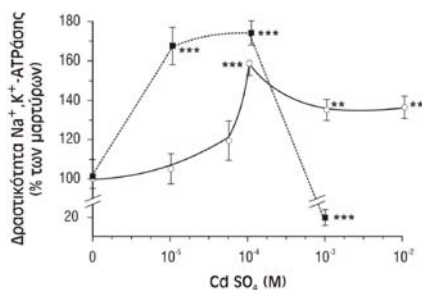


Σχήμα 2. Δράση διαφορετικών συγκεντρώσεων CdSO_4 επί της δραστικότητας της AChE , όπως προσδιορίστηκαν σε ομογενοποίημα εγκεφάλου επίμυος (■---■) ή σε eel *E. electricus* καθαρή pure AChE (○—○). Το CdSO_4 προεπεωάσθη για 1 ώρα στους 37°C με 1 ml μείγματος 0.1 mg πρωτεΐνης από το ομογενοποίημα του εγκεφάλου ή 0.1 mg πρωτεΐνης από το καθαρό ένζυμο. Η ενζυμική δραστικότητα του μάρτυρος ήταν $0.750 \pm 0.045 \Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{mg πρωτεΐνης}$ σε ομογενοποίημα εγκεφάλου και $1.23 \pm 0.04 \Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{mg πρωτεΐνης}$ για το καθαρό ένζυμο. Οι τιμές εκφράζουν τον $\text{MO} \pm \text{SD}$ 4 πειραμάτων. Ο MO κάθε πειράματος προήλθε από 3 προσδιορισμούς. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; σε σύγκριση με τις τιμές των μαρτύρων.

επιμύων. Η καθαρή AChE αναστέλλεται από τοξικές συγκεντρώσεις Cd *in vitro* όπως αναφέρουν οι Tomlinson και συν. (1981)²⁵. Στην μελέτη μας ευρέθη ότι το Cd *in vitro* ανέστειλε την καθαρή και εγκεφαλική ακετυλχολινεστεράση σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από 0.1mM , ενώ διήγειρε την εγκεφαλική Na^+, K^+ -ΑΤΡάση σε συγκεντρώσεις μέχρι 0.1mM και την ανέστειλε σε υψηλότερες

συγκεντρώσεις (σχήμα 2 & 3). Η Mg^{++} -ΑΤΡάση ενώ δεν επηρεάστηκε in vitro από συγκεντρώσεις Cd μέχρι 0.1mM αδρανοποιήθηκε από υψηλότερες συγκεντρώσεις (π.χ. 1mM) (πίναξ 4). Επί πλέον, η οξεία χορήγηση Cd στους επίμυς (5mg/kg και αποκεφαλισμός 8 ώρες μετά) ανέστειλε την εγκεφαλική ακετυλχολινεστεράση, ενώ διήγειρε την Na^+,K^+ -ΑΤΡάση και Mg^{++} -ΑΤΡάση (πίναξ 2). Εν τούτοις, η χρονία χορήγηση του Cd (4μήνες, 1 mg/kg/day) είχε ως αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ακετυλχολινεστεράσης και Na^+,K^+ -ΑΤΡάσης αλλά όχι της Mg^{++} -ΑΤΡάσης (πίναξ 1). Έχει αναφερθεί εξ άλλου ότι οι δραστηριότητες των εγκεφαλικών ενζύμων - (Na^+,K^+)-ΑΤΡάση και Mg^{++} -ΑΤΡάση - καθώς και η πρόσληψη των κατεχολαμινών μειώνονται από την χρονία χορήγηση Cd σε επίμυες καθώς και σε συναπτοσώματα εγκεφάλου επιμύων in vitro^{26,27,10}.

Η ανασταλτική δράση του καδμίου στην συναπτική χολινεργική διαβίβαση in vitro μπορεί



Σχήμα 3. Δράση διαφορετικών συγκεντρώσεων $CdSO_4$ επί της δραστηριότητας της Na^+,K^+ -ΑΤΡάσης προσδιορισθείσας σε ομογενοποίημα εγκεφάλου επιμύος (■---■) ή σε καθαρό ένζυμο (από εγκεφαλικό φλοιό χοίρου) (○---○). Το $CdSO_4$ προεπεώσθηκε για 1 ώρα στους 37°C με 1 ml μείγματος 0.1 mg πρωτεΐνης από το ομογενοποίημα εγκεφάλου ή 40 μg πρωτεΐνης καθαρού ενζύμου. Η ενζυμική δραστηριότητα ελέγχου ήταν $4.85 \pm 0.40 \mu\text{mol Pi} / \text{h} \times \text{mg πρωτεΐνης}$ στο ομογενοποίημα εγκεφάλου και $14.80 \pm 1.60 \mu\text{mol Pi} / \text{h} \times \text{mg πρωτεΐνης}$ στο καθαρό ένζυμο. Οι τιμές εκφράζουν τον $MO \pm SD$ 4 πειραμάτων. Ο MO κάθε πειράματος προήλθε από 3 προσδιορισμούς. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; σε σύγκριση με

να τροποποιεί την ακετυλχολινεστεράση του εγκεφάλου⁸. Οι Harvey και συν.(1996)²⁸ ανέφεραν ότι το Cd ανέστειλε την μέσω $[K^+]$ προκαλούμενη απελευθέρωση της $[^3H]ACh$, ντοπαμίνης, σεροτονίνης, GABA και γλουταμικού σε τομές εγκεφάλου επιμύων. Επιπλέον οι Carageorgiou και συν.(2000)⁵ παρατήρησαν μείωση της λειτουργίας του ντοπαμινεργικού και σεροτονεργικού συστήματος ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου επιμύων μετά από έκθεση σε κάδμιο (21 ημέρες EM χορήγηση), ενώ οι Minami και συν.(2001)² ανέφεραν ελάττωση της απελευθέρωσης των διεγερτικών νευροδιαβιβαστών - γλουταμικού και ασπαρτικού - και αύξηση της απελευθέρωσης των ανασταλτικών νευροδιαβιβαστών - γλυκίνης και GABA - από τις διαχεόμενες με κάδμιο νευρικές απολήξεις της αμυγδαλής².

Οι ανωτέρω αναφερθείσες αλλαγές στην δραστηριότητα των μελετηθέντων ενζύμων υποστηρίζουν ότι το Cd μπορεί να επηρεάζει τους χολινεργικούς μηχανισμούς

του εγκεφάλου²⁹. Έχει υποστηριχθεί επίσης ότι η διέγερση της Na^+,K^+ -ΑΤΡάσης μπορεί να μειώσει την απελευθέρωση της ACh στα συναπτοσώματα του φλοιού επίμυος, γεγονός που συσχετίζεται με την παρατηρηθείσα ενεργοποίηση της εγκεφαλικής AChE κατά την μακροχρόνια με κάδμιο αγωγή των επιμύων μας³⁰ (πίναξ 1).

Επιπλέον, οι παρατηρηθείσες αλλαγές της δραστηριότητας της Na^+,K^+ -ΑΤΡάσης υποστηρίζουν ότι το Cd μπορεί να τροποποιεί την νευρωνική διεγερσιμότητα του εγκεφάλου¹³, την

παραγωγή μεταβολικής ενεργείας¹⁴ καθώς και την πρόσληψη και απελευθέρωση των κατεχολαμινών^{15,16} και της σεροτονίνης¹⁷. Το Cd επηρεάζοντας επίσης την δραστικότητα της Mg^{++} -ΑΤΡάσης, μπορεί να επηρεάζει ρυθμούς πρωτεϊνικής συνθέσεως και κυτταρικής αναπτύξεως¹⁸.

Εκτιμάται ότι όταν η κυστεΐνη χορηγήθηκε μαζί με το κάδμιο (όχι στην ίδια σύριγγα) εφάπαξ στους επίμυς (πίναξ 2) εμπόδισε τις αλλαγές στην δραστικότητα των ενζύμων (αναστολή της AChE, διέγερση της Na^+,K^+ -ΑΤΡάσης και Mg^{++} -ΑΤΡάσης) από το κάδμιο όταν αυτό χορηγήθηκε μόνο του. Επιπλέον, όταν η κυστεΐνη προεπωάσθηκε για βραχύ χρονικό διάστημα in vitro με το κάδμιο προστάτησε την AChE από την ανασταλτική δράση του καδμίου. Αντιθέτως, η αναστολή στην δραστικότητα της Na^+,K^+ -ΑΤΡάσης και Mg^{++} -ΑΤΡάσης από 1mM $CdSO_4$, δεν κατέστη δυνατόν να εμποδισθεί από 0.83mM Cys in vitro (πίναξ 4). Κατά συνέπεια, η Cys μπορεί να χρειάζεται περισσότερο χρόνο από 1 ώρα προεπώσεως in vitro (για την Na^+,K^+ -ΑΤΡάση και Mg^{++} -ΑΤΡάση) και in vivo συνθήκες, προκειμένου να ασκήσει προστατευτική δράση έναντι του καδμίου. Έχει αναφερθεί εξάλλου ότι το κάδμιο αυξάνει την υπεροξειδωση των λιπιδίων και το οξειδωτικό stress¹⁰. Τούτο επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματά μας με την μείωση της TAS του εγκεφάλου από τα ιόντα Cd, όπως παρουσιάζονται στο σχήμα 1. Η παρατηρούμενη ενεργοποίηση της TAS του εγκεφάλου των επιμύων από την Cys υποστηρίζει ότι ο παράγων της θειόλης μπορεί να ασκεί προστατευτική δράση έναντι του Cd στον εγκέφαλο.

Είναι γνωστό ότι το Cd ασκεί ανταγωνιστική δράση επί των ποικίλων διαύλων Ca^{++} . Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι η ανταγωνιστική δράση του Cd επί των διαύλων Ca^{++} και το γεγονός ότι η καλμοδουλίνη δεν κάνει διάκριση μεταξύ ιόντων Ca και Cd³¹ πιθανόν παίζει κάποιο ρόλο στις παρατηρηθείσες αλλαγές στην δραστικότητα της AChE, (Na^+,K^+)-ΑΤΡάσης και Mg^{++} -ΑΤΡάσης του εγκεφάλου επιμύων που προκλήθηκαν από το Cd.

Εν συμπεράσματι, αυτές οι αλλαγές στη δραστικότητα των ενζύμων που προκλήθηκαν από το Cd, ίσως τροποποιούν την λειτουργία και πλαστικότητα των εγκεφαλικών νευρωνικών συνάψεων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Provias JP, Acherley CA, Smith C, Becker LE. Cadmium encephalopathy: a report with elemental analysis and pathological findings. *Acta Neuropathol* 1994; 88: 538-86.
2. Minami A, Takeda A, Nishibaba D, Takefuta S, Oka N. Cadmium toxicity in synaptic neurotransmission in the brain. *Brain Res* 2001; 894: 336-9.
3. Cohen MH. Neurotoxic effects of heavy metals and metalloids in biochemistry of brain. Pergamon Press, New York, 1980.

4. Hobson MV, Milhouse M, Rajanna B. Effects of cadmium on the uptake of dopamine and norepinephrine in rat brain synaptosomes. *Bull Environ Contam Toxicol* 1986; 37: 421-6.
5. Carageorgiou H, Boviatsis St, Carageorgiou-Kassaveti M, Pantos C, Messari I, Papadopoulou-Daifoti Z. Dopamine, serotonin and their metabolite levels in certain rat brain areas after acute and chronic administration of cadmium. In: *Proceedings of the "2nd International Symposium on trace elements in human: New perspectives"*. Eds.: Ermidou-Pollet S, Pollet S, Athens, 7-9/1999, 2000, pp.723-30.
6. Webster WS, Valois AA. The toxic effect of cadmium on the neonatal mouse CNS. *J Neuropathol Exp Neurol* 1981; 40: 247-57.
7. Kabeer IA, Rajender RJ, Desai D. Protection against cadmium toxicity and enzyme inhibition by dithiothreitol. *Cell Biochem Function* 1989; 7: 185-92.
8. Cooper GP, Suszkiw JB, Manalis RS. Presynaptic effects of heavy metals. In: *Cellular and molecular neurotoxicity*. Ed.: Narahushi T, Raven Press NY, 1984, pp.1-21.
9. Cetty CS, Cooper A, McNeil C, Rajanna B. The effects of cadmium in vitro on adenosine triphosphatase system and protection by thiol reagents in rat brain microsomes. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992; 22: 456-8.
10. Missiry-el MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14: 238-43.
11. Galaris D, Evangelou A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 42: 93-103.
12. Kouniniotou-Krontiri P, Tsakiris S. Time dependence of Li⁺ action on acetylcholinesterase activity in correlation with spontaneous quantal release of acetylcholine in rat diaphragm. *Jpn J Physiol* 1989; 39: 429-40.
13. Sastry BSR, Phillis JW. Antagonism of biogenic amine-induced depression of cerebral cortical neurons by Na⁺,K⁺-ATPase inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol* 1977; 55: 170-80.
14. Mata M, Fink DJ, Gainer H, Smith CB, Davidsen L, Savakis H, Schwartz WJ, Sokoloff L. Activity-dependent energy metabolism in rat posterior pituitary, primarily reflects sodium pump activity. *J Neurochem* 1980; 34: 214-5.
15. Bogdanski DF, Tissuri A, Brodie BB. Role of sodium, potassium, ouabain and reserpine in uptake, storage and metabolism of biogenic amines in synaptosomes. *Life Sci* 1968; 7: 419-28.
16. Swann AC. (Na⁺,K⁺)-adenosine triphosphatase regulation by the sympathetic nervous system: effects of noradrenergic stimulation and lesion in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 228: 304-11.

17. Hernandez R. Brain Na⁺,K⁺-ATPase activity possibly regulated by a specific serotonin receptor. *Brain Res* 1989; 408: 399-402.
18. Sanui H, Rubin H. The role of magnesium in cell proliferation and transformation. In: *Ions, cell proliferation and cancer*. Eds.: Boynton AL, McKochan WL, Whitfield JP, Academic Press NY, 1982, pp.517-37.
19. Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Institute of Laboratory Animals, National Research Council, Washington DC, 1985, pp.83.
20. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randale RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
21. Tsakiris S, Angelogianni P, Schulpis KH, Behrakis P. Protective effect of L-cysteine and glutathione on rat brain Na⁺,K⁺-ATPase inhibition induced by free radicals. *Z Naturforsch* 2000; 55c: 271-7.
22. Ellman GL, Courtney D, Andres V, Feathrestone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
23. Bowler K, Tirri R. The temperature characteristics of synaptic membrane ATPases from immature and adult rat brain. *J Neurochem* 1974; 23: 611-3.
24. Antoniadou Ch, Carageorgiou H, Tsakiris S. Effects of (-)deprenyl (selegiline) on acetylcholinesterase and Na⁺,K⁺-ATPase activities in adult rat whole brain. *Pharmacol Res* 2002; 46: 165-9.
25. Tomlinson G, Mutus B, McLennan I. Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. *Can J Biochem* 1981; 59: 728-35.
26. Chandra SV, Murthy RC, Husain T, Bansal SK. Effect of interaction of heavy metals on Na⁺,K⁺-ATPase and the uptake of ³H-DA and ³H-NA in rat brain synaptosomes. *Acta Pharmacol Toxicol* 1984; 54: 210-3.
27. Rajanna B, Hobson M, Boykin M, Chetty CS. Effects of chronic treatment with cadmium on ATPases, uptake of catecholamines and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *Ecotoxicol Environ Saf* 1990; 20: 36-41.
28. Harvey Z, Wedley S, Findlay I, Sidell M, Pullar J. ω-Agatoxin IVA identifies a single calcium channel subtype which contributes to the potassium induced release of acetylcholine, 5-HT, dopamine, GABA and glutamate from rat brain slices. *Neuropharmacology* 1996; 35: 385-92.
29. Lai JC, Guest JF, Leung TK, Lim L, Davidson AN. The effects of cadmium, manganese and aluminium on sodium-potassium-activated and magnesium-activated adenosine triphosphatase activity and choline uptake in rat brain synaptosomes. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 141-6.

30. Meyer EM, Cooper JR. Correlations between Na⁺,K⁺-ATPase activity and acetylcholine release in rat cortical synaptosomes. *J Neurochem* 1981; 36: 467-75.
31. Sutoo D, Akiyama K, Imamiya S. A mechanism of cadmium poisoning: the cross effect of calcium and cadmium in the calmodulin-dependent system. *Arch Toxicol* 1990; 64: 161-4.