

UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Svetolik M. Spasić

EKSCITATORNO DEJSTVO  
2,4-DIAMINO BUTERNE KISELINE NA  
RETZIUS-OVE NEURONE I MEHANIZMI  
NJEGOVOG NASTANKA

doktorska disertacija

Beograd, 2020.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Svetolik M. Spasić

EXCITATORY EFFECT OF  
2,4-DIAMINO BUTYRIC ACID ON RETZIUS  
NEURONS AND ITS UNDERLYING  
MECHANISMS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020.

**Mentor doktorske disertacije:**

Prof. dr Srđan Lopičić, vanredni profesor

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

**Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:**

Prof. dr Jelena Nešović Ostojić, vanredni profesor,

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

Prof. dr Gordana Dragović Lukić, vanredni profesor,

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

Prof. dr Zorica Svirčev, redovni profesor,

Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

**Datum odbrane:**

*Mojim najmilijima*

# EKSCITATORNO DEJSTVO 2,4-DIAMINO BUTERNE KISELINE NA RETZIUS-OVE NEURONE I MEHANIZMI NJEGOVOG DEJSTVA

## Rezime

Neurodegenerativne bolesti su progresivna, hronična i neizlečiva neurološka oboljenja. Pretpostavlja se da je u osnovi etiopatogeneze ovih oboljenja udruženo delovanje genetskih i sredinskih faktora. Potonji imaju sve veći značaj jer produžetak životnog veka ljudi vodi do prolongiranog izlaganja činiocima životne okoline. Jedan od mogućih sredinskih činilaca je 2,4-diaminobuterna kiselina (2,4-DABA), produkt ubikvitarnih cijanobakterija, čiji neurotoksični potencijal nije sasvim istražen. Metodima klasične elektrofiziologije i merenjem ulaznog otpora membrane ispitivani su učinci, jačina i mehanizmi delovanja 2,4-DABA na Retzius-ove neurone pijavice *Haemopsis sanguisuga*. Naša istraživanja pokazuju da 2,4-DABA ima ekscitatoran učinak na neuronima, izazivajući izraženu depolarizaciju membranskog potencijala koja se razvija kroz dve faze, što je prvi put opisan fenomen na našem modelu. Istovetan učinak imaju i DL- i L- izoforma 2,4-DABA. Ekscitatorno dejstvo 2,4-DABA višestruko je jače od učinaka glutamata i aspartata, kao i od sredinskih ekscitatornih aminokiselina BOAA i BMAA. Depolarizacioni učinak 2,4-DABA je zavisen od prisustva  $\text{Na}^+$  i praćen povećanjem provodljivosti membrane Retzius-ovih neurona. Blokada non-NMDA glutamatnih receptora izaziva smanjenje amplitude prve faze depolarizacije, dok inhibicija transportnog sistema za neutralne aminokiseline upadljivo slabi drugu fazu depolarizacije. Zaključujemo da je 2,4-DABA snažna ekscitatorna aminokiselina koja ostvaruje svoj učinak preko jonotropnih glutamatnih receptora tokom prve faze i aktivacijom natrijum-zavisnog transportera za neutralne aminokiseline tokom druge faze depolarizacije. Ovi mehanizmi pokreću procese ključne za razvoj neurodegeneracije - ekscitotoksičnost, osmotsko opterećenje i smanjenje energetske rezervi neurona, što uz dokazano globalno prisustvo 2,4-DABA ukazuje na značaj navedenih rezultata.

**Ključne reči:** 2,4-diaminobuterna kiselina, Retzius-ovi neuroni pijavice, neurodegenerativna oboljenja, ekscitotoksičnost, jonotropni glutamatni receptori, CNQX, natrijum-zavisni transportni sistem za neutralne aminokiseline, L-alanin

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Fiziološke nauke

# EXCITATORY EFFECT OF 2,4-DIAMINO BUTYRIC ACID ON RETZIUS NEURONS AND ITS UNDERLYING MECHANISMS

## Abstract

Neurodegenerative diseases are chronic, progressive and incurable neurological illnesses. It is proposed that etiopathogenesis of these diseases is based on cooperation of genetic and environmental factors. The latter are of growing importance as life expectancy and exposure of people increase. A putative causative agent is 2,4 diaminobutyric acid (2,4-DABA), a product of ubiquitous cyanobacteria, whose neurotoxic potential is insufficiently examined. Using classical electrophysiology methods and measurements of input membrane resistance, we have investigated the effect, potency and mechanisms of 2,4-DABA effect on Retzius neurons of the leech *Haemopsis sanguisuga*. Our results show that 2,4-DABA has an excitatory effect on neurons, eliciting extensive membrane depolarization that evolves through two distinct stages, which is a novel excitatory phenomenon reported on our model. Both L- and DL- isomers of 2,4-DABA cause equivalent depolarizing effects. Excitatory response of neurons to 2,4-DABA is several times larger than that induced by glutamate and aspartate or environmental excitatory amino acids BOAA and BMAA. Depolarizing action of 2,4-DABA is dependent on sodium ions and coupled with an increase of Retzius neuron membrane permeability. Blocking non-NMDA glutamate receptor reduces the amplitude of the first stage, while inhibition of the transport system for neutral amino acids markedly decreases the second phase of depolarization. We conclude that 2,4-DABA is a potent excitatory amino acid that activates ionotropic glutamate receptors during the first stage and sodium-dependent transporter for neutral amino acids during the second stage of depolarization. These mechanisms initiate processes crucial for neurodegeneration - excitotoxicity, osmotic stress and energy depletion of neurons, which the global presence of 2,4-DABA indicate the significance of our results.

**Key words:** 2,4 diaminobutyric acid, leech Retzius neurons, neurodegenerative diseases, excitotoxicity, ionotropic glutamate receptors, CNQX, sodium-dependent transport system for neutral amino acids, L-alanine

**Scientific field:** Medicine

**Scientific subfield:** Physiological Sciences

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1 Ekscitatorne aminokiseline i ekscitotoksičnost .....	1
1.2 Uloga ekscitotoksičnosti u etiopatogenezi neurodegenerativnih bolesti .....	4
1.2.1 Alchajmerova bolest .....	4
1.2.2 Parkinsonova bolest .....	5
1.2.3 Hantingtonova bolest .....	6
1.2.4 Amiotrofična lateralna skleroza.....	7
1.2.5 Zapadnopacifički kompleks amiotrofična lateralna skleroza, parkinsonizam i demencija (ALS/PDC) i uloga $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA) .....	9
1.3 Ubikvitarne cijanobakterije i cijanotoksini .....	13
1.4 2,4-diaminobuterna kiselina (DABA).....	18
<b>2. CILJEVI</b> .....	<b>25</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>27</b>
3.1 Preparat .....	27
3.1.1 Nervni sistem pijavice <i>Haemopsis sanguisuga</i> .....	27
3.1.2 Retzius-ov neuron.....	28
3.2 Metoda .....	30
3.2.1 Preparacija izolovanih gangliona.....	30
3.2.2 Elektrofiziološke procedure, električni uređaji za registrovanje i draženje .....	31
3.2.3 Određivanje ulaznog otpora membrane .....	34
3.2.4 Korišćeni rastvori.....	35
3.3 Statistička analiza rezultata .....	36
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>37</b>
4.1 Dejstvo DL-2,4-diaminobuterne kiseline (DL-2,4-DABA) na membranski potencijal Retzius-ovih neurona .....	37
4.2 Dvofazna priroda dejstva DL-2,4-DABA.....	45
4.3 Poređenje dejstava DL-2,4-DABA i drugih ekscitatornih aminokiselina na membranski potencijal Retzius-ovih neurona .....	47
4.4 Izostanak funkcionalnog oporavka Retzius-ovih neurona.....	51

4.5 Poređenje dejstava DL-2,4-DABA i L-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona .....	54
4.6 Dejstvo DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona u izmenjenim jonskim uslovima .....	57
4.7 Uticaj DL-2,4-DABA na ulazni otpor membrane Retzius-ovih neurona .....	61
4.8 Uticaj blokatora non-NMDA jonotropnih glutamatnih receptora CNQX na promenu membranskog potencijala uzrokovanu primenom DL-2,4-DABA .....	66
4.9 Uticaj kompetitivnog inhibitora tansportnog sistema A (TSA), L-alanina na promenu membranskog potencijala uzrokovanu primenom DL-2,4-DABA .....	69
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>73</b>
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>83</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>85</b>



## 1. UVOD

Neurodegenerativne bolesti su velika grupa hroničnih, progresivnih i neizlečivih oboljenja, u kojima dolazi do propadanja neurona centralnog nervnog sistema. Odvijajući se svojim prirodnim tokom, ove bolesti dovode do trajne fizičke i mentalne onesposobljenosti pacijenata.

U neurodegenerativne bolesti ubrajaju se Alchajmerova bolest, Parkinsonova bolest, Hantingtonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza i druge.

Većina ovih bolesti povezana je sa starenjem, budući da se rizik od pojave jednog iz spektra neurodegenerativnih oboljenja povećava u kasnijoj životnoj dobi. Napredak u medicini, omogućio je produžetak životnog veka ljudi. Zbog toga, kako ljudska populacija stari, prevalencija neurodegenerativnih oboljenja raste i očekuje se da će nastaviti da raste sve bržim tempom. Iz ovih razloga neurodegenerativne bolesti predstavljaju veliki medicinski, socijalni i ekonomski problem.

Nepostojanje adekvatnih terapijskih pristupa koji bi ublažili napredak ili čak izlečili ove bolesti, pre svega je posledica nepotpunog poznavanja njihove etiologije i patogeneze. Dosadašnja istraživanja ukazuju da se u osnovi neurodegenerativnih oboljenja nalazi udruženo delovanje većeg broja faktora među kojima se izdvajaju genetski i sredinski činioci, od kojih poseban značaj imaju ekscitatorne aminokiseline.

### **1.1 Ekscitatorne aminokiseline i ekscitotoksičnost**

Interesovanje za nadražujuće dejstvo aminokiselina na neurone javlja se nakon što su 1959. godine Curtis i saradnici opisali depolarizujuće efekte glutamata na neurone kičmene moždine pacova (Curtis i sar., 1959). U narednih nekoliko godina ova istraživačka grupa pokazala je depolarizujuće efekte i drugih dikarboksilnih aminokiselina, kako endogenih (aspartat), tako i prirodnih i sintetičkih egzogenih aminokiselina (kviskalat, kainat, domoična kiselina, homocisteična kiselina, NMDA<sup>1</sup>) (Curtis i sar., 1960; Curtis i sar., 1963). U istom vremenskom periodu, Lucas i saradnici objavljuju prva zapažanja toksičnog učinka glutamata na neuronima mrežnjače novorođenih miševa, kojima su velike doze ove aminokiseline primenjivane supkutano (Lucas i sar., 1957). Olney i saradnici su, istražujući dugotrajna dejstva ekscitatornih aminokiselina, uočili pojavu produžene depolarizacije membrane neurona i povećane membranske propustljivosti za jone. Ispitujući karakteristike protražovanog dejstva glutamata na membranu neurona, ustanovili su da je uklanjanje jona natrijuma i hlora iz ekstraćelijske tečnosti sprečavalo nastanak toksičnih promena. Pretpostavili su da u osnovi neurotoksičnih efekata glutamata i njemu sličnih jedinjenja leži preterana ekscitacija neurona. Pošto je glutamat izazivao i ekscitaciju neurona i delovao toksično na iste, Olney je 1978. godine za ovu

---

<sup>1</sup> N-metil-D-aspartat, (engl. *N-methyl-D-aspartate*, NMDA)

posebnu formu neuronskog oštećenja predložio naziv *ekscitotoksičnost* (Olney, 1978). Ekscitotoksičnost podrazumeva transformaciju fiziološkog procesa ekscitatorne neurotransmisije u toksični mehanizam koji vodi destrukciji neurona. Postojanju povezanosti između ekscitatornog i neurotoksičnog učinka glutamata i njegovih strukturnih analoga govori u prilog susticanje ovih signala prvenstveno na membrani neurona, odnosno na nivou receptora za ekscitatorne aminokiseline.

U fiziološkim uslovima glutamatergička transmisija je strogo kontrolisan proces, a neuroni su izloženi kratkotrajnom delovanju ovog neurotransmitera u malim koncentracijama, dovoljnim za neurotransmisiju ili neurotrofičke efekte. Sinaptičko oslobađanje glutamata i njegova inaktivacija preuzimanjem u astroglijalne i/ili nervne ćelije transporterima za glutamat (EAAT<sup>2</sup>1-5) su precizno regulisani procesi. Najznačajniji transporter za glutamat je EAAT2/GLT-1 ispoljen na membranama astrocita. U pojedinim bolestima pojačano oslobađanje ili smanjeno preuzimanje glutamata mogu dovesti do povećanja njegove koncentracije u sinaptičkoj pukotini i produžene stimulacije glutamatnih receptora, što vodi u depolarizaciju neurona, stvarajući jonske struje koje pokreću mehanizme degeneracije, oštećenja i smrti neurona (Salinska i sar., 2005).

Glutamat i njegovi strukturni analozi ispoljavaju svoje efekte na neurone preko dva tipa receptora: jonotropni glutamatni receptori (iGluR) kojim pripadaju familije NMDA i AMPA<sup>3</sup>/kainatnih (non-NMDA) receptora i metabotropni glutamatni receptori (mGluR1-8). NMDA i AMPA receptori su ligand-zavisni jonski kanali koji omogućavaju ulazak jona natrijuma (Na<sup>+</sup>) u neurone i izlazak jona kalijuma (K<sup>+</sup>) iz njih, pri čemu je NMDA receptor značajno propustljiv i za ulazak jona kalcijuma (Ca<sup>2+</sup>). Selektivnu permeabilnost AMPA receptora za kalcijumove jone uslovljava odsustvo GluR2 subjedinice iz receptorskog kompleksa (Hollmann i sar., 1991). U fiziološkim uslovima, AMPA receptori posreduju u brznoj ekscitatornoj neurotransmisiji, dok NMDA receptori omogućavaju kasnu ekscitaciju neurona i igraju ključnu ulogu u plastičnosti sinapsi (Collingridge i sar., 1989). Choi i saradnici (1988) smatrali su da je isključivo aktivacija NMDA receptora bila odgovorna za nastanak ekscitotoksičnosti. Daljim istraživanjima postalo je očigledno da je i aktivacija AMPA receptora bila podjednako značajna u odvijanju mehanizama ekscitotoksičnosti (Prehn i sar., 1995).

Danas je poznato da se proces ekscitotoksičnosti odvija kroz ranu i poznu fazu. Ranu fazu pokreće nakupljanje glutamata ili nekog njegovog strukturnog analoga, odnosno ekscitatorne aminokiseline u sinaptičkoj pukotini. Usled ovog sinaptičkog događaja, dolazi do aktivacije jonotropnih glutamatnih receptora, inicijalno non-NMDA (AMPA/kainatnog) tipa, sa ulaskom jona natrijuma i jona hlora u nervne ćelije i izlaskom jona kalijuma iz njih. Ulazak natrijumovih i hloridnih

---

<sup>2</sup> transporter ekscitatornih aminokiselina (engl. *excitatory amino acid transporter*, EAAT)

<sup>3</sup>  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat (engl.  *$\alpha$ -amino-3-hidroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA)

jona višestruko prevazilazi izlazak kalijumovih jona, što vodi depolarizaciji membranskog potencijala pogođenih neurona (Dirnagl i sar., 1999). Ulazak natrijumovih i hloridnih jona u ćeliju remeti osmotsku ravnotežu neurona, dovodeći do ulaska vode i bubrenja postsinaptičkih struktura, dendrita i neuronskih tela, kao i astrocita (Rothman, 1985; Kiedrowski i sar., 1994; Inglefield i sar., 1998). Pokazano je da osmotski stres, nezavisno od dejstva ekscitatornih aminokiselina dovodi do bubrenja postsinaptičkih struktura u neuronima i pojačava sinaptičku ekscitaciju ćelija (Inglefield i sar., 1998), što vodi zatvaranju kruga ekscitacije i osmotskog stresa (Greenwood i sar., 2007).

Depolarizacija, inicijalno pokrenuta aktivnošću AMPA/kainatnih glutamatnih receptora uklanja voltažno-zavisni magnezijumski blok NMDA receptora, što uvodi neurone u poznu fazu ekscitotoksičnosti. Ovu fazu karakteriše porast unutarćelijske koncentracije kalcijumovih jona. Otvaranje ligand-zavisnog kanala NMDA tipa omogućava ulazak velike količine kalcijuma, a pored toga pojedini AMPA aktivirani receptori takođe pokazuju permeabilnost za kalcijumove jone. Depolarizacija membrane može dovesti i do aktivacije voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala L-tipa (engl. *long duration current*), preko kojih dolazi do dodatnog ulaska kalcijumovih jona u neurone (Arundine i sar., 2003). Unutarćelijsko nakupljanje natrijumovih jona, posledica aktivacije non-NMDA i NMDA receptora smanjuje koncentracioni gradijent za natrijum, što vodi do inverzije funkcije  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  membranskog izmenjivača te ubacivanja jona kalcijuma u neurone (Andreeva i sar., 1991; Kiedrowski i sar., 1994; Kiedrowski i sar., 2004). Stimulacija postsinaptičke membrane neurona ekscitatornom aminokiselinom aktivira i metabotropne glutamatne receptore, koji sistemom sekundarnih glasnika (npr.  $\text{IP}_3^4$ ) olakšavaju otpuštanje unutarćelijskih depoa kalcijumovih jona. Porast unutarćelijske koncentracije jona kalcijuma može aktivirati rijanodinske receptore na membrani endoplazmatskog retikuluma utičući na dodatno oslobađanje ovih jona u citosol neurona (Lee i sar., 1994). Sa druge strane, uklanjanje kalcijumovih jona iz citosola u toku ekscitotoksičnog oštećenja neurona je poremećeno usled inhibicije ATP-aznih transportera za kalcijum – membranskog transportera ( $\text{PMCA}^5$ ) i transportera na površini endoplazmatskog retikuluma ( $\text{SERCA}^6$ ) (Lehotsky i sar., 2002; Paschen, 2003).

Izuzetno visoke koncentracije kalcijumovih jona unutar neurona indukuju morfološke izmene organela, dovodeći do bubrenja Goldži aparata i mitohondrija, dok ulaskom u jedro, kalcijum izaziva agregaciju hromatina sa posledičnom kariopiknozom. Kalcijum unutar neurona aktivira brojne kalcijum-zavisne enzime koji remete homeostazu i dovode do smrti ćelije. Aktivacija endonukleaza vodi fragmentaciji DNK i hromatina (Orrenius i sar., 1989), a aktivacija proteaza kao što je  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisni kalpain izaziva poremećaj strukture citoskeleta i ćelijskih organela (Siman i sar., 1989;

---

<sup>4</sup> Inozitol-3-fosfat (engl. *inositol trisphosphate*,  $\text{IP}_3$ )

<sup>5</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-azna pumpa plazma membrane (engl. *plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-ase*, PMCA)

<sup>6</sup>  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-azna pumpa endoplazmatskog retikuluma (engl. *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-ase*, SERCA)

Mills i sar., 1990). Povećana aktivnost protein kinaze C (PKC) utiče na fosforilaciju citosolnih proteina i remetiti ćelijske funkcije (Favaron i sar., 1990), a stimulacija fosfolipaze A2 (PLA2) dovodi do oštećenja membrane neurona, kao i membrane citosolnih organela (De Cristobal i sar., 2001). Takođe, dolazi do stvaranja azot-oksida, peroksinitrita i drugih reaktivnih kiseoničnih jedinjenja (Garthwaite, 1991; Haskew i sar., 2002).

## **1.2 Uloga ekscitotoksičnosti u etiopatogenezi neurodegenerativnih bolesti**

Izučavanje fenomena ekscitotoksičnosti dovelo je do razvoja novih koncepata o patogenezi pojedinih neurodegenerativnih oboljenja. Dobro dokumentovana uloga ekscitotoksičnosti u nastanku pojedinih akutnih neuroloških poremećaja dovela je do porasta interesovanja za ulogu ekscitatornih aminokiselina u nastanku i razvoju hroničnih neuroloških oboljenja, odnosno neurodegenerativnih oboljenja.

### **1.2.1 Alchajmerova bolest**

Alchajmerova bolest (engl. *Alzheimer's disease*, AD) je jedno od najučestalijih neurodegenerativnih oboljenja i najčešći tip demencije kod pacijenata. Karakterišu je progresivni gubitak pamćenja i kognitivna disfunkcija. Morfološki supstrat ove bolesti predstavlja gubitak srednjih i velikih piramidalnih neurona frontalnog, parijetalnog i temporalnog režnja i hipokampusu, pojava ekstraćelijskih neuritičnih, senilnih plakova koji sadrže filamente  $\beta$ -amiloidnog peptida ( $A\beta$ ) i unutarćelijske neurofibrilarne klubadi (engl. *neurofibrillary tangles*, NFT) sačinjene od hiperfosforilisanog tau proteina (Olney i sar., 1998). Postoji holinergički deficit, kao i izmene sinapsi u korteksu, hipokampusu i drugim delovima mozga, odgovornim za kogniciju i memoriju (Dong i sar., 2009).

Pretpostavlja se da pojačana produkcija i nakupljanje  $\beta$ -amiloida ( $A\beta$ ) vodi povećanoj osetljivosti neurona na glutamat i pojavi ekscitotoksičnosti (Olney i sar., 1998). Pokazana je preterana aktivacija NMDA i kainatnih receptora u degeneraciji neurona posredovanoj  $\beta$ -amiloidom, uz pretpostavku da veliku ulogu igra poremećaj neuronske homeostaze kalcijuma (Mattson i sar., 1992). Nekontrolisano otpuštanje glutamata iz astrocita pod uticajem  $A\beta$  dovodi do pojačane stimulacije ekstrasinaptičkih NMDA receptora te gubitka dendritskih spina i neuronskih sinapsi (Talanta i sar., 2013). Takođe,  $A\beta$  omogućava produženo sinaptičko zadržavanje glutamata smanjenjem broja transportera za njegovo preuzimanje na astrocitnoj membrani (EAAT2) te doprinosi ekscitotoksičnom oštećenju neurona (Scimemi i sar., 2013). U uzorcima moždanog tkiva pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti potvrđeno je smanjenje EAAT2 astrocitnih transportera u predelu frontalnog korteksa (Li i sar., 1997). Sa druge strane, Velliquete i saradnici pokazali su da sniženje energetske depoa neurona usled glutatom izazvane ekscitotoksičnosti mogu doprineti povećanom

stvaranju A $\beta$  (Velliquette i sar., 2005). Takođe, pokazano je da glutamatergički neuroni pokazuju veću sklonost ka formiranju neurofibrilarne klubadi (Beal, 1992).

Memantin, nekompetitivni antagonist NMDA receptora umerenog afiniteta, koristi se u sklopu lečenja neurodegenerativne demencije. Male doze memantina efektivno smanjuju lezije holinergičkih neurona *nucleus basalis* Meynert (NBM) pacova kojima je u ovu strukturu direktno ubrizgan NMDA (Wenk i sar., 1994).

Iako transgeni animalni modeli Alchajmerove bolesti za ispitivanje stvaranja depozita A $\beta$  i senilnih plakova, kao i neuronalnih inkluzija tau proteina (Dawson i sar., 2018) pokazuju kako ekscitatorne aminokiseline nisu jedini faktor u nastanku ovog oboljenja, njihov značaj potvrđuju mnoga istraživanja. Tako su, Arendash i saradnici, sprovedi istraživanje koje je istaklo bihejvioralne i morfološke manifestacije Alchajmerove bolesti kod pacova 14 meseci pošto im je u regiju *nucleus basalis* Meynert aplikovana ibotenska kiselina, agonist NMDA receptora (Arendash i sar., 1987).

### 1.2.2 Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest (engl. *Parkinson's disease*, PD) je neurološko oboljenje, čija je dominantna motorna komponenta pre svega izazvana degeneracijom dopaminergičkih neurona u *pars compacta* supstancije nigre. Ovi neuroni daju projekcije u strijatum, gde se zbog drastično smanjenog oslobađanja dopamina ne može omogućiti regulacija signala iz korteksa u bazalne ganglije i regulacija talamokortikalnih motornih puteva, a u cilju planiranja i izvođenja pokreta (Ezza i sar., 2014). Najupadljivije manifestacije Parkinsonove bolesti su motorni poremećaji kao što su bradikinezija, rigiditet, tremor i posturalna nestabilnost.

Glutamat kao glavni ekscitatorni neurotransmiter, otpušta se iz presinaptičkih završetaka kortikalnih neurona u projekcijama ka strijatumu, subtalamičkom jedru, talamusu, *pars compacta* supstancije nigre, kao i u projekcijama ka moždanom stablu i kičmenoj moždini. Dopaminergičke projekcije iz *pars compacta* supstancije nigre ka bazalnim ganglijama regulišu ekscitatorno dejstvo pojedinih glutamatergičkih projekcija te smanjenje dopamina remeti funkcionisanje i regulaciju aktivnosti bazalnih ganglija, a povećanje ekscitacije glutamatom može voditi u ekscitotoksičnu kaskadu koja rezultuje neurodegeneracijom (Obeso i sar., 2008).

Destrukcija dopaminergičkih neurona pacova direktnom jednostranom injekcijom 6-hidroksidopamina (6-OHDA), dovođila je do kruženja životinje na tu stranu pošto je oslobađanje dopamina u kontralateralni strijatum bilo očuvano (Ungerstedt i sar., 1974).

Jedan od glavnih pokazatelja da sredinski faktori mogu igrati ulogu u nastanku Parkinsonove bolesti je model toksične degeneracije dopaminergičkih neurona uzrokovan direktnom primenom

1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), odnosno dejstvom MPP<sup>+</sup><sup>7</sup>, aktivnog metabolita MPTP (Schwarcz i sar., 1984). Hazell i saradnici pokazali su da primena MPTP sprečava funkcionisanje astrocitnog EAAT2 transportera za glutamat (Hazell i sar., 1997). Prekid kortikostrijatnih projekcija dekortikacijom ili primena MK-801 (dizocilpin) i CPP<sup>8</sup> (nekompetitivnog i kompetitivnog antagoniste NMDA receptora, respektivno) pokazali su neuroprotektivno dejstvo na dopaminergički sistem, kod ovog modela bolesti (Dong i sar., 2009). Takođe, primena riluzola ili lamotrigina, inhibitora presinaptičkog oslobađanja glutamata, dovela je do umanjenja MPP<sup>+</sup>-indukovanih efekata (Jones-Humble i sar., 1994).

### 1.2.3 Huntingtonova bolest

Huntingtonova bolest, Huntingtonova horea (engl. *Huntington's disease*, HD) je neurodegenerativno oboljenje koje dovodi do poremećaja motorike (diskinezije), a pogađa i sposobnosti razumevanja i kognicije, kao i emocionalni status pacijenata. GABA<sup>9</sup>-ergičke projekcije trnastih neurona srednje veličine (engl. *medium-size spiny neurons*, MSNs) u strijatumu su najozbiljnije pogođene degeneracijom (Dong i sar., 2009).

Nekoliko studija pokazalo je da injekcije kainata u strijatum pacova oponašaju biohemijske, morfološke i biohejvioralne promene, vrlo slične promenama kod ljudi obolelih od Huntingtonove bolesti (Coyle i sar., 1978). Kasnija istraživanja ukazala su i na značaj kvinolinske kiseline, čija primena je pokazivala još verodostojnije promene koje odlikuju ovu bolest (Beal i sar., 1991). Kvinolinska kiselina, koju iz triptofana sintetise 3-hidroksiantranilat oksidaza, prisutna je u malim koncentracijama u mozgu čoveka, a u uzorcima mozga pacijenata sa Huntingtonovom bolešću pokazan je povišen nivo ovog enzima (Schwarcz i sar., 1988). Direktna primena kvinolinske kiseline kod primata, pored morfoloških promena koje odgovaraju Huntingtonovoj bolesti, praćena je pojavom horeiformnih pokreta (Ferrante i sar., 1993). Upotreba antagonista NMDA receptora inhibirala je leziju neurona.

HD gen i proteinski produkt gena huntingtin (engl. *huntingtin*, htt), identifikovani su pre skoro dve decenije, pa ipak do danas nisu otkriveni patofiziološki mehanizmi ove bolesti. Zapažene su elektrofiziološke promene na ćelijama, kao i osetljivost glutamatnih receptora u ćelijama sa ekspanzijom htt proteina (Van Raamsdonk i sar., 2005). Pojedini autori smatraju da pojava mutantnog htt proteina u neuronima pojačava aktivnost NMDA receptora i remeti kalcijumske signale u ćeliji (Dong i sar., 2009). Postoji i sumnja da protein PSD-95 (engl. *post-synaptic density protein 95 kDa*) može predstavljati posrednika uticaja htt proteina na NMDA receptore. PSD-95 se vezuje za NR2

---

<sup>7</sup> 1-metil-4-fenilpiridinium (engl. *1-methyl-4-phenylpyridinium*, MPP<sup>+</sup>)

<sup>8</sup> 3-(2-Karboksipiperazin-4-il)propil-1-fosfonat (engl. *3-(2-Carboxypiperazin-4-yl)propyl-1-phosphonic acid*, CPP)

<sup>9</sup>  $\gamma$ -aminobuterna kiselina (engl.  *$\gamma$ -aminobutyric acid*, GABA)

subjedinice NMDA receptora, stabilizuje ih na membrani neurona, a otkriveno je da htt protein interreaguje i sa PSD-95 i NMDA receptorskim subjedinicama NR1, NR2A i NR2B. Pokazano je da ekspresija i ekspanzija htt proteina, doprinosi NR1A/NR2B-posredovanoj ekscitotoksičnoj smrti neurona, kao i da su ove NMDA receptorske subjedinice dominantno prisutne u receptorima na MSN neuronima (Dong i sar., 2009).

Izmenjena funkcija NMDA receptora opisana je i u neuronima kortikospinalnih puteva, tj. sinapsi, kao i da je jonska struja posredovana ovim receptorima u nekoliko animalnih modela HD i ćelijskih linija u kojima se nakuplja htt protein, pojačana do nivoa ekcitacije koju potom prati smrt ćelija usled ekscitotoksičnosti (Fan i sar., 2007).

#### *1.2.4 Amiotrofična lateralna skleroza*

Amiotrofična lateralna skleroza (engl. *amyotrophic lateral sclerosis*, ALS) je najčešće i najteže neurodegenerativno oboljenje motornih neurona. Karakteriše se progresivnom motornom slabošću, mišićnom atrofijom i degeneracijom lateralnih kortikospinalnih puteva, pa otuda i nosi naziv. Morfološki supstrat ovog oboljenja su progresivno oštećenje i centralnih i perifernih motornih neurona, odnosno degeneracija Betzovih neurona motorne kore sa posledičnom degeneracijom piramidnog puta, gubitak neurona u motornim jedrima kranijalnih živaca i oštećenje prednjih rogova posebno u cervikalnom i lumbalnom delu kičmene moždine.

Najviše podataka o značaju ekscitotoksičnosti u nastanku hroničnih neurodegenerativnih oboljenja vezano je za ulogu ekscitatornih aminokiselina u nastanku amiotrofične lateralne skleroze.

Poremećaj metabolizma glutamata nameće se kao jedan od mogućih uzročnika ALS. Uzorci cerebrospinalne tečnosti bolesnika sa ALS pokazuju povećane koncentracije glutamata, aspartata, kao i N-acetil-aspartata (NAA) i N-acetil-aspartil-glutamata (NAAG) (Rothstein i sar., 1990; Shaw i sar., 1995), čime je i potvrđena sumnja na postojanje poremećaja metabolizma ekscitatornih aminokiselina. Couratier i saradnici (1993) su uzorke cerebrospinalne tečnosti pacijenata sa ALS primenjivali na neurone u kulturi i primetili da cerebrospinalna tečnost pokazuje znatnu neurotoksičnost. Takođe su primetili da je istovremena primena antagonista AMPA/kainatnih receptora imala neuroprotektivno dejstvo, za razliku od antagonista NMDA receptora, koji nisu imali efekta. Zaključili su da cerebrospinalna tečnost pacijenata obolelih od ALS sadrži neurotoksičnu supstanciju koja svoj učinak ostvaruje preko non-NMDA (AMPA/kainatnih) receptora. Takođe, pokazano je da morfološki aspekt gubitka neurona u kičmenoj moždini kod životinja kojima je aplikovan kainat, odgovara promenama kod pacijenata sa ALS, što upućuje na značaj aktivacije AMPA receptora u destrukciji nervnih ćelija (Hugon i sar., 1989).

Nekoliko istraživanja pokazalo je da su u tkivu mozga i kičmene moždine pacijenata obolelih od ALS koncentracije glutamata i aspartata smanjene, kao i koncentracije NAAG i NAA (Plaitakis i sar., 1988; Rothstein i sar., 1990; Tsai i sar., 1991). Pošto su količine glutamata i drugih ekscitatornih aminokiselina i peptida najveće u neuronima, ovaj podatak govori u prilog selektivnog propadanja neurona uključenih u ekscitatornu neurotransmisiju. Povećana koncentracija glutamata u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata može biti posledica poremećaja u preuzimanju glutamata. Rothstein i saradnici (1992) ustanovili su da postoji poremećaj glutamatergičke transmisije, pokazujući smanjenje preuzimanja glutamata u preparate *post mortem* uzetih uzoraka kičmene moždine i motornog korteksa, i to u regionima gde su smeštena tela motornih neurona. Ustanovljeno je da se javlja gubitak EAAT2 transportera za glutamat na astrocitima kako u kičmenoj moždini, tako i u motornom korteksu. Lin i saradnici (1998) su uočili prisustvo aberantne EAAT mRNK koja se nalazi samo u delovima centralnog nervnog sistema pogođenim ALS. Ispitivanjem uticaja inhibitora preuzimanja glutamata u kulturama kičmene moždine potvrđena je posebna osetljivost motornih neurona i pokazano ekscitotoksično oštećenje ćelija. Neurotoksičnost inhibitora preuzimanja glutamata bila je suprimirana primenom antagonista AMPA/kainatnih receptora, ali ne i antagonista NMDA receptora (Rothstein i sar., 1993).

Dominantnu ulogu u ekscitotoksičnosti kod ALS igraju AMPA/kainatni receptori. Brojne eksperimentalne *in vivo* studije ukazale su na pojavu oštećenja motornih neurona kičmene moždine izazivano intraspinalnom ili intratekalnom primenom agonista AMPA receptora, pogotovo kainata, dok NMDA nije imala dejstvo (Curtis i sar., 1985; Pisharodi i sar., 1985; Hugon i sar., 1989; Urca i sar., 1990; Nakamura i sar., 1994). Stimulacija AMPA receptora u *in vitro* studijama na kulturama motornih neurona potvrdila je rezultate *in vivo* eksperimenata, a istaknut mehanizam oštećenja neurona ogledao se u preteranom ulasku kalcijumovih jona kroz preterano nadražene AMPA receptore (Van Den Bosch i sar., 2000; Van den Bosch i sar., 2002).

Selektivnost degeneracije, odnosno osetljivost motornih neurona na preteranu stimulaciju još uvek nisu sasvim rasvetljeni kod ALS. Poremećaj homeostaze kalcijuma, kao jedan od glavnih događaja u toku ekscitotoksičnog oštećenja neurona, daje mogući odgovor, budući da motorni neuroni kičmene moždine ne poseduju parvalbumin i kalbindin D-28K, proteine koji olakšavaju regulaciju unutraćelijskih nivoa kalcijuma (Ince i sar., 1993). Ustanovljeno je i da u prednjim rogovima kičmene moždine pacijenata sa ALS postoji poremećaj ekspresije GluR2 subjedinice AMPA receptora, što ga čini izrazito propustljivim za jone kalcijuma (Takuma i sar., 1999). Dokazano je da u ovakvim uslovima i fiziološke koncentracije glutamata mogu izazvati degeneraciju neurona.



Indirektan pokazatelj značaja ekscitotoksičnosti u nastanku i razvoju ALS je efekat riluzola, inhibitora oslobađanja glutamata koji usporava progresiju simptoma bolesti i produžava preživljavanje pacijenata (Bensimon i sar., 1994; Lacomblez i sar., 1996).

Mnogi autori smatraju da jednu od najznačajnijih uloga u nastanku ALS imaju poremećaji Cu/Zn superoksid dismutaze (SOD) (Cluskey i sar., 2001). Pokazano je da mutacije u genu za SOD povećavaju osetljivost motornih neurona na ekscitotoksičnost (Van Den Bosch i sar., 2006). Udruženo dejstvo ekscitatornih aminokiselina i poremećaj SOD mogu dovesti do nagomilavanja slobodnih radikala i time do oksidativnog oštećenja neurona i neurodegeneracije.

### *1.2.5 Zapadnopacifički kompleks amiotrofična lateralna skleroza, parkinsonizam i demencija (ALS/PDC) i uloga $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA)*

Na zajedničku etiologiju i patogenezu neurodegenerativnih bolesti najviše ukazuje njihova udružena pojava. Zapadnopacifički kompleks amiotrofična lateralna skleroza, parkinsonizam i demencija (ALS/PDC) jedan je od upečatljivih primera istovremene pojave više neurodegenerativnih oboljenja kod jednog bolesnika. Ovo oboljenje je klinički i patološki podsećalo na ALS, ali je incidencija obolevanja bila jako visoka.

Među velikim žarištima ALS/PDC u području zapadnog Pacifika, kao što su poluostvo Ki u Japanu i Zapadna Papua, bolest je najdetaljnije ispitana i opisana u domorodačkoj populaciji Čamoro (engl. *Chamorro*) na ostrvu Guam, gde je učestalost obolevanja, u periodu kada je bolest otkrivena, bila 100 puta veća nego u opštoj populaciji drugde u svetu (Kurland i sar., 1954; Mulder i sar., 1987).

Kliničke manifestacije zapadnopacifičkog kompleksa u početku odgovarale su sporadičnoj formi ALS, sa pojavom progresivne mišićne atrofije, teške pareze, paralize i spasticitetom. U kasnijim fazama javljao se kognitivni deficit (Hof i sar., 1994a). U pomenutim žarištima, parkinsonizam se odlikovao usporenošću voljne motorike, rigiditetom i tremorom, a obično je bio praćen i progresivnom demencijom (Garruto i sar., 1986). Vremenom se klinički aspekt ovog oboljenja izmenio, te simptomi i znaci parkinsonizma i demencije dominiraju nad neurološkim ispadima nalik ALS-u (Banack i sar., 2010a).

Morfološki supstrat ALS/PDC upotpunio je kliničke manifestacije ovog oboljenja. Kod bolesnika pomenutih žarišta sa dominantnim ispoljavanjem ALS simptoma ili simptoma parkinsonizma i demencije, ustanovljeno je prisustvo atrofije frontalnih i temporalnih režnjeva uz detekciju neurofibrilarne klubadi u hipokampusu, neokorteksu, parahipokampalnom girusu, subkortikalnim jedrima i kičmenoj moždini, a koje sačinjava tau protein, sličnih izoformi kao kod Alchajmerove bolesti (Hof i sar., 1994b; Kuzuhara i sar., 2005). Sa druge strane, gubitak motornih neurona uz posledičnu degeneraciju kortikospinalnih puteva, karakterističan patohistološki nalaz kod ALS, bili su takođe prisutni kod obe forme ovog kompleksnog oboljenja (Kuzuhara i sar., 2005).

Pošto uticaj genetskih faktora nije mogao da pojasni endemsku pojavu zapadnopacifičkog ALS/PDC kompleksa, na značaju je dobilo ispitivanje uticaja sredinskih činilaca koji bi mogli da uzrokuju ili doprinesu nastanku ovog oboljenja. Epidemiološka ispitivanja Plato i saradnika pokazala su drastičan pad incidencije i prevalencije ALS/PDC, koje danas u žarištima ovog oboljenja dostižu vrednosti za opštu populaciju drugde u svetu, zahvaljujući etnografskim, socijalnim i ekološkim promenama koje se poslednjih godina događaju na Guamu. Ovo indirektno ukazuje na značaj sredinskih faktora kao glavnih uzročnika bolesti (Plato i sar., 2003).

Istraživanjem potencijalnih sredinskih faktora i etnografskih prilika u žarišnim regionima ALS/PDC, jedna zajednička epidemiološka karakteristika svih pogođenih domorodaca bila je upotreba semena palme *Cycas micronesica* Hill (ranije poznate kao *Cycas circinalis*). Seme palme *Cycas* mleveno je u brašno za ishranu i za medicinske svrhe (Spencer i sar., 1987b; Spencer i sar., 1987c; Kurland, 1988). Analizom semena ove palme identifikovano je nekoliko toksičnih supstancija, od kojih je najveće interesovanje izazvala aminokiselina β-N-metilamino-L-alanin (BMAA). Ovu aminokiselinu prvi su izolovali Vega i Bell 1967. godine iz uzoraka *Cycas micronesica* sa Guama (Vega i sar., 1967).

Neurotoksičnost BMAA pokazana je kroz brojne *in vivo* studije: kod pilića nakon intraperitonealne primene dolazilo je do nestabilnosti prilikom stajanja, poremećaja uspravnog stava tela i čestog padanja uz nemogućnost ustajanja, kod pacova po intraperitonealnoj ili intracerebroventrikularnoj primeni javljala se nesigurnost hoda, ataksija, slabost ekstremiteta i konvulzije, dok je kod miševa ovaj put primene doveo do pojave hiperekscitabilnosti i drhtanja tela (Karamyan i sar., 2008). Spenser i saradnici (1987a) publikovali su rezultate jedne od najznačajnijih *in vivo* studija, gde je hronična ekspozicija primata BMAA u različitim dozama hranjenjem dovela do poremećaja koji su podsećali na ALS – poremećaji primarnih motornih puteva, gornjeg i donjeg motornog neurona, kao i ekstrapiramidalnih puteva uz patohistološki pokazanu posebnu osetljivost motornog korteksa i kičmene moždine ovoj aminokiselini. Novija studija Cox i saradnika pokazala je da je kod primata hranjenih BMAA-obogaćenom hranom ustanovljeno prisustvo neurofibrilarne klubadi sačinjene od hiperfosforilisanog tau proteina u motornom, frontalnom, temporalnom i okcipitalnom korteksu, amigdalama i entorinalnoj regiji (Cox i sar., 2016). Veći deo ovih studija pokazao je manje izražene efekte BMAA ukoliko je bila primenjena sa antagonistima NMDA i non-NMDA jonotropnih glutamatnih receptora (MK-801, AP5<sup>10</sup>, AP-7<sup>11</sup>, DNQX<sup>12</sup>).

---

<sup>10</sup> D-2-amino-5-fosfonopentanoična kiselina (engl. *D-2-amino-5-phosphonopentanoic acid*, AP5)

<sup>11</sup> D-2-amino-7-fosfonoheptanoična kiselina (engl. *D-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid*, AP-7)

<sup>12</sup> 6,7-dinitrokvinoxalin-2,3-dion (engl. *6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione*, DNQX)

Komplementarnost u ispitivanjima dejstva BMAA pružile su *in vitro* studije, prateći morfološke promene – postsinaptičku vakuolizaciju i neurodegeneraciju neurona u eksplantima korteksa i kulturi neurona kičmene moždine (Nunn i sar., 1989), pojavu i nekroze i apoptoze cerebelarnih neurona (Staton i sar., 1997) nakon izlaganja BMAA, kao i oslobađanje laktatne dehidrogenaze (LDH) iz isečaka mišijih mozгова, kao biohemijskog pokazatelja oštećenja neurona (Pai i sar., 1993).

Ispitivanje mehanizma dejstva BMAA i danas izaziva najviše interesovanja. Allen i saradnici (1995) postavili su sumnju da BMAA deluje na NMDA receptore kao agonista i modulator, jer se vezuje za glicinsko mesto receptora. Poseban iskorak ka razumevanju mehanizama delovanja BMAA omogućilo je ispitivanje fizioloških koncentracija bikarbonatnih jona koji pojačavaju ekscitatorno dejstvo ove aminokiseline. Sumnja o ulozi BMAA u etiologiji ALS/PDC, budući da su koncentracije supstance potrebne za eksperimentalno postizanje neurotoksičnih efekata bile izuzetno velike, delom je umanjena rezultatima istraživanja sadejstva BMAA i bikarbonata. Wiess i saradnici su u seriji eksperimenata utvrdili da je BMAA dosta toksičnija u medijumu sa bikarbonatom, a učinak se ispoljava aktivacijom jonotropnih glutamatnih receptora (Weiss i sar., 1988; Weiss i sar., 1989a). Aktivacija ovih glutamatnih receptora mogla je biti objašnjena doniranjem karbamatne grupe bikarbonata molekulu BMAA, čime se transformisao u dikarboksilnu strukturu sličnu molekulu glutamata. Ovim je postuliran neurotoksični potencijal karbamata BMAA kroz aktivaciju jonotropnih glutamatnih receptora (Rakonczay i sar., 1991). Aktivacija jonotropnih glutamatnih receptora pod uticajem BMAA u bikarbonatnom medijumu pokazana je i elektrofiziološkim ispitivanjima. Rezultati Nedeljkova i saradnika i Lopičića i saradnika (Nedeljkov i sar., 2005; Lopivic i sar., 2009a) pokazali su da u prisustvu bikarbonata postoji četverostruki porast depolarizacije membrane Retzius-ovih neurona pijavice indukovane primenom BMAA. Uočljiv pad ulaznog otpora direktno podražene membrane nervne ćelije usled primene BMAA u bikarbonatnom medijumu bio je praćen porastom unutarćelijske aktivnosti jona natrijuma i kalcijuma, a smanjenjem aktivnosti jona kalijuma (Lopivic i sar., 2002; Rao i sar., 2006; Lopivic i sar., 2009a). Značaj stimulacije non-NMDA receptora pokazan je primenom CNQX<sup>13</sup>, antagoniste ovih receptora, pri čemu dolazi do pada uticaja BMAA na membranski potencijal i jačinu jonskih struja kroz membranu neurona (Allen i sar., 1993; Rao i sar., 2006; Lopivic i sar., 2009a). Sa druge strane, nekoliko istraživanja pokazalo je da BMAA izaziva aktivaciju metabotropnih glutamatnih receptora, pokrećući fosfolipazu C (PLC) i stvaranje IP<sub>3</sub>, ali i porast unutarćelijske koncentracije kalcijuma što aktivira mehanizme oksidativnog stresa stvarajući reaktivne kiseonične radikale (Copani i sar., 1990; Copani i sar., 1991; Rao i sar., 2006; Lobner i sar., 2007).

---

<sup>13</sup> 6-cijano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion (engl. *6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione*, CNQX)

Hipoteza o ulozi semena palme *Cycas*, odnosno BMAA, potentnog neurotoksina izolovanog iz njega kao mogućeg uzročnika ALS/PDC bila je dovedena u pitanje neslaganjem izuzetno velikih doza BMAA korišćenih u istraživanjima i niske koncentracije ove aminokiseline u hrani koju su domoroci koristili. Potapanje i ispiranje semena palme u procesu pravljenja brašna koje se koristi u ishrani uklanjali su značajne količine BMAA. Koncentracije slobodne BMAA u tako dobijenom brašnu bile su toliko male, da je za postizanje toksičnih doza koju su za primata korsičili Spencer i saradnici (1987a) bilo neophodno uneti nerealno veliku količinu brašna svakodnevno (Duncan i sar., 1990; Kisby i sar., 1992). Pokazano je da je BMAA u brašnu semena palme bila 20 do 25 puta zastupljenija u formi vezanoj za proteine, nego u slobodnoj što je dalo objašnjenje na prijavljene male koncentracije ove aminokiseline u ranijim istraživanjima (Cox i sar., 2003; Murch i sar., 2004a; Murch i sar., 2004b).

Otkriće Cox i saradnika da je BMAA produkt cijanobakterija roda *Nostoc* koje simbiotski žive u korenu palme *Cycas micronesica*, kao i da se količina ove aminokiseline uvećava kroz lanac ishrane od cijanobakterija do čoveka, dala je novo gledište na staru hipotezu (Cox i sar., 2003). Detaljnim etnološkim i botaničkim ispitvanjima zapaženo je da je u tradicionalnoj ishrani na Guamu delikates bio slepi miš *Pteropus mariannus mariannus* kog su domoroci konzumirali celog, uključujući i krzno (Cox i sar., 2002; Banack i sar., 2003a). Pošto se slepi miševi hrane semenom i drugim delovima palme *Cycas*, analiza uzoraka tkiva životinje pokazala je izuzetno visoku koncentraciju BMAA u njima te je zaključeno da se ova aminokiselina koncentriše u tkivima *P. mariannus mariannus* (Banack i sar., 2003a). Pretpostavljen fenomen biomagnifikacije, odnosno povećanja koncentracije supstancije u tkivima životinja na različitim nivoima lanca ishrane, dao je objašnjenje unosa velikih količina BMAA svakodnevnom ishranom domorodaca (Cox i sar., 2003). Kasnije je i u uzorcima mozгова pripadnika Čamoro naroda koji su umrli od ALS/PDC otkriveno prisustvo BMAA (Cox i sar., 2003; Murch i sar., 2004b).

Zanimljivo je što je i u *post mortem* uzetim uzorcima mozgovia pacijenata sa sporadičnim formama ALS i Alchajmerove demencije van oblasti zapadnog Pacifika utvrđeno prisustvo ove aminokiseline (Murch i sar., 2004a; Pablo i sar., 2009). Nalazi ovakvih studija o sporadičnim formama neurodegenerativnih oboljenja i činjenica da BMAA i njene strukturne izomere proizvode cijanobakterije, proširili su vidike istraživačima o uticaju cijanobakterija i njihovih toksina van granica žarišnog područja zapadnog Pacifika.

Cijanobakterije u slobodnoj ili simbiotskoj formi su ubikvitarni organizmi, prisutni u zemljištu, slatkim i slanim vodama širom sveta, pa i u aerosolima. Ovo je posebno interesantno pošto fenomen biomagnifikacije cijanotoksina podrazumeva vezu cijanobakterija, najnižeg nivoa lanca ishrane sa čovekom, koji je izložen cijanotoksinima preko zemljišta, vode i aerosola, kao i biljaka i životinja koje koristi u ishrani.

Savremeni trendovi ekotoksikologije postavljaju pitanje uticaja cijanobakterija i cijanotoksina u nastanku neurodegenerativnih oboljenja na globalnom nivou.

### **1.3 Ubikvitarne cijanobakterije i cijanotoksini**

Cijanobakterije, jedan od najstarijih oblika života na planeti su mikroskopske „plavo-zelene alge“ koje vrše fotosintezu, jedine su fotosintetske prokariote koje produkuju kiseonik, a neke od njih vezuju atmosferski azot. Globalno gledano, najviše naseljavaju mirnije i manje turbulentne vodene sredine, odnosno i morske i slatkovodne ekosisteme, ali je njihovo prisustvo pokazano i u pokoricama i tlu pustinjskih predela, pa i u aerosolima pomenutih sredina. Takođe, ovi mikroorganizmi mogu nastanjivati potoke ispod glečera i jezera polarnih pustinja Arktika i Antarktika, gde formiraju cijanobakterijske „prostirke“ ili su u simbiozi sa lišajima na tlu (Cires i sar., 2017). Ovi organizmi, koji nisu uvek zelene, već mogu biti crvene ili braon boje mogu se u vodenim ekosistemima pojedinačno organizovati u obliku fitoplanktona. Međutim, pod povoljnim uslovima eutrofikacije (porast koncentracije nutrijenata) i porasta temperature vode, cijanobakterije pokazuju sklonost ka eksponencijalnom razmnožavanju i stvaranju cvasti (engl. *harmful algal blooms*, HABs), koje mogu obuhvatiti druge organizme kako bi se dalje razmnožavale i produkovale cijanotoksine (Codd, 2000). Formiranju cvasti i širenju cijanobakterija pogoduju klimatske promene i biozagađenje, podstaknuto industrijalizacijom i razvojem zemljoradnje.

Toksini cijanobakterija mogu se podeliti u neurotoksine (saksitoksin, anatoksini, homoanatoksin), hepatotoksine (mikrocistini, cilindrospermopsin i nodularin), citotoksine (apliziatoksin, lingbiatoksin, lipopolisaharid endotoksin) i iritance kože i gastrointestinalnog trakta (Drobac i sar., 2013). BMAA i njeni strukturni izomeri pripadaju grupi cijanobakterijskih produkata sa izraženim neurotoksičnim potencijalom.

Čovek može biti izložen cijanobakterijama i njihovim toksinima unošenjem kontaminirane pijaće vode, kao i konzumiranjem biljaka i životinja u čijim tkivima se ovi toksini koncentrišu – voća i povrća navodnjavanog iz kontaminiranih vodenih kolekcija, životinja koje naseljavaju kontaminirane vodene ekosisteme i/ili su u lancu ishrane izložene pomenutim izvorima cijanotoksina (Drobac i sar., 2013). U vodenim ekosistemima, cijanobakterije se mogu razvijati na površini morske trave, kao i tela ljuskara, riba, formirati biofilmove na površini ostriga, školjki i dagnji i/ili se koncentrisati u njihovim tkivima (Abeywardena i sar., 2018). Takođe, moguće je izlaganje ljudi aerosolizovanim cijanotoksinima u okolini kontaminiranih vodenih površina (Banack i sar., 2015) ili aerosolizovanim cijanobakterijama i njihovim toksinima uznemiravanjem sasušenih pustinjskih pokorica i zemljišta (Cox i sar., 2009). Takođe, rizik od izlaganja cijanobakterijskim toksinima javlja se i konzumiranjem dijetetskih cijanobakterijskih suplemenata nekontrolisanih nivoa cijanotoksina ili čak pojedinih vrsta cijanobakterija (Gantar i sar., 2008; McCarron i sar., 2014).

U pojedinim regionima Evrope, Severne Amerike i Azije uočena je povećana incidencija obolevanja od neurodegenerativnih bolesti kod pacijenata bez pozitivne porodične anamneze, pogotovo sporadičnih slučajeva ALS (sALS). Epidemiološke studije u pomenutim područjima pokazale su prisustvo cijanobakterija koje proizvode BMAA i njene strukturne izomere, posebno od značaja 2,4 – diaminobuternu kiselinu (2,4-DABA). Ranija ispitivanja uzoraka na prisustvo BMAA nailazila su na poteškoće usled nesavršenosti tehnike ispitivanja, odnosno uočeno je mešanje identifikacije BMAA sa 2,4-DABA (Rosen i sar., 2008). Međutim, razvojem suverenijih i senzitivnijih analitičkih metoda u uzorcima vode, cijanobakterijskih cvasti i vazduha u blizini vodenih površina, uzorcima zemljišta, kao i u tkivima životinja koje su uključene u ove ekosisteme i predstavljaju izvor hrane za ljude, pored BMAA potvrđeno je prisustvo značajnih koncentracija 2,4-DABA (Rosen i sar., 2008; Faassen i sar., 2009; Banack i sar., 2010b; Kruger i sar., 2010; Spacil i sar., 2010). Ovo je dalo uvid u postojanje globalne distribucije 2,4-DABA i njen značaj kao sredinskog toksina, uzimajući u obzir sveprisutnost cijanobakterija. Na značaj cijanobakterijskog stvaranja 2,4-DABA ukazali su još Krüger i saradnici navodeći desetostruko povećanje prisustva ove aminokiseline u uzorcima cijanobakterija, u odnosu na dotadašnje granične vrednosti utvrđene ispitivanjem semena *Cycas sp.* (Kruger i sar., 2010).

Cijanobakterije i njihovi toksini najrasprostranjeniji su u vodenim ekosistemima. Veliki broj studija bavio se ispitivanjem prisustva BMAA i njenih izomera u uzorcima cijanobakterija, kako uzgajanih u kulturama, tako i uzorkovanih na terenu. Jedan broj istraživanja potvrdio je prisustvo i BMAA i 2,4-DABA u terenskim uzorcima voda u kojima postoje cijanobakterijske cvasti ili uzorcima cijanobakterija sa površine komunalnih voda (Faassen i sar., 2009) i slatkovodnih jezerskih sistema (Al-Sammak i sar., 2013; Al-Sammak i sar., 2014; Roy-Lachapelle i sar., 2015). Zanimljivo je da su u pojedinim ispitivanjima terenski uzorkovanih cijanobakterija iz jezerskih (Bishop i sar., 2018) i morskih ekosistema (Spacil i sar., 2010; Chatziefthimiou i sar., 2018) i komunalnih voda (Main i sar., 2018) ustanovljene koncentracije 2,4-DABA bile višestruko veće od koncentracija BMAA ili je 2,4-DABA jedino mogla biti detektovana (Craighead i sar., 2009). Takođe, analizom kultura cijanobakterija prethodno prikupljenih iz slatkovodnih i morskih ekosistema, pokazano je da su one u stanju da proizvode isključivo 2,4-DABA, dok BMAA u uzorcima nije mogla biti detektovana (Rosen i sar., 2008; Li i sar., 2012; Reveillon i sar., 2014; Fan i sar., 2015). Pokazano je takođe da velike koncentracije fosfata, jako osvetljenje i visoka temperatura pogoduju produkciji 2,4-DABA od strane kultivisanih cijanobakterija (Fan i sar., 2015).

Ispitivanja terenski uzorkovanih i kultivisanih mikroalgi – diatoma i dinoflagelata pokazala su mnogostruko povećane koncentracije 2,4-DABA u poređenju sa koncentracijama BMAA (Reveillon i sar., 2015; Reveillon i sar., 2016; Chatziefthimiou i sar., 2018), što je značajno budući

da one obitavaju u morskim ekosistemima i predstavljaju izvor hrane za mekušce, za koje se pretpostavlja da mogu koncentrisati ove cijanotoksine.

Veliki broj ispitivanja uzoraka mekušaca – školjki, ostriga i dagnji ukazali su ne samo na prisustvo, već i na koncentrisanje 2,4-DABA i BMAA. Povećana incidencija obolevanja od ALS kod pacijenata bez pozitivne porodične anamneze u predelu Tu lagune, glavne regije uzgajanja i proizvodnje morskih plodova francuske obale Mediterana, ukazala je na dugogodišnje korišćenje mekušaca u ishrani kao mogućeg uzroka ove bolesti. U ispitivanim uzorcima morske vode ove regije ustanovljeno je postojanje cijanobakterija (Masseret i sar., 2013). Uzorci tkiva ulovljenih, kao i komercijalno dostupnih, uzgajanih ostriga i dagnji iz područja Tu lagune pokazali su prisustvo BMAA i njenih strukturnih izomera 2,4-DABA i AEG<sup>14</sup> (Masseret i sar., 2013; Reveillon i sar., 2014), pri čemu su koncentracije detektovane 2,4-DABA bile veće od njenih izomera (Reveillon i sar., 2015; Reveillon i sar., 2016). Pretpostavljeno je da su mekušci u lancu ishrane bili izloženi cijanotoksinima hraneći se mikroalgama i mikroorganizmima sestona (Reveillon i sar., 2015). Sa druge strane i uzorci ostriga dostupni za kupovinu i ishranu na Baltiku pokazali su višestruko veće koncentracije 2,4-DABA nego BMAA (Spacil i sar., 2010). Značaj mekušaca kao izvora cijanotoskina ustanovili su i Li i saradnici, ispitujući 68 uzoraka školjki i puževa, prikupljenih iz različitih morskih ekosistema Kine. U većini uzoraka bilo je dokazano postojanje 2,4-DABA, nevezano za region prikupljanja ili vrstu mekušca koji su uzorkovani, dok je prisustvo BMAA bilo ustanovljeno samo u par uzoraka, pa čak i tada uz prisustvo 2,4-DABA (Li i sar., 2016).

Slični nalazi dobijeni su u studijama koje se ispitivale prisustvo BMAA i njenih izomera u tkivima riba, koje pripadaju morskim ili slaktovodnim ekosistemima. Al-Sammak i saradnici (2014) potvrdili su prisustvo cijanotoksina BMAA i 2,4-DABA u tkivima riba (šarana i somova) koje obitavaju pri jezerskom dnu i hrane se algama i vodenim biljkama u jezerskim sistemima centralnog dela SAD, poznatim po bujanju cijanobakterijskih cvasti. Uzorci mozga riba (šarana) ulovljenih u jezeru Maskoma na istoku SAD, oko kog postoji endemsko grupisanje pacijenata sa sporadičnom formom ALS i u kome se javljaju cijanobakterijske cvasti analizom su pokazali prisustvo BMAA i 2,4-DABA (Banack i sar., 2015). Chatziefthimiou i saradnici ispitivali su uzorke tkiva riba Persijskog zaliva iz demerzalnih, pelagičkih i bentičkih morskih zona, odnosno riba različitih nivoa u lancu ishrane, a zastupljenih u ishrani ljudi. U svim uzorcima pokazano je prisustvo 2,4-DABA, dok BMAA nije bila detektovana (Chatziefthimiou i sar., 2018).

Uzorci tkiva ljuskara – rakova i jastoga takođe su pokazali koncentrisanje kako BMAA tako i 2,4-DABA. Field i saradnici ispitivali su tri slučaja pacijenata obolelih od ALS bez porodične anamneze ove bolesti i povezali ih sa višegodišnjim konzumiranjem plavih kraba iz područja Čezapik

---

<sup>14</sup> N-2-aminoetil glicin, N-2-aminoethyl glycine (AEG)

zaliva istočne obale SAD, poznatog po prisustvu cijanobakterijskih cvasti. Analizom tkiva ovih ljuskara otkriveno je prisustvo BMAA i 2,4-DABA, pri čemu je vidno povećanje koncentracija ovih cijanotoksina uočeno u vodi u kojoj su kuvanjem rakovi bili termički obrađivali (Field i sar., 2013). Slično istraživanje sprovedli su Banack i saradnici, ispitujući mogući uticaj cijanotoksina u razvoju sporadične forme ALS kod pacijenta iz zaliva južne Floride, koji je u višegodišnjem periodu pre postavljanja dijagnoze u ishrani koristio kuvane repove jastoga. Ispitujući uzorke tkiva skladištenih jastoga ustanovljeno je da su koncentracije 2,4-DABA bile znatno veće od koncentracija BMAA, što je povezano sa učestalim prisustvom cijanobakterijskih cvasti u lokalnom morskom ekosistemu (Banack i sar., 2014). Uzorci račića i plavih kraba iz morske vode Persijskog zaliva, koji se hrane diatomama, malim ljuskarima i mekušcima, pokazali su prisustvo 2,4-DABA, ali strukturni analog BMAA nije bio detektovan (Chatziefthimiou i sar., 2018).

Analiza uzoraka tkiva životinja vodenih ekosistema, često korišćenih u ishrani ljudi, pokazali su dve bitne činjenice: 1) postoji bioakumulacija cijanotoksina u tkivima životinja viših nivoa lanca ishrane (Jonasson i sar., 2010; Banack i sar., 2014; Reveillon i sar., 2015; Chatziefthimiou i sar., 2018) i 2) u uzorcima tkiva životinja u većini slučajeva 2,4-DABA je bila ili prisutna u koncentracijama većim od koncentracija BMAA (Banack i sar., 2014; Reveillon i sar., 2015; Li i sar., 2016; Reveillon i sar., 2016) ili jedino detektovana (Li i sar., 2016; Chatziefthimiou i sar., 2018).

Dodatni rizik izlaganju cijanotoksinima je dijetetsko korišćenje suplemenata i zdravih „zelenih“ napitaka koji sadrže cijanobakterije *Arthrospira platensis*, komercijalno poznatije kao „spirulina“. U uzorcima sirove spiruline ili napitaka koji sadrže spirulinu, a koji se koriste u svakodnevnoj suplementaciji, pokazano je prisustvo 2,4-DABA i AEG, dok BMAA nije bila detektovana (McCarron i sar., 2014). Slično istraživanje sprovedli su Glover i saradnici, ispitujući komercijalno dostupne praškaste proteinske suplemente koji su sadržali spirulinu. Rezultati njihovog istraživanja pokazali prisustvo BMAA, 2,4-DABA i AEG, s tim što su koncentracije 2,4-DABA u većini uzoraka bile višestruko veće od njenih strukturnih izomera (Glover i sar., 2015).

Uključivanje životinja viših nivoa lanca ishrane vodenih ekosistema pokazano je i na primeru patuljastih flaminga koji su se hranili cijanobakterijama i bentičnim diatomama jezerskih sistema u Keniji. Analiza perja krila nakon masovnog pomora ovih ptica pokazala je prisustvo značajno većih koncentracija 2,4-DABA u odnosu na koncentracije strukturnog izomera BMAA (Metcalf i sar., 2013).

Čovek može biti izložen cijanobakterijama i/ili njihovim toksinima i u vazduhu. Uzorci aerosola, prikupljeni filterima u području jezera Maskoma, gde je utvrđeno endemsko postojanje sporadične forme ALS, pokazali su prisustvo 2,4-DABA, ali i BMAA i njenog drugog strukturnog izomera AEG, dok cijanobakterije kao i njihov genetski materijal nisu bili detektovani. Kako je poznato da u ovom jezeru bujaju cijanobakterijske cvasti, posumnjano je da stvaranje pene na površini



jezera u kojoj su cijanobakterije i remećenje integriteta ovih cvasti omogućavaju otpuštanje cijanotoksina (Banack i sar., 2015). Učestalija pojava sporadične forme ALS kod vojnika, angažovanih tokom Zalivskog rata u pustinjskim predelima, zainteresovala je Cox i saradnike da ispituju sasušene pokorice i mikrobne „prostirke“ pustinje Katara na prisustvo cijanobakterija, pošto je poznato da one mogu živeti i u ekstremnim uslovima. Prikupljeni uzorci pokazali su prisustvo ne samo mnoštva cijanobakterijskih vrsta, već i značajne koncentracije 2,4-DABA, ali i BMAA. Postavljena je osnovana sumnja na značaj udisanja pustinjske prašine u nastanku ALS, budući da su cijanobakterije, kao i BMAA i 2,4-DABA remećenjem integriteta pustinjskih pokorica bili aerosolizovani (Cox i sar., 2009). Nešto kasnije, Metcalf i saradnici su u sličnoj studiji ispitivali cijanobakterijske pokorice na prisustvo toksina i pokazali prisustvo 2,4-DABA, kao i AEG (Metcalf i sar., 2015). Richer i saradnici su ispitujući različite forme pustinjskih pokorica ustanovili prisustvo cijanobakterija i 2,4-DABA, dok BMAA nije mogla biti detektovana ni u jednom uzorku (Richer i sar., 2015). U istom geografskom području, ispitivanja Chatziefthimiou i saradnika pokazala su prisustvo cijanobakterija i njihovih toksina u zemljištu, i to 2,4-DABA u koncentracijama višestruko većim od onih detektovanih za BMAA i AEG (Chatziefthimiou i sar., 2016).

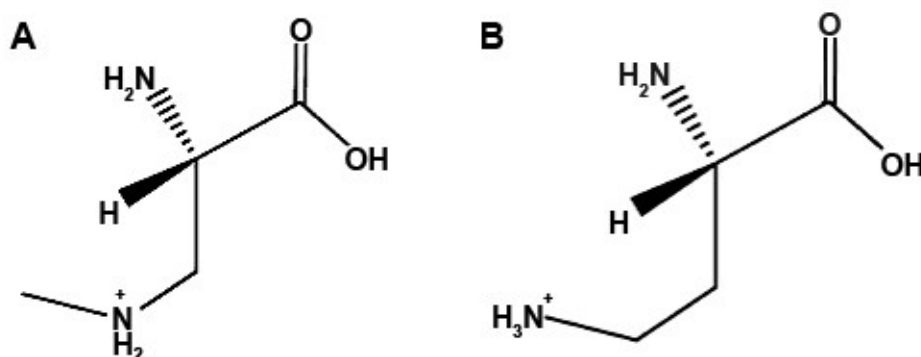
Combes i saradnici (2014) su u istraživanju sprovedenom na uzorcima mozгова dva pacijenta koja su umrla usled komplikacija ALS, uspeali da dokažu prisustvo 2,4-DABA u jednom od uzoraka, dok BMAA nije mogla biti detektovana.

U svetlu ovih podataka mora se obratiti pažnja na prisustvo 2,4 – diaminobuterne kiseline (2,4-DABA) u raznovrsnim ekosistemima, jer cijanobakterije, koje proizvode 2,4-DABA, mogu naseljavati svaki deo naše planete. U prethodnom kratkom pregledu epidemioloških ispitivanja prisustva 2,4-DABA u raznovrsnim ekosistemima čiji neizostavni deo čine i cijanobakterije, pokazano je da ona načešće bila prisutna u većim koncentracijama od BMAA ili je bila prisutna i kada BMAA nije detektovana. Ovo je od velikog značaja jer postoji mogućnost da u literaturi postulirani uticaji cijanobakterija na nastanak neurodegenerativnih oboljenja mogu predstavljati posledicu toksičnog dejstva 2,4-DABA, što do sada nije detaljno ispitivano.

#### 1.4 2,4-diaminobuterna kiselina (DABA)

2,4 – diaminobuterna kiselina ( $\alpha,\gamma$  – diaminobuterna kiselina, engl. *2,4-diaminobutyric acid*,  $C_4H_{10}N_2O_2$ , 2,4-DABA, DABA) je neproteinska aminokiselina koja se u prirodi može naći u slobodnoj i vezanoj formi. Kao strukturni izomer  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA) (Slika 1.), prepoznat je sredinski faktor čiji značajan izvor predstavljaju ubikvitarne cijanobakterije (Cox i sar., 2003). Međutim, rasprostranjenost 2,4 – diaminobuterne kiseline prevazilazi okvire pomenute u prethodnom poglavlju.

2,4-DABA je otkrivena 1948. godine kao jedan od produkata metabolizma bakterija u prirodnom antibiotiku polimiksinu A (Catch i sar., 1948). Kasnije je pokazano postojanje ove aminokiseline i u polipeptidnim antibioticima circulinu, kolistinu, komirinu i polipeptinu (Foster, 1990). Ustanovljeno je da 2,4-DABA učestvuje i u izgradnji mukopeptida ćelijskog zida Gram-pozitivnih bakterija roda *Corynebacterium sp.* (Perkins i sar., 1964). Flowden i Bryant dokazali su prisustvo ove aminokiseline, kao malog dela slobodne, neproteinske, azotne frakcije u korenskom sistemu viših biljaka soja *Polygonatum multiflorum* (Fowden i sar., 1958). Takođe, 2,4-DABA je, u manjim koncentracijama, detektovana u pojedinim mono- i dikotilama (*Compositae*, *Cruciferae*), dok je u većim koncentracijama nađena u semenu grahorica *Lathyrus sylvestris Wagneri* i *Lathyrus latifolius*, koji pripadaju grupi biljaka koje izazivaju neurodegenerativno oboljenje neurolatirizam kod ljudi (Ressler i sar., 1961; VanEtten i sar., 1963). Pan i saradnici dokazali su prisustvo ove aminokiseline u uzorcima semena palmi *Cycas sp.* (Pan i sar., 1997), da bi nedugo zatim Banack i Cox utvrdili prisustvo 2,4-DABA u *Cycas micronesica* Hill u kojoj je prvi put otkrivena BMAA (Vega i sar., 1968; Banack i sar., 2003b). Nakajima i saradnici ustanovili su postojanje malih koncentracija slobodne 2,4-DABA u moždanom tkivu goveda, kao i u tkivu jetre (Nakajima i sar., 1967).



**Slika 1.** Strukturne formule  $\beta$ -N-metilamino-L-alanina (BMAA) (A) i 2,4-diaminobuterne kiseline (2,4-DABA) (B).

Neurotoksičnost 2,4 – diaminobuterne kiseline zapažena je ubrzo po njenom otkriću u nekoliko *in vivo* studija. Riggs i saradnici opisali su pojavu predkonvulzivnog ponašanja, konvulzija i smrti pacova akutno izloženih ovoj aminokiselini, supkutano promenom 7 mmol/L/kg TT (telesne težine) 2,4-DABA. Nasuprot akutnim učincima, hronično doziranje 2 mmol/L/kg TT 2,4-DABA supkutano tokom sedam dana dovelo je do neznatnih manifestacija kod životinja, ali je morfološki supstrat ukazivao na fokalne degenerativne promene – smežuravanje i piknozu Purkinjeovih neurona cerebeluma i neurona cerebralnog korteksa (Riggs i sar., 1954).

Ressler i saradnici su, pokušavajući da identifikuju aktivnu neurotoksičnu supstanciju u uzorcima *Lathyrus latifolius*-a, orogastrično pacovima davali vodeni ekstrakt dobijen iz semena ove biljke. Nakon dva dana primene zapazili su slabost zadnjih i naglo nastali tremor prednjih ekstremiteta, nakon kojih su nastupale konvulzije i smrt životinja. Elektroforetskim i hromatografskim analizama ustanovljeno je da je aktivni neurotoksin semena bio  $\alpha,\gamma$  – diaminobuterna kiselina (2,4-DABA), što je i potvrđeno ponavljanjem neuroloških ispada kod životinja nakon peroralne primene 68 mg sintetske forme ove aminokiseline (Ressler i sar., 1961).

Slične neurološke manifestacije opazili su Vivanco i saradnici nakon višednevnog izlaganja pacova dozama od 50 mg L-2,4-DABA supkutano. Nakon tri do pet dana javljali su se iritabilnost, glasna vokalizacija životinja pri dodiru, klaćenje glave, skakanje, propinjanje na zadnje, uz tremor prednjih ekstremiteta, a potom paraliza zadnjih ekstremiteta, motorna diskoordinacija i smrt. Analize ekstrakata mozгова ovih životinja pokazale su prisustvo 2,4-DABA, u koncentracijama uporedivim sa GABA u normalnim mozgovima, te je pretpostavljeno da 2,4-DABA može proći hematoencefalnu barijeru (Vivanco i sar., 1966).

Prvi koji su pokušali da objasne mehanizam neurotoksičnosti 2,4-DABA, bili su O'Neal i saradnici 1968. godine. Intraperitonealna primena 4,4 mmol/L/kg TT L-2,4-DABA pacovima, dovela je, nakon latentnog perioda od 12-20 sati do hiperiritabilnosti, tremora i konvulzija, a smrt životinja je nastupala nakon tri do osam dana nakon aplikacije. U uzorcima tkiva jetre životinja pokazano je koncentrisanje 2,4-DABA, te je pretpostavljeno da posledično oštećenje hepatocita remeti sintetske funkcije organa i smanjuje iskorišćavanje amonijaka i produkciju ureje. Posumnjano je da su neurološki deficiti manifestacija hroničnog toksičnog dejstva amonijaka i lezije moždanog tkiva, a njegovom analizom utvrđen je višestruki porast koncentracije glutamina, ureje i amonijaka, koji je diskretno bio povišen i u krvi. Takođe, u uzorcima tkiva mozga bila je prisutna i DABA, što je potvrdilo nalaze prethodne studije. Međutim, morfološki supstrat nije odgovarao postuliranim mehanizmima toksičnosti 2,4-DABA, budući da iako je histopatološka analiza pokazala gubitak neurona hipokampusu i demijelinizaciju, nisu postojale uočljive lezije tkiva jetre i bubrega (O'Neal i sar., 1968).

Ugledajući se na prethodna istraživanja, Chen i saradnici pacovima su intraperitonealno primenjivali iste doze L-, odnosno D-2,4-DABA, pri čemu su se već poznati znaci neurotoksičnosti javljali 12-20 sati jedino nakon primene L- izoforme. Pretpostavku da je hematoencefalna barijera propustljiva za L-2,4-DABA, potvrdila je visoka koncentracija ove aminokiseline u moždanom tkivu, nakon intraperitonealne aplikacije. Sa druge strane, svoja istraživanja proširili su i intracerebroventrikularnom primenom L- ili D-2,4-DABA (45  $\mu\text{mol/L}$  i 39  $\mu\text{mol/L}$ , respektivno), uočavajući znake akutne neurotoksičnosti, pri čemu D-2,4-DABA, za razliku od L- izoforme, nije omogućavala oporavak životinja. Zaključeno je da je neurotoksičnost 2,4-DABA bila moguća samo ukoliko je koncentracija ove aminokiseline u mozgu iznosila najmanje 1-2  $\mu\text{mol/g}$  tkiva. Jedan od mehanizama toksičnosti 2,4-DABA, koji su Chen i saradnici predložili jeste dekarboksilacija ove aminokiseline u diaminopropan, za koji su pokazali da intracisternalnom primenom dovodi do karakterističnih akutnih znakova neurotoksičnosti (Chen i sar., 1972). Iste manifestacije neurotoksičnosti opazili su Beart i Bilal akutnom intraperitonealnom aplikacijom 4 mmol/L/kg TT L-2,4-DABA ili hroničnim izlaganjem pacova 2,5 mmol/L/kg TT istim putem, tokom tri dana. Pored opažene hiperiritabilnosti, tremora, rigidnosti tela i erekcije repa, pokazan je porast koncentracije GABA u hipokampusu nakon akutnog ili u predelu strijatuma i korteksa nakon hroničnog izlaganja životinje 2,4-DABA, pri čemu je uočen pad aktivnosti GABA transaminaza (Beart i sar., 1977). Porast koncentracije GABA u moždanom tkivu nakon intraperitonealne primene L-2,4-DABA pokazan je i u drugim *in vivo* studijama (Vivanco i sar., 1966; Chen i sar., 1972; Sutton i sar., 1974).

Poremećaj metabolizma GABA, odnosno njene recirkulacije u neuronskim sinapsama istaklo je nekoliko *in vitro* studija, sa ciljem objašnjenja mehanizama neurotoksičnih efekata 2,4-DABA. Simon i Martin (1973) su pretpostavili dva modaliteta inhibicije preuzimanja GABA u sinaptosome kao mehanizama neurotoksičnosti 2,4-DABA – inicijalno pojavom kompetitivne inhibicije 2,4-DABA i GABA za membranske GABA transportere i kasnije, usled nakupljanja 2,4-DABA u sinaptozomu i verovatne izmene unutarćelijskog domena transportera, razvojem nekompetitivne inhibicije preuzimanja GABA. Pošto je ovaj učinak bio zavisn od ekstraćelijske koncentracije natrijumovih jona, a povećanje koncentracije GABA ekstrasinaptosomalno smanjivalo preuzimanje 2,4-DABA, istaknuto je da se ulazak L-2,4-DABA u sinaptosome i ćelije najverovatnije odvija i preko posebnog transportnog sistema zavisnog od natrijuma. Produbljujući ova ispitivanja, Dick i Kelly su zapazili nakupljanje radioaktivno obeleženih molekula DL-2,4-DABA u predelu nervnih završetaka u isečcima korteksa pacova, dok glija ćelije nisu preuzimale ove molekule. Autori su potvrdili dotadašnje pretpostavke da je preuzimanje 2,4-DABA zavisno od ekstraćelijske koncentracije natrijumovih jona (Dick i sar., 1975). Dodatna *in vitro* ispitivanja na moždanim isečcima pacova potvrdila su inhibitorni učinak L-2,4-DABA na natrijum-zavisno preuzimanje GABA, pokazavši nešto izraženiju osetljivost moždanog korteksa i isečaka cerebeluma u odnosu na

isečke kičmene moždine (Iversen i sar., 1971; Harris i sar., 1973; Johnston i sar., 1977; Weitsch-Dick i sar., 1978).

Kennedy i Neal (1977; 1978) bliže su ispitali sisteme za preuzimanje radioaktivno obeleženih molekula L-2,4-DABA u kortikalne moždane isečke pacova. Konkomitantnim aplikovanjem rastućih i ekvimolarnih koncentracija radioaktivno obeleženih molekula 2,4-DABA i GABA, uočili su da se preuzimanje 2,4-DABA progresivno povećavalo sa porastom koncentracije radionuklida. Slično Simonu i Martinu, zaključili su da se manje koncentracije 2,4-DABA transportuju u kortikalne moždane isečke putem visokoafinitetnog transportera za 2,4-DABA i GABA, ali u većim koncentracijama 2,4-DABA biva preuzeta posebnim transporterom koji je preferira.

Roskoski (1981) je ispitujući uticaje pojedinih jona i njihovih koncentracionih gradijenata, potvrdio dotadašnje tvrdnje da je transport 2,4-DABA i GABA u sinaptosome zavisian od jona natrijuma, budući da je njihovom supstitucijom jonima litijuma ili holinom, izazvao smanjenje preuzimanja od oko 98%. Daljim ispitivanjima uvideo je da transport 2,4-DABA, za razliku od transporta GABA, nije zavisian od koncentracije jona hlora ekstracelularno te je pretpostavio da se mehanizmi transporta GABA i 2,4-DABA razlikuju, odnosno da se u transportu ovih supstancija kroz plazma membranu aktiviraju različiti transportni sistemi. Transport 2,4-DABA i GABA je elektrogen po prirodi, a ovu tvrdnju Roskoski je potkrepio eksperimentima sa valinomicinom koji je, pospešujući kretanje kalijumovih jona niz koncentracioni gradijent, povećavao nivo transporta pomenutih supstancija. Sa druge strane, primenom jonofora – monensina ili nigericina, koji neutrališu koncentracioni gradijent za jone natrijuma na ćelijskoj membrani, izazivan je skoro potpuni prekid transporta 2,4-DABA. Ispitujući ulogu unutarćelijskih katjona i njihov uticaj na transport 2,4-DABA i GABA, Roskoski je ustanovio da unutarćelijski prisutni joni litijuma ili TRIS<sup>15</sup> onemogućavaju preuzimanje 2,4-DABA kroz membranu, kao i da je unutarćelijsko prisustvo jona kalijuma bilo neophodano za transport 2,4-DABA, ali ne i GABA. Ovo je osnažilo tvrdnju Roskoskog da se mehanizmi transporta 2,4-DABA i GABA prilično razlikuju. Dalja ispitivanja potvrdila su da, iako je 2,4-DABA kompetitivni inhibitor preuzimanja GABA kroz membranu, GABA je predstavljala slab inhibitor transporta 2,4-DABA i tim nalazima potkrepio novija istraživanja koja su predlagala postojanje drugog transportera za 2,4-DABA, a dodatnim eksperimentima je utvrdio da je aminokiselina alanin umereno (33%) inhibirala transport 2,4-DABA kroz membranu (Roskoski, 1981). 2,4-DABA je pokazala i dozno-zavisnu inhibiciju sinaptosomalnog preuzimanja glicina, glutamata i aspartata (Strain i sar., 1984).

Ispitujući transport radioaktivno obeleženih molekula 2,4-DABA i GABA kroz membrane sinaptosoma Erécinska i saradnici pokazali su da je preuzimanje 2,4-DABA od strane transportera

---

<sup>15</sup> tris(hidroksimetil)aminometan-hlorid (engl. *tris(hydroxymethyl)aminomethane-chloride*, TRIS)

bilo zavisno od pH u opsegu 6,5 – 7,8, odnosno da se za transporter ova aminokiselina mogla vezati u katjonskom obliku (DABA<sup>+</sup>). Takođe, pokazano je da je maksimalno koncentrisanje 2,4-DABA zavisilo od membranskog potencijala sinaptozoma, tj. odnosa koncentracija jona kalijuma intra- i ekstrasinaptozomalno, kao i od transmembranskog koncentracionog gradijenta za natrijumove jone (Erecinska i sar., 1986). Erecinska i saradnici pretpostavili su da je transport 2,4-DABA bio usko energetski spregnut sa koncentracionim gradijentom za jone natrijuma i transmembranskim potencijalom. Zaključeno je da se transport 2,4-DABA odvija verovatno preko transportera sa neto naelektrisanjem od +2, pri čemu jedno naelektrisanje potiče od jona natrijuma koji se kotransportuje sa ovom aminokiselinom u sinaptozom, a drugo naelektrisanje predstavlja sama 2,4-DABA koja je prilikom transporta u monovalentnom katjonskom obliku.

Pored neurotoksičnog potencijala na kulture neurona pacova (Weiss i sar., 1989a), veliki broj *in vivo* i *in vitro* studija pokazao je da 2,4-DABA dovodi do ireverzibilnog oštećenja tumorskih ćelija. Antitumorski efekat 2,4-DABA, prvi put su pokazali Christensen i saradnici na Erlih tumorskim ćelijama ascitesa (engl. *Ehrlich ascites carcinoma, Ehrlich cell*) koje su ispoljavale nesaturabilnu kinetiku preuzimanja ove aminokiseline, praćenu bubrenjem ćelija i značajnim izbacivanjem jona kalijuma iz citosola (Christensen i sar., 1952b; Christensen i sar., 1952a). Ova grupa autora je ubrzo potom pretpostavila da izraženo unutarćelijsko koncentrisanje 2,4-DABA omogućuje elektrogeni, natrijum-zavisni transportni sistem A (TSA) (Christensen i sar., 1966). Ovaj transporter, koji omogućava ulazak aminokiseline malog bočnog lanca u ćelije zajedno sa jonima natrijuma je ubikvitaran i postoji u tri izoforme SNAT<sup>16</sup>1, SNAT2 i SNAT4, pri čemu su SNAT1 i SNAT2 obično eksprimirani na membrani neurona (Christensen i sar., 1973; Palacin i sar., 1998).

Pored modela Erlihovih tumorskih ćelija, destruktivni efekat 2,4-DABA demonstriran je kako *in vitro* na ćelijskim kulturama fibrosarkoma miševa pri koncentracijama 5 – 10 mmol/L, tako i *in vivo* intraperitonealnom aplikacijom miševima (50 – 90 μmol/L) kojima su ove tumorske ćelije transplantirane (Ronquist i sar., 1980). Slični citolitički efekti 2,4-DABA pokazani su i na ćelijskim kulturama hepatoma *in vitro* i tumorskim masama jetre kod transplantiranih pacova *in vivo* (Blind i sar., 2000; Blind i sar., 2003).

Kulture ćelija humanog glioma (SKMG-1), eksperimentalno razvijena kultura ćelija glioma pacova, kao i kultura humanih fibroblasta (DHF) pokazale su značajna oštećenja po izlaganju 10 – 20 mmol/L 2,4-DABA. Pri ovim koncentracijama ni humane glija ćelije, ni glija ćelije pacova nisu podlegle citolitičkim efektima 2,4-DABA (Ronquist i sar., 1984; Panasci i sar., 1988). Main i saradnici (2018) pokazali su dozno-zavisno destruktivno dejstvo 2,4-DABA na kulturi ćelija humanog neuroblastoma (SH-SY5Y), uz još izraženiji efekat pri konkomitantnoj primeni BMAA sa

---

<sup>16</sup> Natrijum-zavisni transporter za neutralne aminokiseline (engl. *Sodium-dependent neutral amino acid transporter, SNAT*)

2,4-DABA. Svojim eksperimentima su potvrdili ne samo da su mehanizmi dejstva 2,4-DABA i BMAA različiti, već i da 2,4-DABA ima direktno neurotoksično dejstvo.

Ispitivanja antitumorskog efekta 2,4-DABA *in vivo* na pacijentima obolelih od glioblastoma izveli su Ronquist i saradnici i Bergenheim i saradnici, primenom ove aminokiseline direktno u tumorsko tkivo metodom mikrodijalize. Rezultujuća nekroza tumora, potvrđena snimcima kompjuterizovane tomografije, bila je praćena i biohemijskim promenama dijalizata koji dobijen iz tumorskog ognjišta. Pojačano preuzimanje 2,4-DABA od strane tumorskih ćelija potvrđeno je padom njene koncentracije u dijalizatu, kao i porastom koncentracije alanina i glicina u tečnosti dijalizata. Ovi nalazi indirektno su ukazivali da je koncentrisanje 2,4-DABA u tumorske ćelije i posledična citoliza bila omogućena aktivnošću transportnog sistema A (TSA), pošto su alanin i glicin supstrati za pomenuti transportni sistem. Takođe, u tumorskom ognjištu tokom vremena primene 2,4-DABA dolazilo je do značajnog povećanja koncentracije glutamata i aspartata (Ronquist i sar., 1992; Bergenheim i sar., 2006).

Sa druge strane, u većini navedenih istraživanja pokazano je da je alanin (Ronquist i sar., 1980) ili 2-metilamino-izobutirat (MeAIB) (Ronquist i sar., 1984; Panasci i sar., 1988), konkomitantno primenjen sa 2,4-DABA, imao protektivnu ulogu, odnosno sprečavao nastanak citolize. Ovim je indirektno pokazana uloga transportnog sistema A (TSA) u koncentrisanju 2,4-DABA unutar ćelije (nasuprot koncentracionog gradijenta), pošto je poznato da su i alanin i MeAIB supstrati za ovaj transporter te je zaključeno da se ponašaju kao kompetitivni antagonisti.

Prema našima sazanjima, prve elektrofiziološke studije sa ciljem ispitivanja efekata BMAA u kojima su korišćeni i strukturni analozi 2,4-DABA i DAPA<sup>17</sup>, izveli su Weiss i saradnici (1989a) na kulturi mišijih fetalnih kortikalnih neurona i glijalnih ćelija. Pokazali su da izlaganje kulture neurona 1,5 mmol/L 2,4-DABA nije dovodilo do izražene depolarizacije membranskog potencijala neurona, ali konkomitantnom primenom 2,4-DABA sa 20 mmol/L natrijum-bikarbonata i stvaranjem karbamata 2,4-DABA, depolarizacija je postajala značajno izraženija. Ekscitatorno dejstvo DABA-karbamata bilo je suprimirano aplikacijom kinureninske kiseline, antagoniste jonotropnih glutamatnih receptora, što je indirektno ukazivalo da depolarizacija ćelija nastaje stimulacijom ovih receptora. Weiss i saradnici su pretpostavili da formiranje karbamata na bočnoj amino-grupi 2,4-DABA daje molekul koja strukturno odgovara glutamatu.

Izlaganje kultura mišijih fetalnih kortikalnih neurona i glijalnih ćelija 3 mmol/L 2,4-DABA u toku 30 minuta izazivalo je diskretno akutno bubrenje neurona, a kasnije i neuronalnu degeneraciju, dok je dodavanje 5 – 20 mmol/L bikarbonata u medijum, dovodilo do akutnog bubrenja neurona i njihove degeneracije kasnije, praćene oslobađanjem laktatne dehidrogenaze (LDH) iz ćelija nakon

---

<sup>17</sup> 2,3 – diaminopropionat (engl. 2,3 – *diaminopropionic acid*, DAPA)

izlaganja 2,4-DABA. Neurotoksični efekti 2,4-DABA-karbamata bili su značajno smanjeni aplikacijom MK-801, nekompetitivnog antagoniste NMDA receptora, što je ukazalo da 2,4-DABA deluje ekscitotoksično aktivacijom glutamatnih receptora. Međutim, opažena depolarizacija membrane, ma koliko ona bila mala, pri izlaganju neurona 2,4-DABA bez prisustva bikarbonata, kao i samostalno izazivanje neurotoksičnih efekata na neuronima, doveli su do razmišljanja da endogeni bikarbonat u organizmu može doprineti pojavi efekata i da ova aminokiselina može aktivirati glutamatne receptore samostalno. Pretpostavljeno je i da efekti 2,4-DABA mogu biti posredovani nekim drugim, dodatnim mehanizmom, a ne aktivacijom glutamatnih receptora. Nakon serije eksperimenata Weiss i saradnici utvrdili su da 2,4-DABA nije dovela do oštećenja glijalnih ćelija u kulturama (Weiss i sar., 1989a).

Imajući u vidu ubikvitarno prisustvo 2,4 – diaminobuterne kiseline u vodenim i kopnenim ekosistemima, moguće rizike izlaganja humane populacije ovoj sredinskoj ekscitatornoj aminokiselini, kao i pokazanog neurotoksičnog potencijala, nameće se potreba za detaljnijim ispitivanjem dejstava 2,4-DABA i mehanizama njihovog nastanka.

U svetlu nedostatka elektrofizioloških ispitivanja učinka ovog cijanotoksina, u ovim istraživanjima izučavani su efekti 2,4 – diaminobuterne kiseline na membranski potencijal, kao i mogući mehanizmi njihovog nastanka na Retzius-ovim neuronima pijavice *Haemopsis sanguisuga*.



## 2. CILJEVI

Na osnovu preliminarnih eksperimenata i literaturnih podataka postavljeni su sledeći *ciljevi*:

- Ispitati dejstvo 2,4-diaminobuterne kiseline na membranski potencijal Retzius-ovih neurona.
- Ispitati postojanje koncentracione zavisnosti dejstva 2,4-diaminobuterne kiseline na Retzius-ovim neuronima.
- Ispitati postojanje funkcionalnog oporavka Retzius-ovih neurona nakon aplikacije 2,4-diaminobuterne kiseline.
- Ispitati postojanje koncentracione zavisnosti funkcionalnog oporavka Retzius-ovih neurona izlaganih 2,4-diaminobuternoj kiselini.
- Uporediti učinke L-2,4-DABA i DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona.
- Ispitati uticaj uklanjanja jona natrijuma iz ekstraćelijskog medijuma na dejstvo 2,4-diaminobuterne kiseline.
- Ispitati dejstvo 2,4-diaminobuterne kiseline na ulazni otpor membrane Retzius-ovih neurona.
- Ispitati uticaj blokade jonotropnih glutamatnih receptora na dejstvo 2,4-diaminobuterne kiseline.
- Ispitati uticaj blokade transportnog sistema za neutralne aminokiseline na dejstvo 2,4-diaminobuterne kiseline.



### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1 Preparat

##### 3.1.1 Nervni sistem pijavice *Haemopsis sanguisuga*

Pijavica se kao eksperimentalni preparat koristi u neuronaukama još od kraja XIX veka (Kristan i sar., 2005). Konjska pijavica (*Haemopsis sanguisuga*) pripada tipu *Annelida* (člankoviti crvi), klasi *Clitellata*, redu *Arhynchobdellida*, kom pripada i medicinska pijavica (*Hirudo medicinalis*) i porodici *Haemopidae*. Telo pijavice se sastoji od 32 segmenta i prostomijuma (prednjeg nesegmentiranog regiona), a sačinjavaju ga cevasto uobličeni epidermalni i mišićni slojevi, koji okružuju unutrašnje organe: digestivni tubus, nefridije i urinarne sakuse, reproduktivne organe, zatvoreni cirkulatorni sistem i nervni sistem. Prednost korišćenja pijavica kao eksperimentalnih životinja je jednostavnost telesne građe koja se posebno ogleda u organizaciji nervnog sistema.

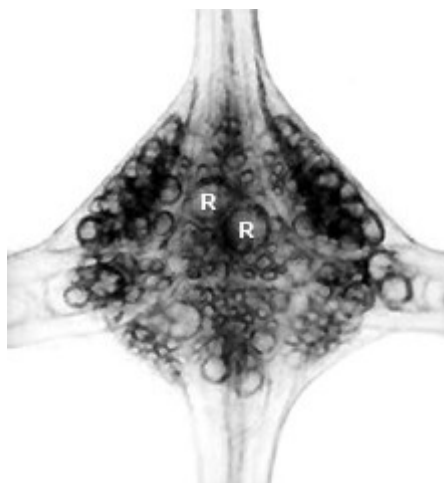
Nervni sistem pijavice sastoji se od ventralne nervne vrpce, koja celom dužinom leži unutar hemocelične lakune postavljene endotelom. Svaki segment nervne vrpce čini jedan ganglion, koji komunicira sa susednim ganglionima pomoću međuganglionskih spojnica koje sadrže par velikih lateralnih vlakana i manje medijalno vlakno, koje se naziva Faivre-ov nerv. Od ukupno 34 segmentnih gangliona, prvih šest gangliona (rostralne neuromere, R1-R6) tokom embiogeneze spajaju se u subezofagealni i supraezofagealni ganglion, koji čine prednji (glaveni) mozak. Poslednjih sedam segmentnih gangliona nervne vrpce (kaudalne neuromere, C1-C7) sjedinjuju se tokom neurogeneze u zadnji (repni) mozak. Između prednjeg i zadnjeg mozga, duž nervne vrpce se pruža 21 slobodnih segmentnih gangliona (M1-M21) (Kristan i sar., 2005). Iz svakog segmentnog gangliona bočno izlazi par nerava svojim prednjim i zadnjim korenovima.

Svaki ganglion, osim gangliona M5 i M6, poseduje oko 200 pari neurona (Sawyer, 1986). Tela neurona unutar gangliona raspoređena su površno i grupisana u deset glijalnih paketa – šest na ventralnoj površini i četiri na dorzalnoj površini gangliona (Kristan i sar., 2005). Ispod endotela koji obavlja svaki ganglion nalazi se vezivno tkivo koje omogućava razlikovanje ventralno položenih skupina neurona: neparna medijalna prednja i medijalna zadnja skupina, i parne anterolateralne i posterolateralne skupine. Ovo vezivno tkivo organizovano je u vidu nervne lamele koja oblaže ganglion spolja i neurileme koja oblaže pakete neurona unutar gangliona. Neurilema učestvuje u izgradnji zidova neuropila - strukture koja sadrži aksone i dendrite svih neurona, kao i njihove sinaptičke veze.

Jedna od najvećih identifikovanih nervnih ćelija unutar segmentnih gangliona je Retzius-ov neuron.

### 3.1.2 Retzius-ov neuron

Par velikih (50 – 80  $\mu\text{m}$ ), centralno postavljenih nervnih ćelija unutar segmentnih gangliona pijavice (nem. *Kolossale Ganglienzellen*), otkrio je i opisao 1891. godine Gustav Retzius. Ovi unipolarni neuroni, koji nose njegovo ime, nalaze se na ventralnoj površini gangliona, postavljeni unutar prednjeg medijalnog glijalnog paketa, jedan pored i diskretno ispred drugog (Lent, 1977) (Slika 2.). Akson koji polazi od tela neurona spušta se dorzalno i posteriorno kroz neuropil, potom skreće lateralno i deli se u dve grane koje izlaze kroz istostrane nervne korenove gangliona i završava u zidovima odgovarajućeg segmenta tela pijavice. Od glavnih grana aksona odvajaju se i po dve manje grane koje se projektuju u međuganglionske spojnice ka susednim segmentnim ganglionima te ulaze u istostrane korenove tih gangliona (Carretta, 1988).



**Slika 2.** Mikrofotografija slobodnog segmentnog gangliona pijavice *Haemopsis sanguisuga*. R – Retzius-ov neuron.

Pored vizuelnih karakteristika ćelija – veličine i pozicije unutar gangliona, elektrofiziološka svojstva Retzius-ovih neurona omogućavaju njihovo lakše prepoznavanje. Budući da su po položaju unutar gangliona lako dostupni, dobro tolerišu unutarćelijsko plasiranje mikroelektroda, izuzetno su izdržljivi i električno stabilni tokom ispitivanja, Retzius-ovi neuroni smatraju se izuzetno dobrim modelom za elektrofiziološka ispitivanja.

Mirovni membranski potencijal Retzius-ovih neurona varira u rasponu od -30 do -60 mV, što zavisi od veličine i aktivnosti ćelija, osmolarnosti ćelija i dr. Amplituda akcionog potencijala registrovanog unutar ćelije je između 20 i 50 mV te ne dolazi do prebačaja (Lent, 1977), i traje 6 – 8 ms. Ulazni otpor membrane (UOM) Retzius-ovog neurona u fiziološkim uslovima je 5 – 18  $\text{M}\Omega$ , a ukupna kapacitivnost membrane 2 – 2,5  $\cdot 10^{-9}$  F (Sawyer, 1986).

Retzius-ove neurone odlikuje spontana električna aktivnost učestalosti od oko jednog akcionog potencijala u sekundi (Sawyer, 1986). Akcioni potencijali ovih neurona imaju brzu uzlaznu i brzu silaznu fazu. Uzlazna faza akcionog potencijala (faza depolarizacije) zavisna je od jona natrijuma ( $\text{Na}^+$ ) i potpuno je blokira zamena natrijumovih jona u ekstraćelijskom medijumu jonima litijuma. Smatra se da je uzlazna faza akcionog posredovana ulaznim strujama dva voltažno-zavisna kanala: brzim, tetrodotoksin-senzitivnim kanalom za natrijum i sporim, tetrodotoksin-rezistentnim kanalom za natrijum i kalcijum. Silazna faza akcionog potencijala (faza repolarizacije) zavisna je od jona kalijuma ( $\text{K}^+$ ), a primena tetraetilamonijuma (TEA), blokatora voltažno-zavisnih kanala za kalijum produžava trajanje akcionih potencijala i do 500 ms. Silaznu fazu akcionog potencijala pokreću izlazne struje učešćem voltažno-zavisnih i kalcijum-zavisnih kanala za kalijum (Carretta, 1988). Joni kalcijuma ( $\text{Ca}^{2+}$ ) utiču na vrednosti mirovnog membranskog potencijala i amplitude akcionih potencijala, no nisu preovlađujući faktor za nastanak akcionog potencijala (Lent, 1977).

Unutar slobodnih segmentnih gangliona, dva Retzius-ova neurona su elektrotonički povezana, osim na nivou petog i šestog gangliona (M5 i M6) (Beleslin, 1977), a pretpostavlja se da se ovaj spoj ostvaruje na nivou specifičnih dendrita u neuropilu gangliona. Elektrotonički spoj dva neurona omogućava nesmetan prolazak jona u oba smera, odnosno predstavlja bidirekcionu električnu sinapsu. Bidirekciona električna spojnica obezbeđuje približno jednake vrednosti mirovnog membranskog potencijala i održava gotovo sinhronu električnu aktivnost susednih Retzius-ovih neurona, te se oni mogu posmatrati kao funkcionalna celina. Zapaženo je da posteriorni Retzius-ov neuron ima nešto učestaliju spontanu električnu aktivnost, te se može posmatrati kao predvodnik aktivnosti ove celine (Carretta, 1988).

Pored električnih, Retzius-ov neuron poseduje niz hemijskih sinapsi. Poznato je da ovi neuroni reaguju na acetilholin, biogene amine (dopamin, serotonin) i neke aminokiseline (GABA, glutamat, aspartat i njihovi hemijski analozi) (Kerkut i sar., 1967; James i sar., 1980a; Sawyer, 1986).

Funkcija Retzius-ovih neurona nije sasvim poznata. Postoje pretpostavke da je sekrecija mukusa na kutikuli segmenta tela pijavice pod kontrolom Retzius-ovih nervnih ćelija odgovarajućeg segmentnog gangliona (Lent, 1973). Takođe, smatra se da imaju modulatornu ulogu u motorici, budući da dovode do smanjenja tonusa mišića u zidu odgovarajućeg segmenta i omogućavaju plivanje i hranjenje životinje (Carretta, 1988).

## 3.2 Metoda

### 3.2.1 Preparacija izolovanih gangliona

Identifikovane pijavice *Haemopsis sanguisuga* nabavljene su od ovlašćenog dobavljača i čuvane u dehlorisanoj vodovodskoj vodi, koja je redovno menjana, u frižideru na temperaturi od +4°C.

Anestetisanje je vršeno u 10%-om rastvoru etanola u Ringerovom rastvoru za pijavice. Dejstvo anestezije je bilo reverzibilno, pošto je primećen oporavak životinje po njenom vađenju iz rastvora za anesteziju. Anestetisanje i preparacija tela pijavice izvođeni su u Petri šolji za čije su dno voskom fiksirani komadi plute.

Rostralni deo tela pijavice je pomoću čioda rastegnut i pričvršćen za komade plute, ventralnom stranom nagore. Prva faza preparacije vršena je u rastvoru za anesteziju, pod uveličanjem 16x stereo-mikroskopa za preparaciju (MBS-9, USSR). Medijalnom incizijom i postepenom disekcijom kutikule i mišićnog sloja ventralne strane tela ukazuje se nervna vrpca u krvnom sinusu. Rostralni deo nervne vrpce u dužini 3 – 4 slobodna segmentna gangliona isecan je zajedno sa krvnim sinusom i odmah prebacivan u eksperimentalnu komoru, ispunjenu Ringerovim rastvorom za pijavice, u kojoj je vršena dalja preparacija.

Sledeća faza preparacije obavljena je u eksperimentalnoj komori, zapremine 2,5 mL, pod stereo-mikroskopom (MBS-9, USSR), pod uveličanjem 32x, sa osvetljenjem odozdo. Segment nervne vrpce, rastegnut i pričvršen držačima od nerđajućeg čelika, oslobođan je krvnog sinusa pomoću makazica za iridotomiju. Potom je ovaj izloveni segment rastegnut ventralnom stranom nagore na oko 125% svoje stacionarne dužine, kako bi se sprečile kontrakcije preparata tokom izvođenja eksperimenta. Dalju preparaciju nije bilo potrebno izvoditi pošto je pokazano da komponente medijuma u koji je ganglion potopljen mogu lako doći do ćelija, bez dodatne disekcije (Nicholls i sar., 1964).

Po završenoj preparaciji, eksperimentalna komora sa preparatom prebacivana je u uzemljen Faradejev kavez, postavljen na način kojim se sprečava uticaj vibracija. Identifikacija i penetracija Retzius-ovih neurona vršena je pod uveličanjem 42x stereo-mikroskopa (MBS-9, USSR), postavljenog unutar Faradejevog kaveza.

Pre izvođenja eksperimenta, sadržaj komore menjan je svežim Ringerovim rastvorom za pijavice. Preparacija i eksperimenti vršeni su na sobnoj temperaturi (22 – 25°C) .

### 3.2.2 *Elektrofiziološke procedure, električni uređaji za registrovanje i draženje*

Retzius-ovi neuroni identifikovani su na osnovu morfoloških svojstava (veličina, oblik i lokalizacija ćelija) i elektrofizioloških kriterijuma (vrednost mirovnog membranskog potencijala, amplituda i oblik akcionih potencijala, prisustvo i učestalost spontane električne aktivnosti ćelija).

Za registrovanje membranskog potencijala i električne aktivnosti membrane korišćena je standardna elektrofiziološka tehnika unutarćelijskog registrovanja pomoću jedno-barelne mikroelevtrode od borosilikatnog stakla.

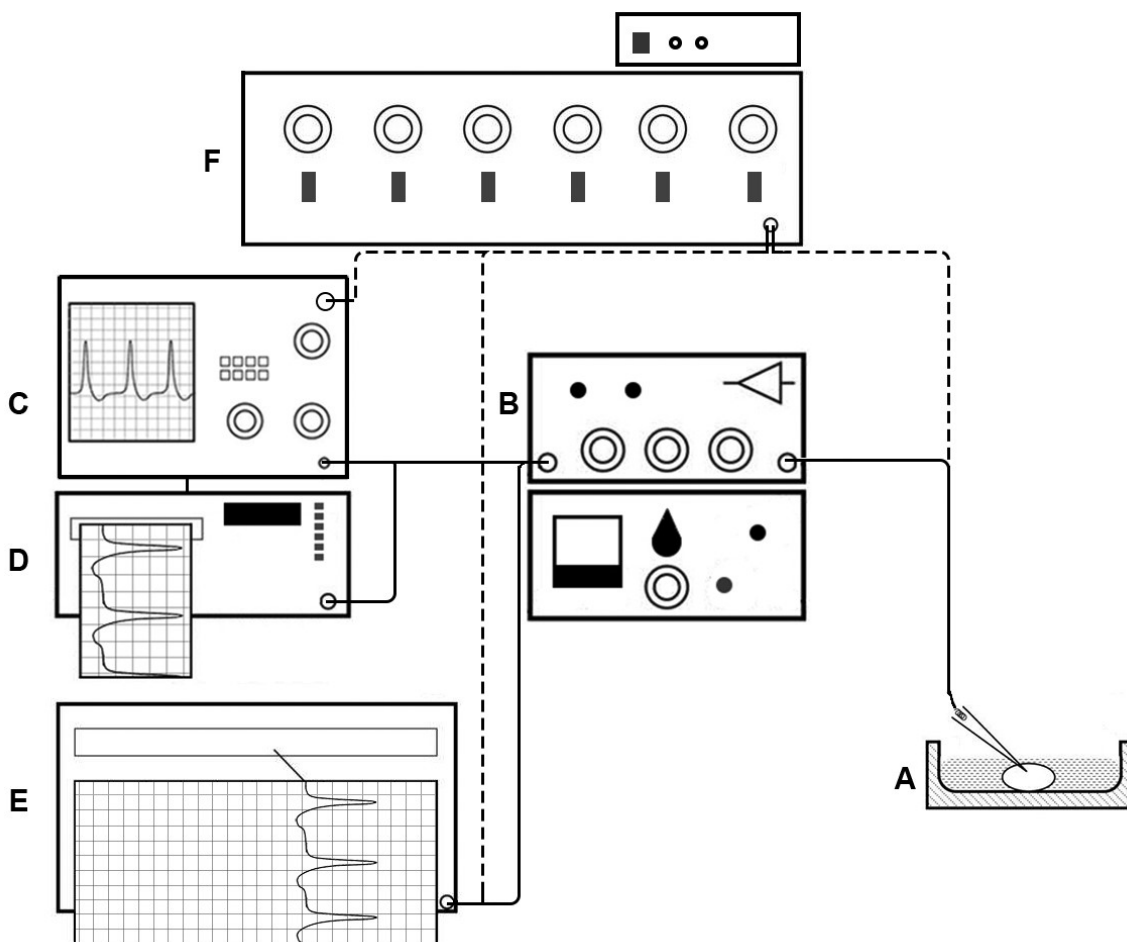
Mikroelevtrode se prave od mikropipeta dobijenih izvlačenjem staklenih kapilarnih cevčica sa inkorporisanim mikrofilamentom, spoljašnjeg dijametra 1,5 mm i unutrašnjeg dijametra 0,84 mm (World Precision Instruments Inc., Sarasota, SAD). Izvlačenje mikropipeta vršeno je na vertikalnom izvlačaču sa podesivim grejanjem i silom izvlačenja (Narishige, PE-6, Tokio, Japan), što je omogućavalo dobijanje mikroelevtrode potrebnih karakteristika. Ispunjavanjem izvučenih mikropipeta tromolarnim rastvorom kalijum hlorida (3 mol/L KCl) pravljene su mikroelevtrode, a potom je pristupano mikroskopskoj kontroli punjenja, kvaliteta i osobina vrha istih. Mikroelevtrode koja je zadovoljavajućih karakteristika nameštena je u nosač, postavljen na mikromanipulator (Leitz, Wetzlar, Nemačka), pomoću kog se finim pokretima mogla precizno pomertati u sve tri ravni. Vrh mikroelevtrode je potpoljen u Ringerov rastvor za pijavice unutar eksperimentalne komore i ostavljen 20 – 30 minuta radi ekvilibracije. Pre penetracije Retzius-ovog neurona meren je otpor mikroelevtrode, a pre i posle penetracije ćelija određivan je i potencijal vrha mikroelevtrode. Za eksperimente su korišćene mikroelevtrode prečnika vrha manjeg od 1  $\mu\text{m}$ , otpora 20 – 25  $\text{M}\Omega$ , sa potencijalom vrha do 5 mV. Mogući uticaj zamene rastvora na promenu vrednosti potencijala vrha mikroelevtrode isključivan je kontrolnom zamenom rastvora sa postavljenom elektrodom na kraju svakog eksperimenta.

Referentna makroelevtrode, napravljena od srebro – srebro hlorid pločice (Ag – AgCl) nalazila se u zasebnoj komori ispunjenoj Ringerovim rastvorom za pijavice. Vezu između eksperimentalne komore sa preparatom i komore sa referentnom makroelevtrodom ostvarivao je stakleni most ispunjen 3% agarom rastvorenim u 3 mol/L KCl. U eksperimentima za merenje ulaznog otpora membrane Retzius-ovih neurona kabl za referentnu elektrodu bio je dodatno izolovan zbog velike osetljivosti aparature.

Prikaz električnih uređaja korišćenih za registraciju i draženje u eksperimentima predstavljen je na Slici 3.

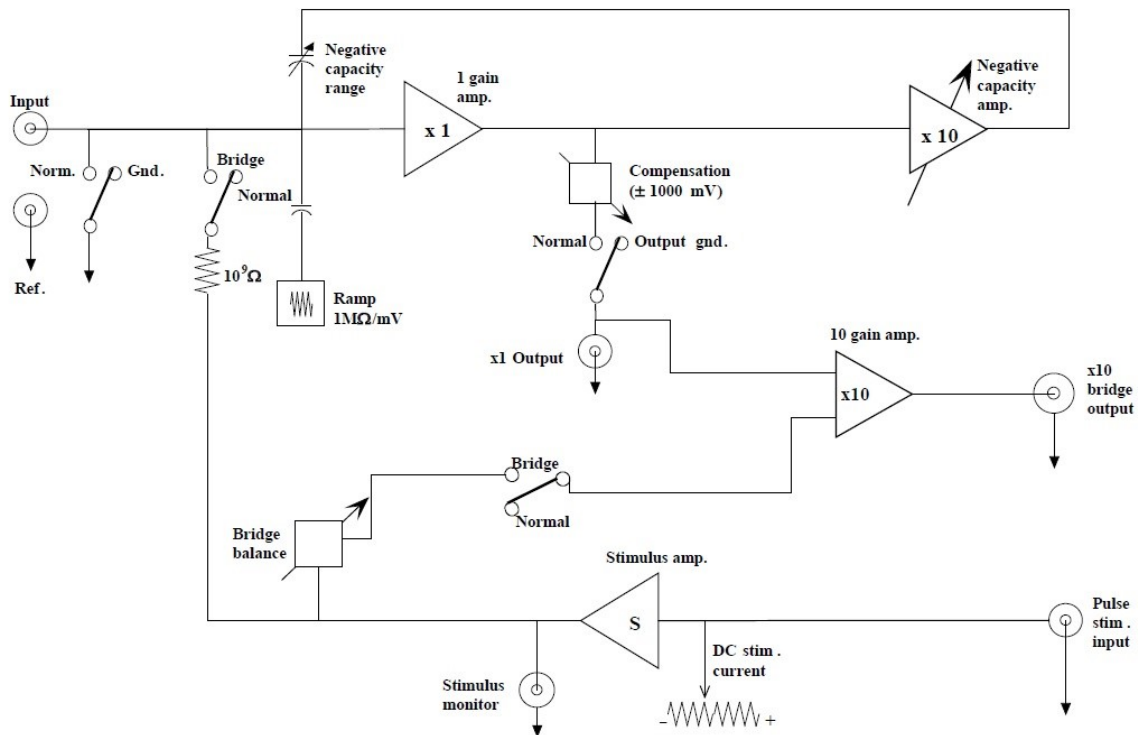
Nakon penetracije Retzius-ovog neurona mikroelektrodom dobijeni električni signal ćelije pojačan je pomoću pojačivača sa negativnim kapacitetom i velikim ulaznim otporom (Winston Electronics CO., Model 1090, San Francisco, SAD;  $R=10^9 \Omega$ ), koji je povezan pomoću srebro – srebro hlorid (Ag – AgCl) žice sa mikroelektrodom. Električno kolo pojačivača prikazano je na Shemi 1.

Prilikom eksperimentalnog određivanja ulaznog otpora membrane (UOM) Retzius-ovog neurona, draženje i registracija odgovora ćelije vršeni su preko iste mikroelektrode. Ovo je omogućeno korišćenjem zasebne jedinice sa Vitstonovim (Wheatstone) mostom (Winston Electronics Co., Model BR-1, San Francisco, SAD). Električno kolo Vitstonovog mosta sadržanog u jedinici BR-1 prikazano je na Shemi 2.

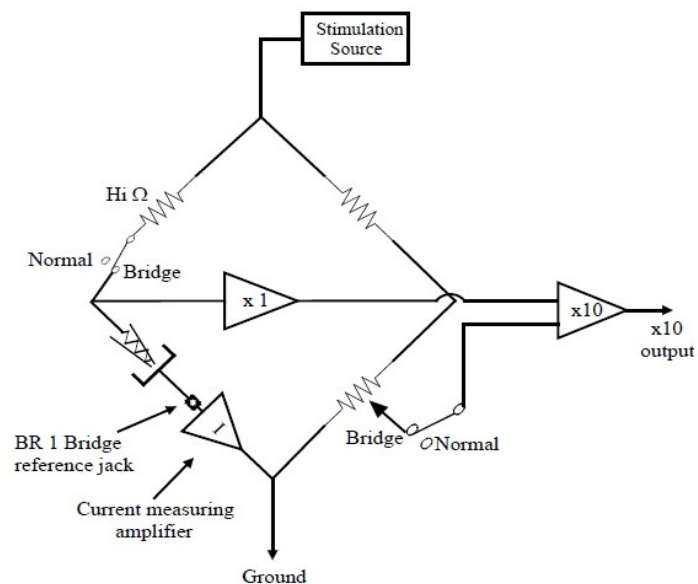


**Slika 3.** Shematski prikaz električnih uređaja korišćenih za registraciju i draženje. A – eksperimentalna komora sa izolovanim segmentnim ganglionima, B – pojačivač sa BR-1 komponentom, C – osciloskop, D – termo-štampeac osciloskopa, E – mehanički pisaa, F – stimulator sa jedinicom za izolaciju stimulusa; puna linija – signal dobijen iz ćelije, isprekidana linija – signal dobijen iz stimulatora.





**Shema 1.** Shema uređaja Winston Electronics Co., Model 1090 (San Francisko, SAD) korišćenog u eksperimentima. (preuzeto iz Winston Electronics Co. Model 1090 micro-electrode pre-amplifier and BR-1 bridge unit: Instruction manual. San Francisco: Winstnon Electronics Co.; 1972:16.)



**Shema 2.** Električno kolo Vitstonovog mosta iz jedinice BR-1, Winston Electronics Co. (San Francisko, SAD), korišćene u eksperimentima. Svi prekidači su u položajima za korišćenje mosta. (preuzeto iz Winston Electronics Co. Model 1090 micro-electrode pre-amplifier and BR-1 bridge unit: Instruction manual. San Francisco: Winstnon Electronics Co.; 1972:24.)

Električno draženje ćelija izvođeno je pomoću stimulatora (Grass Instruments, S48, Warwick, SAD) sa izolacionom jedinicom (Grass Instruments, SIU 5, Warwick, SAD). Elektrostimulacija Retzius-ovih neurona vršena je pravougaonim hiperpolarisućim impulsima jačine 0,5 – 1,0 nA, trajanja 500 ms i frekvencijom od 0,1 – 0,2 Hz.

Registrowanje mirovnog membranskog potencijala, akcionih potencijala, kao i promena napona membrane pri elektrostimulaciji ćelije i/ili tokom primene odgovarajućih supstancija, vršeno je na dvokanalnom osciloskopu (Hameg, HM 205-3, Mainhausen, Nemačka) i istovremeno beleženo na mehaničkom pisaču (Linseis, L 7025 II, Selb, Nemačka) i termo-štampaču osciloskopa (Hameg, HM 8148-2, Mainhausen, Nemačka), svih povezanih za pojačivač.

### 3.2.3 Određivanje ulaznog otpora membrane

Ogledi su izvođeni draženjem Retzius-ovog neurona konstantnom jednosmernom strujom poznate jačine. U isto vreme registrovan je voltažni odgovor membrane – merena je naponska razlika između citopolazmatske i ekstracelularne strane membrane. Očitavanje vrednosti amplitude izazvanih elektrotoničkih potencijala membrane vršeno je direktno sa zapisa termo-štampača osciloskopa. Ulazni otpor membrane, odnosno otpor koji membrana pruža prolasku struje dobijen je pomoću Omovog zakona, čija matematička formulacija glasi:

$$R_{uom} = \frac{U_{reg}}{I_{dr}} \quad (1)$$

gde je  $R_{uom}$  ulazni otpor membrane,  $U_{reg}$  registrovana promena napona, a  $I_{dr}$  jačina struje draženja. Jačina struje draženja izračunavana je po obrascu:

$$I_{dr} = \frac{U_{dr}}{10^9 \Omega} \quad (2)$$

gde je  $U_{dr}$  napon draženja koji se podešava na stimulatoru, a  $10^9 \Omega$  je otpor instrumenta, i predstavlja konstantu.

Rezultati su dobijeni višestrukom primenom jedne koncentracije supstancije, koja je određena prema pogodnosti u odnosu na jačinu efekta.

### 3.2.4 Korišćeni rastvori

Svi eksperimenti koji su izvođeni podrazumevali su izmenu rastvora u kom su se nalazili izolovani segmentni ganglioni pijavice, odnosno ispitivana je promena membranskog potencijala i električne aktivnosti Retzius-ovog neurona u jednom ganglionu, unutar kog je plasirana mikroelektroda, prilikom izlaganja ćelije različitim rastvorima. Menjanje rastvora u eksperimentalnoj komori vršeno je barem trostrukom zamenom zapremine komore. Izmena je vršena kontinuiranim protokom istovremenim usisavanjem tečnosti pomoću vodene vakuum pumpe i ubacivanjem odgovarajućeg rastvora pomoću šprica od 10 mL tokom 10 – 15 sekundi. Brzina ispiranja eksperimentalne komore omogućavala je da tokom ovog postupka mikroelektroda stabilno ostane unutar Retzius-ovog neurona. Dužina izlaganja Retzius-ovih neurona određenim rastvorima iznosila je jedan ili tri minuta, u zavisnosti od eksperimenta, nakon čega je komora bila ispirana standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice.

U eksperimentima su korišćeni sledeći rastvori:

- Standardni Ringerov rastvor za pijavice (Ri, sve koncentracije su date u mmol/L): NaCl 115,5, KCl 4,0; CaCl<sub>2</sub> 2,0; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,2; pH = 7,2;
- TRIS – Ringerov rastvor (TRIS-Ri), pravljen po recepturi standardnog Ringerovog rastvora za pijavice, gde je 115,5 mmol/L NaCl izmenjeno ekvimolarnom koncentracijom tris(hidroksimetil)aminometan-hlorida (TRIS, Acros Organics, Geel, Belgija), dok su NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bili izbačeni, a pH istitriran do vrednosti 7,2 pomoću HCl;
- DL-2,4-diaminobuterna kiselina (DL-2,4-DABA, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Nemačka) čuvana je u obliku svoje soli sa natrijumom u jednomolarnom rastvoru u frižideru na +4°C i rastvarana neposredno pre eksperimenta u koncentracijama 10<sup>-3</sup>, 3·10<sup>-3</sup>, 5·10<sup>-3</sup> i 10<sup>-2</sup> mol/L;
- L-2,4-diaminobuterna kiselina (L-2,4-DABA, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Nemačka) čuvana je u obliku svoje soli sa natrijumom u jednomolarnom rastvoru u frižideru na +4°C i rastvarana neposredno pre eksperimenta u koncentraciji 5·10<sup>-3</sup> mol/L;
- 6-cijano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion (CNQX, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Nemačka) čuvan je u koncentrovanom 10<sup>-2</sup> mol/L rastvoru u frižideru na +4°C i rastvaran neposredno pre eksperimenta u koncentraciji 10<sup>-5</sup> mol/L;
- L-Alanin (L-Ala, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Nemačka) čuvan je u jednomolarnom rastvoru u frižideru na +4°C i rastvaran neposredno pre eksperimenta u koncentraciji 5·10<sup>-3</sup> mol/L;

### 3.3 Statistička analiza rezultata

U obzir su uzimani rezultati dobijeni na Retzius-ovim neuronima čija je vrednost mirovnog membranskog potencijala bila niža od -40 mV, kao i rezultati eksperimenata kod kojih razlika potencijala elektrode na početku i na kraju oglada nije prevazilazila 2 mV.

Za svaku grupu oglada eksperimentalna procedura je ponavljana dok nije dobijeno barem šest uspešnih registracija, na osnovu kojih je vršena statistička obrada rezultata.

Rezultati su prikazani broičano i grafički. Broičane vrednosti su prikazane kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška merenja. Statistička analiza podataka vršena je pomoću statističkog paketa IBM SPSS Statistics, verzija 23.0 (IBM Corp., Armonk, SAD). Za sve podatke, adekvatnim testovima (Kolmogorov-Smirnov i Shapiro-Wilk) utvrđena je normalnost distribucije. Poređenje dobijenih rezultata vršeno je pomoću jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa post-hoc Tuckey testom i Studentovim t testom. Kao statistički značajana vrednost korišćena je verovatnoća nulte hipoteze manja od 5% ( $p < 0,05$ ), a kao visoko značajna  $p < 0,01$ .

Ispitivanje koncentracione zavisnosti vršeno je konstruisanjem koncentraciono-zavisnih krivulja pomoću jednačine:

$$y = E_{\min} + \frac{E_{\max} - E_{\min}}{1 + 10^{(EC_{50} - x)p}} \quad (3)$$

gde je  $E_{\min}$  vrednost donje horizontalne asimptote koja odgovara minimumu odgovora,  $E_{\max}$  je vrednost gornje horizontalne asimptote koja odgovara maksimumu odgovora, dok su parametri krive koncentracione zavisnosti:  $EC_{50}$  – koncentracija supstancije koja dovodi do polovine maksimalnog efekta na membranski potencijal i  $p$  - Hilov (Hill) koeficijent, odnosno nagib sigmoidne krive. Ispitivanje koncentracione zavisnosti i konstrukcija koncentraciono-zavisnih krivulja vršeno je pomoću programa OriginPro, verzija 91E (OriginLab Corp., Northampton, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1 Dejstvo DL-2,4-diaminobuterne kiseline (DL-2,4-DABA) na membranski potencijal Retzius-ovih neurona

Uvidom u dostupnu naučnu literaturu, zapaža se skoro potpuno odsustvo podataka o elektrofiziološkim efektima 2,4-DABA na neurone. Jedini koji su ovo ispitali do sada su Weiss i saradnici koji su ukratko prikazali elektrofiziološki učinak L-2,4-DABA na neuronima u kulturi, pri čemu su ovo opažanje iskoristili isključivo radi poređenja sa efektima BMAA, koja je bila predmet njihovog istraživanja (Weiss i sar., 1989a). U našem istraživanju, pratili smo protokol, koji je ranije utvrđen u našoj laboratoriji i korišćen za ispitivanja učinka drugih egzogenih (BOAA<sup>18</sup>, BMAA) i endogenih aminokiselina (glutamat, aspartat). Inicijalna koncentracija DL-2,4-DABA kojoj smo izlagali Retzius-ove neurone bila je  $10^{-3}$  mol/L, a potom smo posmatrali ponašanje ćelija u rastvorima gde je koncentracija ove aminokiseline bila  $3 \cdot 10^{-3}$ ,  $5 \cdot 10^{-3}$  i  $10^{-2}$  mol/L, odnosno povećana 3, 5 ili 10 puta. Rezultati naših eksperimenata sumirani su u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Vrednosti mirovnog membranskog potencijala i promena membranskog potencijala Retzius-ovih neurona pijavice uzrokovana primenom rastućih koncentracija DL-2,4-DABA.

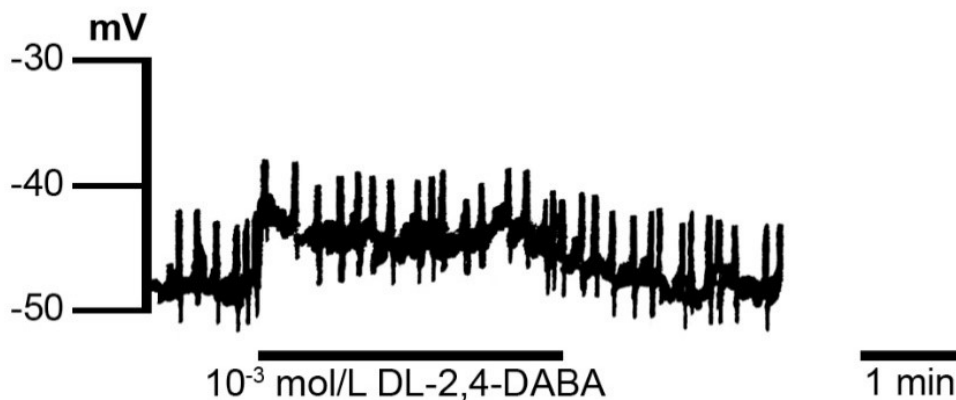
Koncentracija (mol/L)	Membranski potencijal (mV)		Depolarizacija (mV)	<i>p</i>	<i>n</i>
	Mirovni	DL-2,4-DABA			
$10^{-3}$	$-47,44 \pm 2,90$	$-45,07 \pm 2,95$	$2,36 \pm 0,48$	$< 0,01$	8
$3 \cdot 10^{-3}$	$-43,56 \pm 2,86$	$-32,14 \pm 2,60$	$11,42 \pm 0,94$	$< 0,01$	6
$5 \cdot 10^{-3}$	$-47,82 \pm 3,27$	$-8,20 \pm 2,55$	$39,63 \pm 2,22$	$< 0,01$	8
$10^{-2}$	$-50,10 \pm 2,26$	$-3,04 \pm 5,19$	$47,05 \pm 4,33$	$< 0,01$	6

Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška merenja, Koncentracija – koncentracije DL-2,4-DABA, Depolarizacija – razlika membranskog potencijala tokom primene DL-2,4-DABA i mirovnog membranskog potencijala, *p* – značajnost razlike t-testa u odnosu na mirovni membranski potencijal, *n* – broj jedinica posmatranja.

Sve primenjene koncentracije DL-2,4-DABA izazvale su statistički visoko značajnu promenu membranskog potencijala Retzius-ovih neurona, u pogledu depolarizacije membrane ćelija, što se može videti u Tabeli 1.

<sup>18</sup>  $\beta$ -N-okalilamino-L-alanin (engl.  $\beta$ -N-oxalylamino-L-alanine, BOAA)

Koncentracija od  $10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA proizvela je minimalnu, ali visoko statistički značajnu depolarizaciju membranskog potencijala Retzius-ovog neurona od  $2,36 \pm 0,48$  mV, odnosno sa  $-47,44 \pm 2,90$  mV na  $-45,07 \pm 2,95$  mV ( $p < 0,01$ ,  $n = 8$ , Slika 4.).

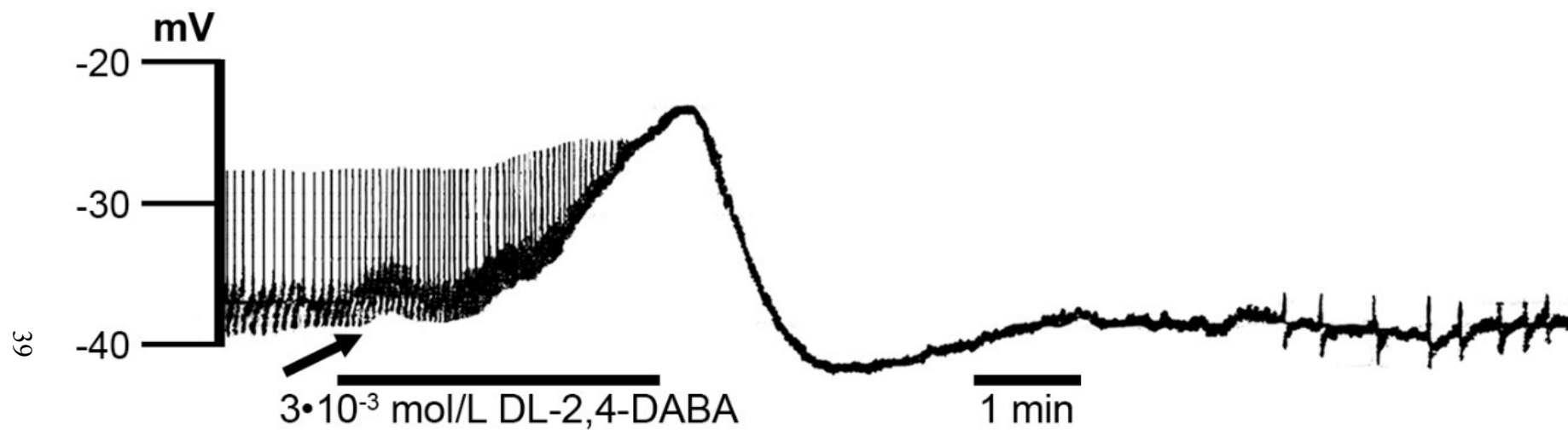


**Slika 4.** Dejstvo  $10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na mirovni membranski potencijal i električnu aktivnost Retzius-ovog neurona tokom trominutnog izlaganja ćelije.

Na Slici 4. može se uočiti da je tokom trominutne primene  $10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA spontana električna aktivnost Retzius-ovog neurona ostala neizmenjena, odnosno da se održavalo spontano izbijanje akcionih potencijala. Nakon ispiranja eksperimentalne komore standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice i uklanjanja supstancije, membranski potencijal ćelije spuštao se na vrednost koja odgovara onoj pre aplikacije  $10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA.

Primena  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA izazvala je povišenje membranskog potencijala neurona sa  $-43,56 \pm 2,86$  mV na  $-32,14 \pm 2,60$  mV, odnosno visoko statistički značajnu depolarizaciju membrane od  $11,42 \pm 0,94$  mV ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ , Slika 5.).

Pored izraženije depolarizacije mirovnog membranskog potencijala neurona u odnosu na depolarizaciju izazvanu  $10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, na Slici 5. se može uočiti povećanje frekvencije izbijanja akcionih potencijala tokom aplikacije. Kod pojedinih Retzius-ovih neurona izlaganih koncentraciji  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, membranska depolarizacija razvijala se kroz dve faze, koje će detaljno biti razmatrane u sledećem poglavlju. Pred završetak trominutne primene  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, pri postizanju najveće depolarizacije membrane neurona, dolazilo je do prestanka spontane električne aktivnosti ćelija, odnosno do pojave depolarizacionog bloka.



**Slika 5.** Dejstvo  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na mirovni membranski potencijal i električnu aktivnost Retzius-ovog neurona tokom trominutnog izlaganja ćelije. Strelica označava prvu fazu depolarizacije

Nakon uklanjanja  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, ispiranjem komore standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice, repolarizaciju membrane pratila je diskretna, prolazna faza hiperpolarizacije membranskog potencijala. Ćelijska membrana se zatim postepeno depolarisala do nivoa membranskog potencijala pre primene supstancije i potom se uspostavljala sponatna električna aktivnost neurona.

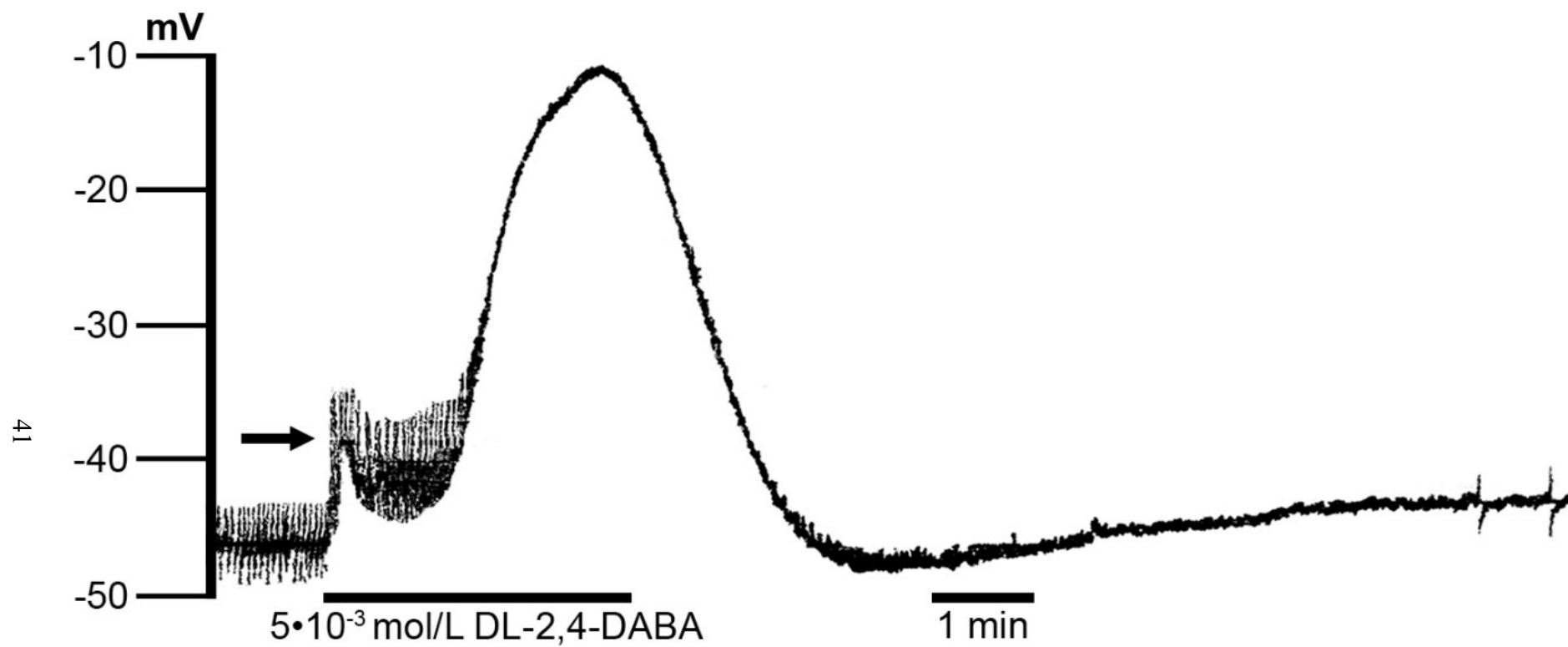
Izlaganje Retzius-ovih neurona  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA proizvodilo je brzu i visoko statistički značajnu depolarizaciju membranskog potencijala sa mirovnog nivoa od  $-47,82 \pm 3,27$  mV na vrednost od  $-8,20 \pm 2,55$  mV, odnosno za  $39,63 \pm 2,22$  mV ( $p < 0,01$ ,  $n = 8$ , Slika 6.). Amplituda depolarizacije membranskog potencijala bila je višestruko veća od onih koje su izazivale koncentracije  $10^{-3}$  mol/L i  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA.

Na Slici 6. uočava se da, pored izražene depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovog neurona u poređenju sa učinkom manjih koncentracija 2,4-DABA (Slika 4. i Slika 5.), dolazi i do izraženijeg povećanja frekvencije izbijanja akcionih potencijala. Prestanak spontane električne aktivnosti, tokom trominutnog izlaganja neurona ovoj ekscitatornoj kiselini, bio je praćen daljim napredovanjem depolarizacije membranskog potencijala ćelije. Membranska depolarizacija neurona pokazivala je dvofaznu prirodu, o čemu će detaljno biti diskutovano u sledećem poglavlju.

Po uklanjanju  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA ispiranjem eksperimentalne komore standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice, zapaženo je da se pojedini neuroni nisu funkcionalno oporavljali. Kod Retzius-ovih neurona kod kojih je uočen oporavak, zapažena je repolarizacija membrane praćena upadljivijom hiperpolarizacijom membranskog potencijala. Interesantno je da se hiperpolarizacija membrane nije javljala tokom eksperimenata gde je ispitivano dejstvo  $10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, ali je bila redovni pratilac repolarizacije membrane nakon uklanjanja  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L i, u slučajevima kada je dolazilo do funkcionalnog oporavka ćelija, nakon uklanjanja  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L ove aminokiseline. Izraženiju hiperpolarizaciju posle veće depolarizacije membrane nervne ćelije zapazili su i James i Walker, pripisujući ovu pojavu stepenu aktivnosti  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  pumpe. Kod izražene depolarizacije neurona zbog većeg ulaska jona natrijuma u ćeliju, aktivnost ovog ATP-zavisnog transportera se povećava (James i sar., 1978).

Kod onih neurona koji su se funkcionalno oporavljali nakon primene  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, zapaženo je da se ćelijska membrana po hiperpolarizaciji postepeno depolarisala do nivoa membranskog potencijala pre primene aminokiseline, ali u dužem vremenskom periodu u odnosu na eksperimente kada je primenjivana  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA. Takođe, spontana električna aktivnost Retzius-ovih neurona, odnosno spontano izbijanje akcionih potencijala javljalo se kasnije nakon postizanja vrednosti mirovnog membranskog potencijala ćelija, u poređenju sa vremenskim periodom oporavka neurona nakon primene  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA.



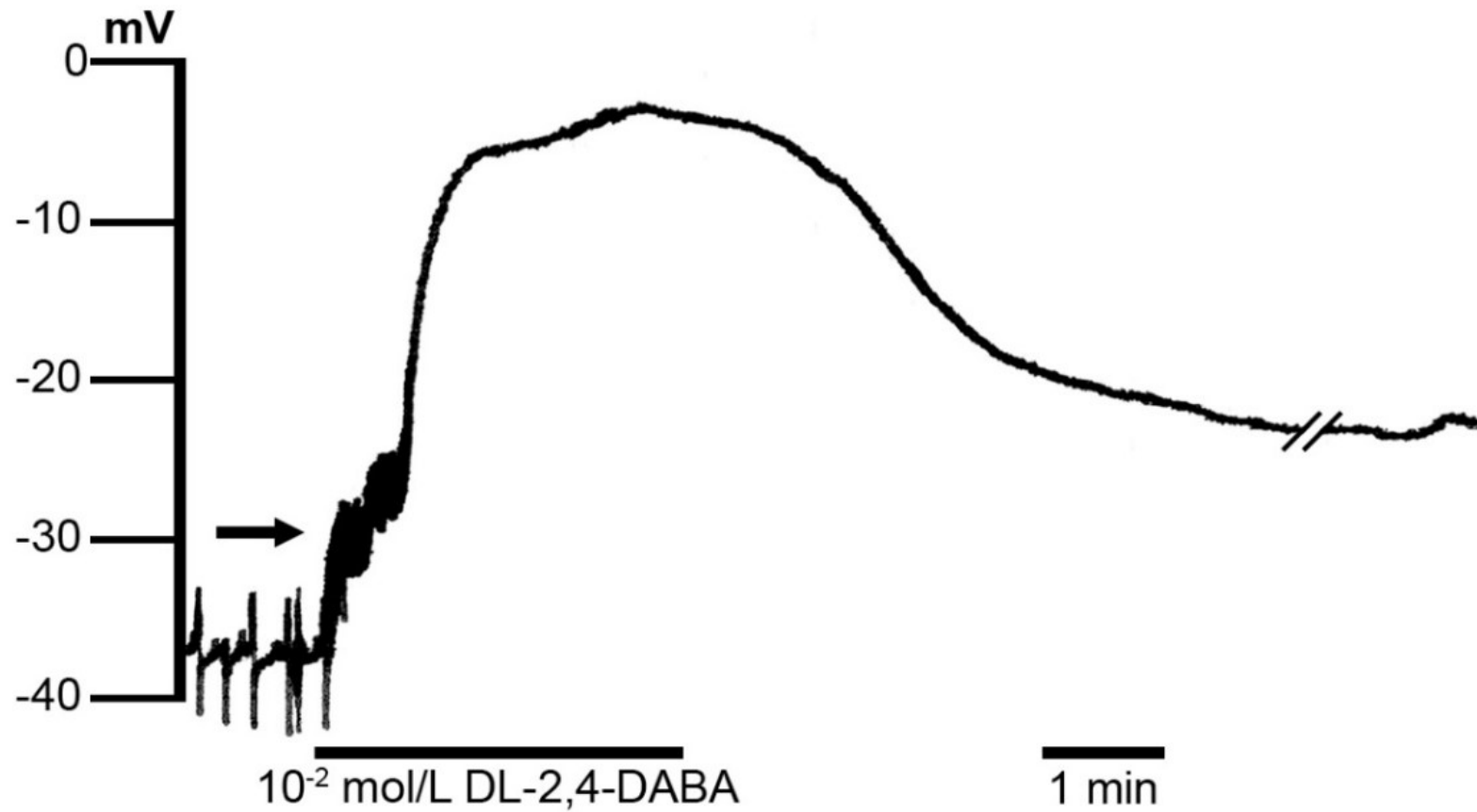


**Slika 6.** Dejstvo  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na mirovni membranski potencijal i električnu aktivnost Retzius-ovog neurona tokom trominutnog izlaganja ćelije. Strelica označava prvu fazu depolarizacije.

Najjači učinak na električnu aktivnost ćelija, izazvalo je trominutno izlaganje Retzius-ovih neurona  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA. Mirovni membranski potencijal od  $-50,10 \pm 2,26$  mV se visoko statistički značajno depolarisao za  $47,05 \pm 4,33$  mV do vrednosti membranskog potencijala od  $-3,04 \pm 5,19$  mV ( $p < 0,01$ ,  $n = 6$ , Slika 7.).

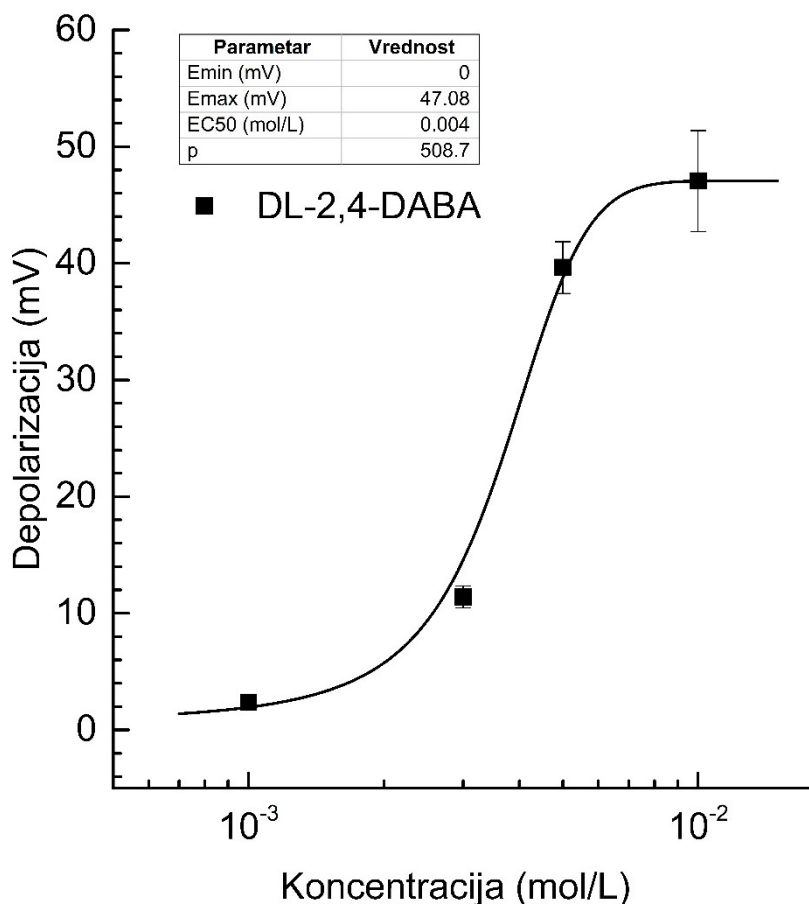
Pri primeni  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA, pored drastične depolarizacije membranskog potencijala u odnosu na one, opažene pri primeni manjih koncentracija 2,4-DABA (Slika 4., Slika 5. i Slika 6.), dolazilo je do ubrzanja frekvencije izbijanja akcionih potencijala, praćenog prestankom spontane električne aktivnosti neurona veoma rano prilikom primene ove ekscitatorne aminokiseline, što se može videti na Slici 7. Depolarizacija membrane Retzius-ovih neurona razvijala se kroz dve faze, koje će detaljnije biti opisane u sledećem poglavlju. Međutim, pri uklanjanju ove supstance ispiranjem eksperimentalne komore standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice, javljala se delimična repolarizacija membranskog potencijala neurona, a izostajala je faza hiperpolarizacije membrane, smanjenje membranskog potencijala na mirovni nivo i oporavak spontane električne aktivnosti Retzius-ovih neurona.

DL-2,4-DABA, primenjena u rastućim koncentracijama dovođila je do međusobno statistički značajno različitih i postepeno većih vrednosti amplitude depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona pijavice. Tako su jačine depolarizacija membrana neurona nastalih tokom primene  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ),  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ) i  $10^{-2}$  mol/L ( $p < 0,01$ ,  $n=5$ ) DL-2,4-DABA bile statistički značajno veće od depolarizacije izazvane  $10^{-3}$  mol/L ove aminokiseline. Sa druge strane, depolarizacija membranskog potencijala Retzius-ovih neurona nakon izlaganja ćelija  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L, bila je statistički značajno slabija od onih, uzrokovanih primenom  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ), odnosno  $10^{-2}$  mol/L ( $p < 0,01$ ,  $n=5$ ) DL-2,4-DABA. Međutim, nije ustanovljena statistički značajna razlika među depolarišućim učincima  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L i  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona.



**Slika 7.** Dejstvo  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA na mirovni membranski potencijal i električnu aktivnost Retzius-ovog neurona tokom trominutnog izlaganja ćelije. Pauza (//) u zapisu predstavlja 10-minutni stabilni zapis koji je zbog preglednosti izostavljen. Strelica označava prvu fazu depolarizacije.

Obzirom da se može uvideti povećanje amplitude depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona sa porastom koncentracije DL-2,4-DABA, ispitana je koncentraciona zavisnost učinka DL-2,4-DABA na membranski potencijal konstruisanjem koncentraciono-zavisne krive prema Jednačini 3. Grafički prikaz rezultata i numeričke vrednosti parametara nalaze se na Grafiku 1.



**Grafik 1.** Koncentraciono-zavisna kriva učinka DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona u rasponu primenjenih koncentracija.  $E_{\min}$  – teoretski minimum učinka (donja asimptota),  $E_{\max}$  – teoretski maksimum učinka (gornja asimptota),  $EC_{50}$  – koncentracija supstancije koja dovodi do polovine maksimalnog efekta na membranski potencijal,  $p$  – koeficijent nagiba; prikazana je standardna greška merenja.

Sagledavanjem prikazanih rezultata i dobrim slaganjem koncentraciono-zavisne krive sa eksperimentalnim podacima, zaključeno je da je dejstvo DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovog neurona ekscitatorno i koncentraciono-zavistan za izračunatim minimumom od 0 mV i maksimumom od 47,08 mV i  $EC_{50}$  od 0,004 mol/L.

## 4.2 Dvofazna priroda dejstva DL-2,4-DABA

Analizirajući zapise dobijene tokom eksperimenata, uočili smo da Retzius-ovi neuroni, kada su izloženi koncentracijama DL-2,4-DABA od  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L i većim, ispoljavaju specifičan depolarizacioni odgovor koji se sastoji od dve faze. Prema našim saznanjima, ovakav učinak na membranski potencijal Retzius-ovog neurona nikada do sada nije bio opisan u kontekstu dejstva neke ekscitatorne aminokiseline. Inicijalna ekscitatorna faza, koju smo nazvali prvom fazom depolarizacije, bila je kraćeg trajanja i manje amplitude depolarizacije, a nju je pratila upadljiva depolarizacija membranskog potencijala opisana u prethodnom poglavlju. Ova faza depolarizacije nazvana je drugom fazom, odnosno kompletnom depolarizacijom.

Rezultati eksperimenta su sumirani u Tabeli 2. i odnose se samo na ćelije kod kojih su se javljale obe faze depolarizacije membranskog potencijala.

**Tabela 2.** Vrednosti mirovnog membranskog potencijala i promena membranskog potencijala Retzius-ovih neurona pijavice tokom prve faze depolarizacije uzrokovanih primenom rastućih koncentracija DL-2,4-DABA.

Koncentracija (mol/L)	Membranski potencijal (mV)		I faza depolarizacije (mV)	<i>p</i>	<i>n</i>
	Mirovni	I faza			
$3 \cdot 10^{-3}$	$-41,63 \pm 1,80$	$-39,96 \pm 1,80$	$1,67 \pm 0,26$	$< 0,05$	3
$5 \cdot 10^{-3}$	$-47,82 \pm 3,27$	$-39,91 \pm 2,77$	$7,91 \pm 0,81$	$< 0,01$	8
$10^{-2}$	$-50,10 \pm 2,26$	$-35,72 \pm 1,68$	$14,37 \pm 0,79$	$< 0,01$	6

Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška merenja, Koncentracija – koncentracije DL-2,4-DABA, I faza – membranski potencijal tokom prve faze depolarizacije membrane, depolarizacija – razlika membranskog potencijala tokom primene DL-2,4-DABA i mirovnog membranskog potencijala, *p* – značajnost razlike t-testa u odnosu na mirovni membranski potencijal, *n* – broj jedinica posmatranja.

Izlaganje Retzius-ovih neurona  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA proizvelo je dvofazni ekscitatorni efekat u 3 od 6 ispitivanih ćelija sa prosečnom amplitudom prve faze depolarizacije membrane od  $1,67 \pm 0,26$  mV. Na neuronima kod kojih se javila dvofazna depolarizacija, inicijalna faza je dovela do statistički značajnog porasta vrednosti membranskog potencijala sa  $-41,63 \pm 1,80$  mV na  $-39,96 \pm 1,80$  mV ( $p < 0,05$ ,  $n=3$ ). Prva faza depolarizacije bila je praćena spontanom repolarizacijom membranskog potencijala do mirovnog nivoa, nakon kojeg je počinjala druga faza (Slika 5., deo zapisa obeležen strelicom).

Koncentracije od  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L i  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA izazivale su obe faze depolarizacije kod svih izloženih Retzius-ovih neurona.

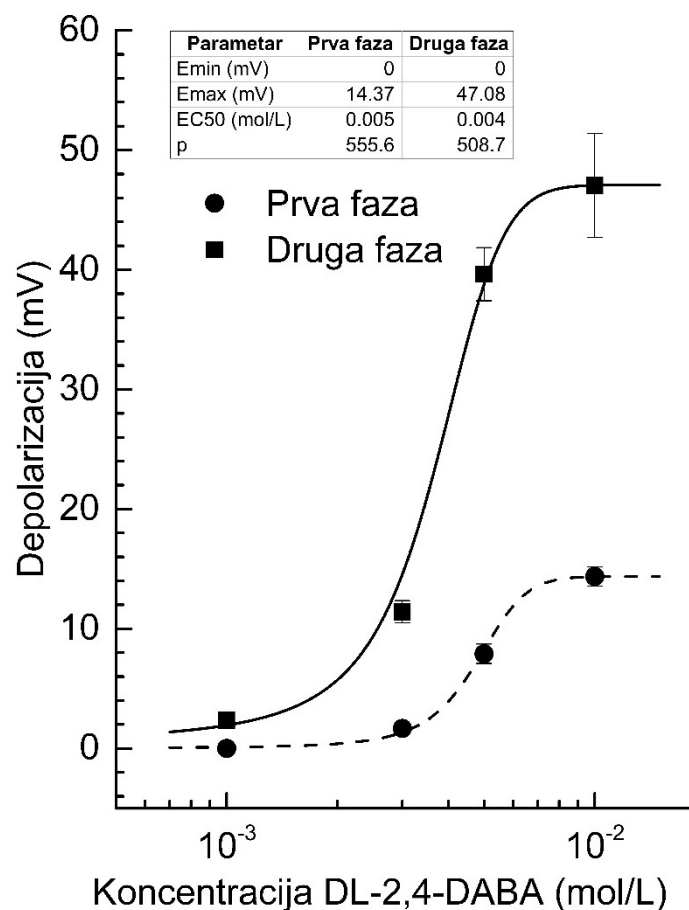
Primena  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, dovela je do visoko statistički značajne inicijalne depolarizacije membranskog potencijala, prosečne amplitude od  $7,91 \pm 0,81$  mV. Pri izlaganju Retzius-ovih neurona ovoj koncentraciji DL-2,4-DABA, membranski potencijal prvo je depolarisao sa  $-47,82 \pm 3,27$  mV na  $-39,91 \pm 2,77$  mV ( $p < 0,01$ ,  $n=8$ ). Inicijalna depolarizacija bila je praćena spontanom, ali nekompletnom i prolaznom repolarizacijom pre druge faze, odnosno membranski potencijal nikad nije dostizao mirovni nivo kao kod primene  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L supstancije (Slika 6., deo zapisa obeležen strelicom).

Tokom primene  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA, prva faza depolarizacije membranskog potencijala iznosila je  $14,37 \pm 0,79$  mV, odnosno membranski potencijal od  $-50,10 \pm 2,26$  mV se depolarisao do  $-35,72 \pm 1,68$  mV, što je bilo visoko statistički značajno ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ). Za razliku od dinamike pojave prvih faza depolarizacije izazvanih  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L i  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L, pri izlaganju Retzius-ovih neurona najvišoj koncentraciji DL-2,4-DABA inicijalna depolarizacija bila je praćena promptnom drugom fazom depolarizacije, bez znakova repolarizacije, tj. oporavka između ove dve faze (Slika 7., deo zapisa obeležen strelicom).

Vrednosti prvih faza depolarizacije membranskog potencijala pri primeni DL-2,4-DABA u koncentracijama  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L i većim, bile su statistički značajno različite. Tako je amplituda prve faze depolarizacije membranskog potencijala koja se javljala pri primeni  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L bila značajno veća od amplitude prve faze membranske depolarizacije indukovane  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L ( $p < 0,01$ ,  $n=3$ ), ali statistički značajno manja od jačine inicijalne depolarizacije prouzrokovane  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ).

Trajanje prve faze depolarizacije bilo je prilično uniformno i bilo je potrebno do 40 sekundi od početka primene DL-2,4-DABA za njeno postizanje, bez obzira na primenjenu koncentraciju ove aminokiseline.

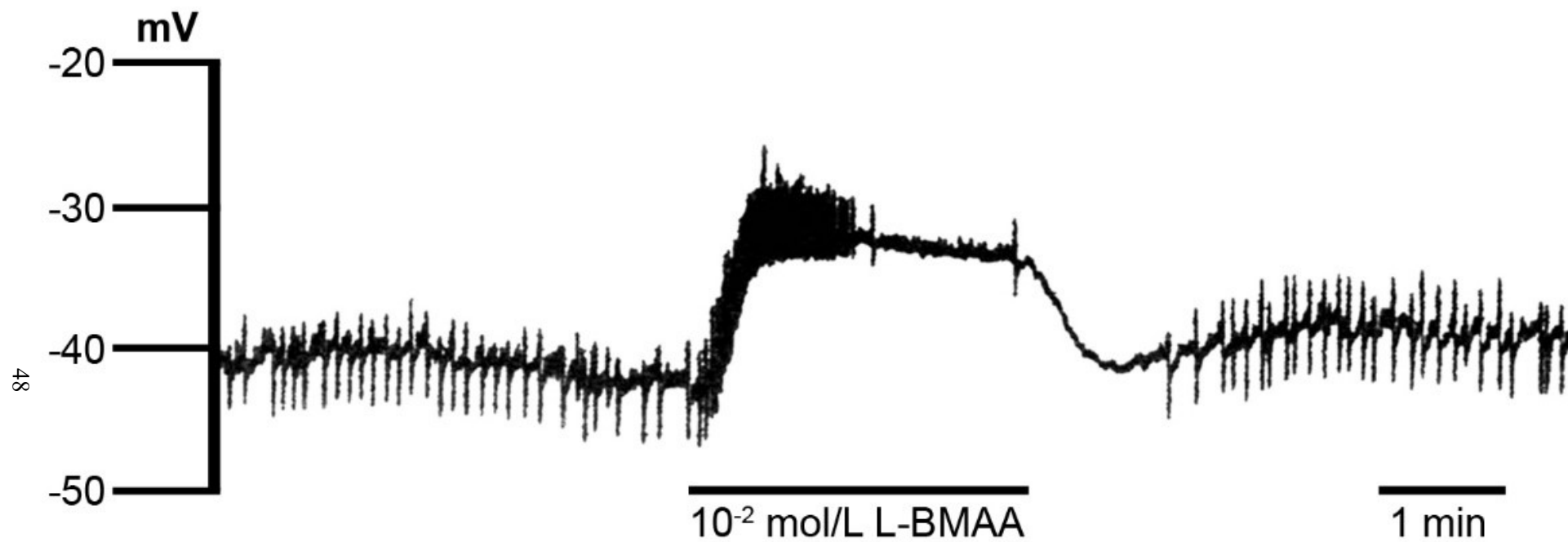
Obzirom na to da je i prva faza depolarizacije membranskog potencijala pokazala koncentracionu zavisnost, grafički smo je predstavili na odgovarajući način i ujedno je prikazali u odnosu na koncentraciono-zavisnu krivu kompletne depolarizacije membrane Retzius-ovog neurona (Grafik 2.).



**Grafik 2.** Uporedni prikaz koncentraciono-zavisnih krivih učinka DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona u prvoj fazi depolarizacije (●) i kompletnoj depolarizaciji (■). Isprekidana linija – prva faza depolarizacije, puna linija – druga faza depolarizacije (kompletna depolarizacija),  $E_{min}$  – teoretski minimum učinka (donja asimptota),  $E_{max}$  – teoretski maksimum učinka (gornja asimptota),  $EC_{50}$  – koncentracija supstancije koja dovodi do polovine maksimalnog efekta na membranski potencijal,  $p$  – koeficijent nagiba; prikazana je standardna greška merenja.

#### 4.3 Poređenje dejstava DL-2,4-DABA i drugih ekscitatornih aminokiselina na membranski potencijal Retzius-ovih neurona

U cilju ispitivanja neurotoksičnog potencijala DABA, poredili smo učinke DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona sa dejstvom drugih endogenih i sredinskih ekscitatornih aminokiselina, za koje je poznato da su neurotoksične, a ispitivane su ranije u našoj laboratoriji. Vrednosti depolarizacije membranskog potencijala pri primeni DL-2,4-DABA, koje prevazilaze 30 mV nisu do sada opisane na našem modelu u eksperimentima sa drugim endogenim (glutamat, aspartat) i egzogenim (BOAA, BMAA) aminokiselinama.



**Slika 8.** Dejstvo  $10^{-2}$  mol/L L-BMAA na mirovni membranski potencijal i električnu aktivnost Retzius-ovog neurona tokom trominutnog izlaganja ćelije.



Kako bi poređenje jačine učinka DL-2,4-DABA i jednog od predstavnika sredinskih ekscitatornih aminokiselina i njenog izomera L-BMAA bilo lakše, na Slici 8. prikazana je depolarizacija membrane Retzius-ovog neurona od 11 mV koju je izazvalo trominutno izlaganje ćelije  $10^{-2}$  mol/L BMAA.

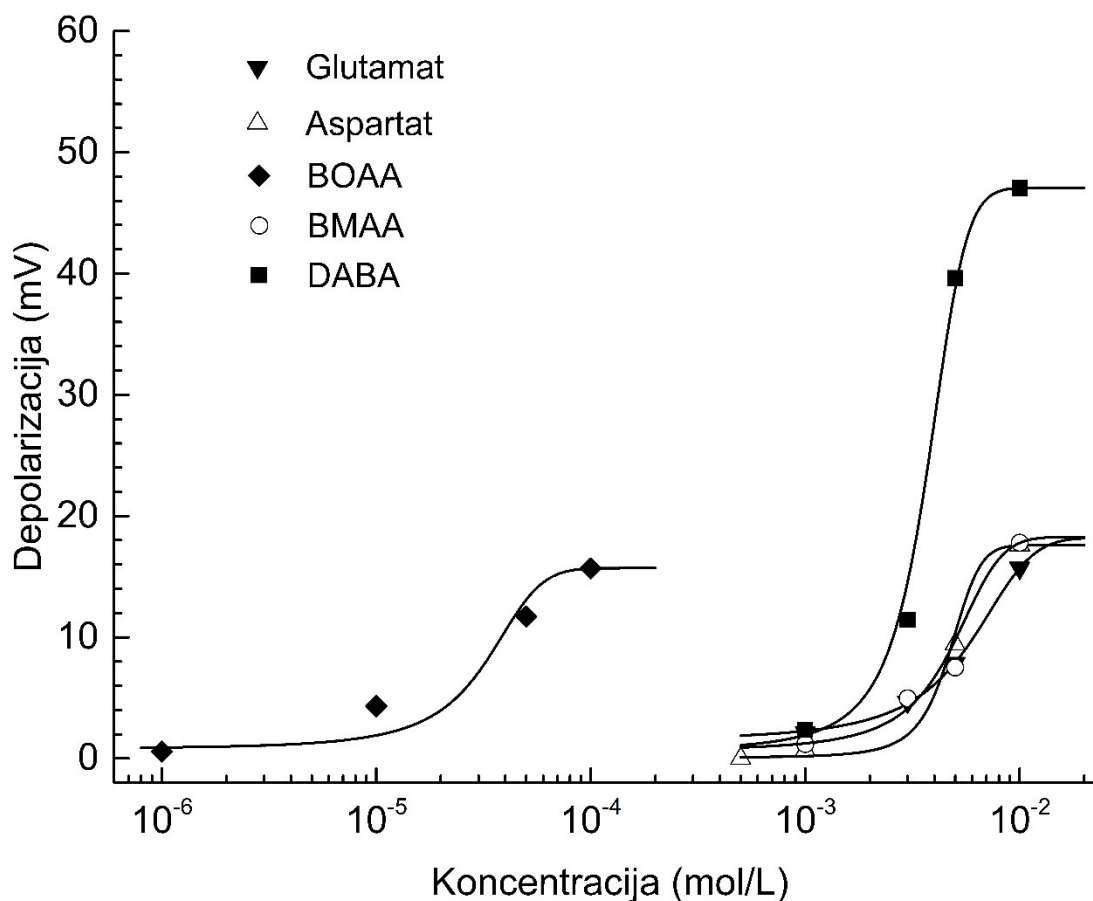
Poređenje efekata ispitivanih endogenih i egzogenih ekscitatornih aminokiselina prikazano je u Tabeli 3.

**Tabela 3.** Poređenje dejstva DL-2,4-DABA sa efektima endogenih i sredinskih ekscitatornih aminokiselina na membranski potencijal Retzius-ovih neurona.

	L-Glutamat	L-Aspartat	L-BOAA	L-BMAA	DL-2,4-DABA	
					I faza	II faza
<b>PD<sub>max</sub></b> <b>(mV)</b>	17,93 ± 0,53	17,74 ± 0,39	15,70 ± 0,91	13,10 ± 0,03	14,41 ± 0,18	47,08 ± 0,03
<b>EC<sub>50</sub></b> <b>(mol/L)</b>	(6,0 ± 0,2) · 10 <sup>-3</sup>	(5,0 ± 0,1) · 10 <sup>-3</sup>	(3,0 ± 0,9) · 10 <sup>-5</sup>	(4,0 ± 0,9) · 10 <sup>-3</sup>	(5,0 ± 0,1) · 10 <sup>-3</sup>	(4,0 ± 0,2) · 10 <sup>-3</sup>

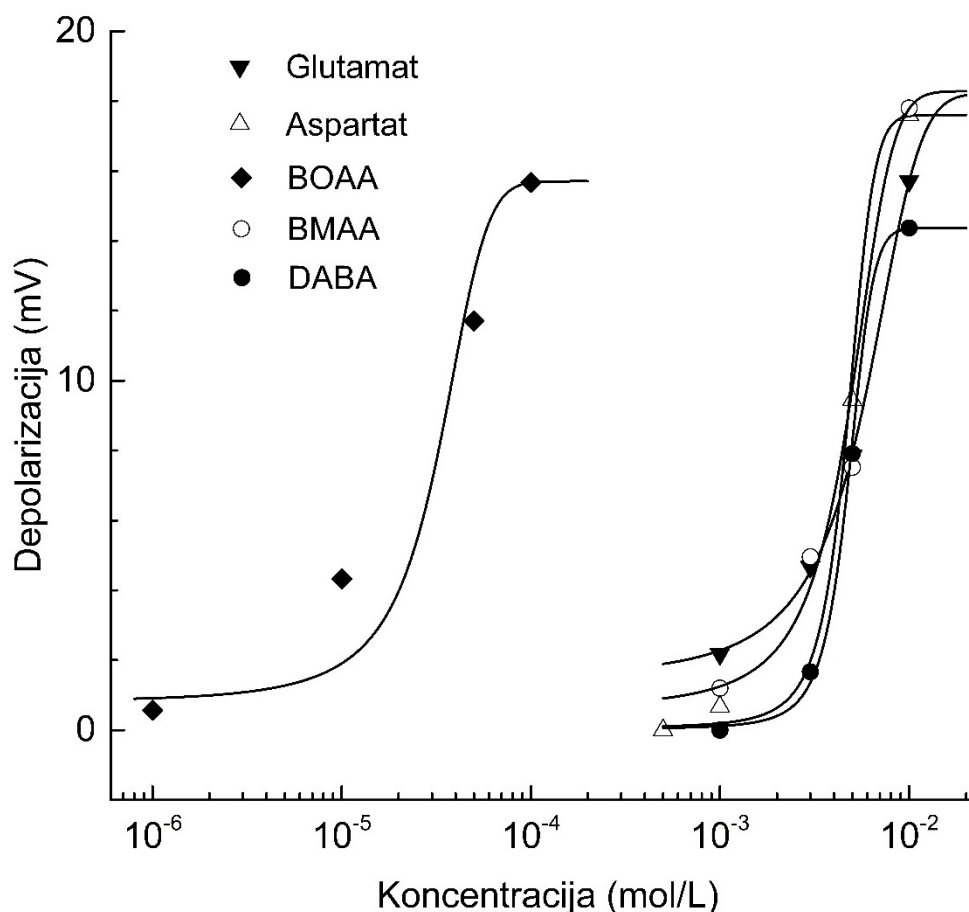
Podaci prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška merenja, I faza – prva faza depolarizacije, II faza – druga faza depolarizacije, L-BOAA – β-N-oksalilamino-L-alanin, L-BMAA – β-N-metilamino-L-alanin, DL-2,4-DABA – DL-2,4-diaminobuterna kiselina, PD<sub>max</sub> – maksimalna vrednost depolarizacije membrane, EC<sub>50</sub> – koncentracija supstancije koja dovodi do polovine maksimalnog efekta na membranski potencijal

Konstruisanjem koncentraciono-zavisnih krivih dejstva rastućih koncentracija ispitivanih endogenih i egzogenih ekscitatornih aminokiselina i njihovim poređenjem, možemo zaključiti da i grafički prikazani učinci potvrđuju naše opažanje da je BOAA najpotentniji, a DABA najefikasniji ekscitatorni agens. U Tabeli 3. i na Grafiku 3. se ovo jasno može uočiti, budući da su koncentracije BOAA potrebne da izazovu depolarizaciju membrane Retzius-ovog neurona bile do 100 puta manje od koncentracija drugih aminokiselina. Sa druge strane, ističe se učinak većih koncentracija DL-2,4-DABA, koje su prouzrokovale depolarizacije višestruko jače po amplitudi u odnosu na iste koncentracije drugih aminokiselina (Slika 7. i Slika 8.).



**Grafik 3.** Uporedni prikaz koncentraciono-zavisnih maksimalnih učinaka L-glutamata (▼), L-aspartata (△), L-BOAA (◆), L-BMAA (○) i DL-2,4-DABA (■) na membranski potencijal Retzius-ovih neurona u rasponu primenjenih koncentracija. BOAA –  $\beta$ -N-oksalilamino-L-alanin, BMAA –  $\beta$ -N-metilamino-L-alanin, DABA – DL-2,4-diaminobuterna kiselina. Radi bolje preglednosti standardne greške merenja su izostavljene iz grafika.

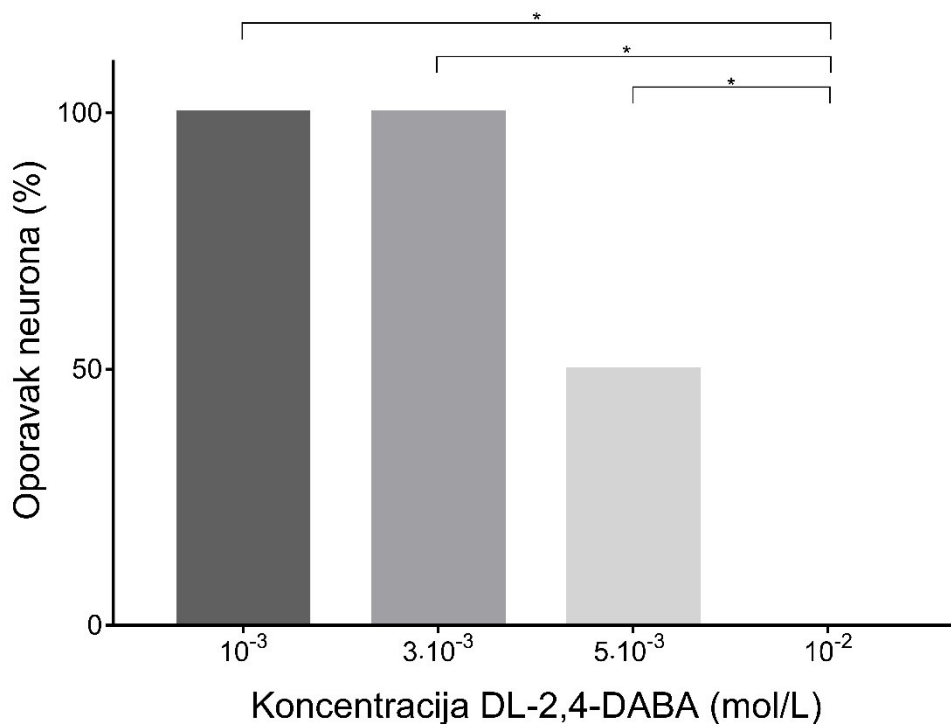
Uporednim analiziranjem Grafika 3., Grafika 4., Tabele 2. i Tabele 3. opaženo je podudaranje izračunate maksimalne amplitude prve faze depolarizacije koja se javlja pri primeni DL-2,4-DABA sa grafički i numerički prikazanim maksimalnim učincima drugih, ranije ispitivanih aminokiselina na našem modelu za koje je poznato da ispoljavaju neurotoksično dejstvo pokretanjem procesa ekscitotoksičnosti.



**Grafik 4.** Uporedni prikaz koncentraciono-zavisnih krivih maksimalnih učinaka L-glutamata (▼), L-aspartata (△), L-BOAA (◆), L-BMAA (○) i prve faze depolarizacije DL-2,4-DABA (●) na membranski potencijal Retzius-ovih neurona u rasponu primenjenih koncentracija. BOAA –  $\beta$ -N-oksalilamino-L-alanin, BMAA –  $\beta$ -N-metilamino-L-alanin, DABA – DL-2,4-diaminobuterna kiselina. Radi bolje preglednosti standardne greške merenja su izostavljene iz grafika.

#### 4.4 Izostanak funkcionalnog oporavka Retzius-ovih neurona

Nakon uklanjanja DL-2,4-DABA iz eksperimentalne komore, odnosno vraćanja Retzius-ovih neurona u standardni Ringerov rastvor za pijavice, uočena je statistički značajna razlika u pojavi funkcionalnog oporavka membranskog potencijala i električne aktivnosti ćelija, a u skladu sa koncentracijom primenjene supstancije. Nasuprot tome, trominutno izlaganje Retzius-ovih neurona koncentracijama glutamata, aspartata i BMAA koje odgovaraju onim u kojima je primenjivana DL-2,4-DABA, bilo je uvek praćeno potpunim funkcionalnim oporavkom ćelija nakon ispiranja standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice.



**Grafik 5.** Oporavak Retzius-ovih neurona nakon trominutne primene  $10^{-3}$  mol/L,  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L,  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L i  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA. \*  $p < 0,05$  značajnost razlike oporavka Retzius-ovih neurona u odnosu na oporavak ćelija izlaganih  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA.

Izostanak funkcionalnog oporavka Retzius-ovih neurona u ovom kontekstu značio je da je membranski potencijal po ispiranju supstancije trajno ostajao manje negativan u odnosu na mirovni membranski potencijal pre aplikacije DL-2,4-DABA, odnosno nije se vraćao na mirovnu vrednost i/ili da se spontano okidanje akcionih potencijala ćelija po ispiranju nije ponovo uspostavljalo. Pod nepotpunim funkcionalnim oporavkom Retzius-ovih neurona podrazumevano je ili da je membranski potencijal nakon uklanjanja DL-2,4-DABA trajno ostajao manje negativan u odnosu na mirovni membranski potencijal, ali da se uspostavljalo spontano okidanje akcionih potencijala, ili da se membranski potencijal vraćao na nivo mirovnog membranskog potencijala, ali se nije uspostavljalo spontano okidanje akcionih potencijala. Odloženim oporavkom smatran je onaj u kojem je ćeliji bilo potrebno više od pet minuta da ponovo stabilizuje mirovni membranski potencijal i/ili spontano okidanje akcionih potencijala.

Kod Retzius-ovih neurona izloženih  $10^{-3}$  mol/L i  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA tokom tri minuta, zabeležen je potpuni oporavak nakon ispiranja standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice (Slika 4., Slika 5. i Grafik 5.).

Nakon trominutne primene  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA i ispiranja eksperimentalne komore, samo polovina ćelija se oporavila, a zabeleženi oporavak bio je nekompletan, odložen ili i jedno i drugo. (Slika 6., Grafik 5.).

Nakon primene  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA tokom tri minuta i ispiranja standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice zapažen je potpuni izostanak funkcionalnog oporavka, tako da se ni jedna od tretiranih ćelija nije oporavila ni nakon 30 minuta kontinuiranog praćenja (Slika 7., Grafik 5.). Nasuprot ovim nalazima, trominutno izlaganje Retzius-ovih neurona najvećim koncentracijama L-BMAA (Slika 8.), BOAA, glutamata i aspartata u našim ogledima nije dovelo do poremećaja funkcionalnog oporavka ćelija nakon njihovog ispiranja.

Usled nepostojanja literaturnih podataka o elektrofiziološkim učincima DL-2,4-DABA, inicijalno je praćen eksperimentalni protokol koji smo u našoj laboratoriji koristili za druge, ranije pomenute ekscitatorne aminokiseline (Cemerikic i sar., 2001; Lopacic i sar., 2002; Lopičić, 2004; Nedeljkov i sar., 2005; Lopacic i sar., 2009a; Lopacic i sar., 2009b), pri čemu je izlaganje Retzius-ovih neurona supstancijama trajalo tri minuta. Kako je pokazano da veće koncentracije DL-2,4-DABA, pod ovim uslovima, dovode do izostanka funkcionalnog oporavka ćelija, odlučili smo da ispitamo da li skraćenje vremena izlaganja Retzius-ovih neurona dovodi do povećanja učestalosti njihovog oporavka. Za ovo ispitivanje, opredelili smo se za primenu  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA. Prema našem iskustvu, depolarizacija membranskog potencijala koju je izazivalo  $10^{-2}$  mol/L DL-2,4-DABA bila je toliko jaka, da skraćenje vremena izlaganja supstanciji nije imalo izgleda da poboljša oporavak neurona.

Primena  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA tokom jednog minuta izazvala je depolarizaciju membranskog potencijala Retzius-ovih neurona koja je imala dve faze, pri čemu ni jedna od njih nije bila statistički značajno različita od učinka kojeg je donosilo trominutno izlaganje istoj koncentraciji ove aminokiseline (Tabela 4., Slika 9.). Na Slici 9. koja pokazuje jednominutnu primenu DL-2,4-DABA mogu se uočiti pomenute faze depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovog neurona, kao i depolarizacioni blok koji se javljao u približno istom vremenskom periodu kao i pri aplikaciji supstancije tokom tri minuta. Ispiranjem Retzius-ovih neurona nakon njihovog jednominutnog izlaganja DL-2,4-DABA, zapažen je veoma brz i potpun funkcionalni oporavak svih ćelija, koje su stabilizovale svoju električnu aktivnost kroz pet minuta nakon ispiranja.

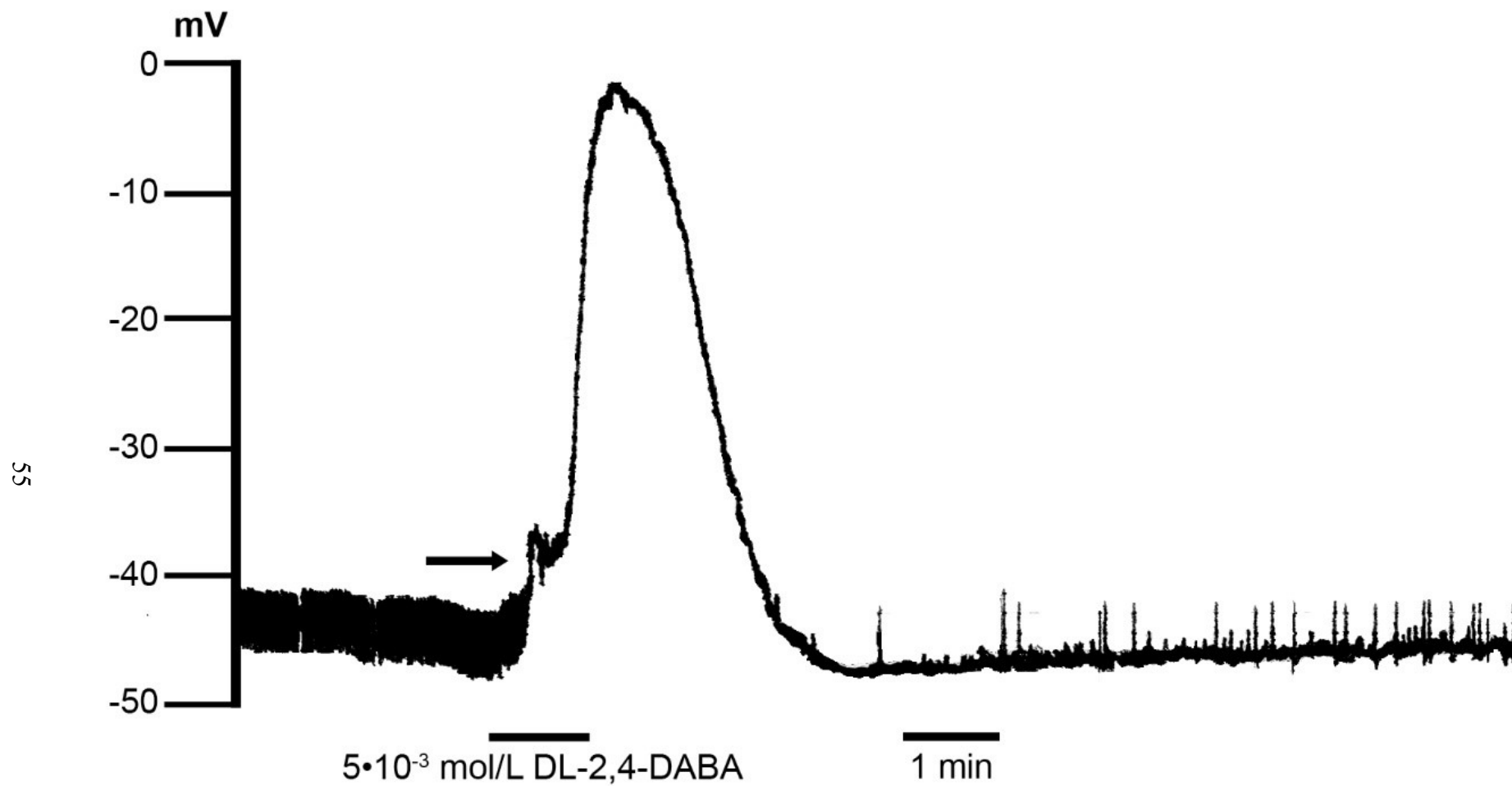
#### **4.5 Poređenje dejstava DL-2,4-DABA i L-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona**

Ranije su pomenuta istraživanja u kojima je prisustvo DABA zabeleženo u velikom broju vodenih ekosistema, zemljištu i vazduhu, kao i u suplementima ishrani, a jedan od najznačajnijih izvora ove aminokiseline su cijanobakterije. U većini ovih studija, posebno u uzorkovanim ili kultivisanim cijanobakterijama, češće je detektovana L-2,4-DABA od DL-2,4-DABA. Takođe, zapaženo je da L- i D- izomeri DABA pokazuju izvesne razlike u kinetici i neurotoksičnom potencijalu (Chen i sar., 1972). Stoga smo odlučili da uporedno ispitamo elektrofiziološke učinke L-2,4-DABA i DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona.

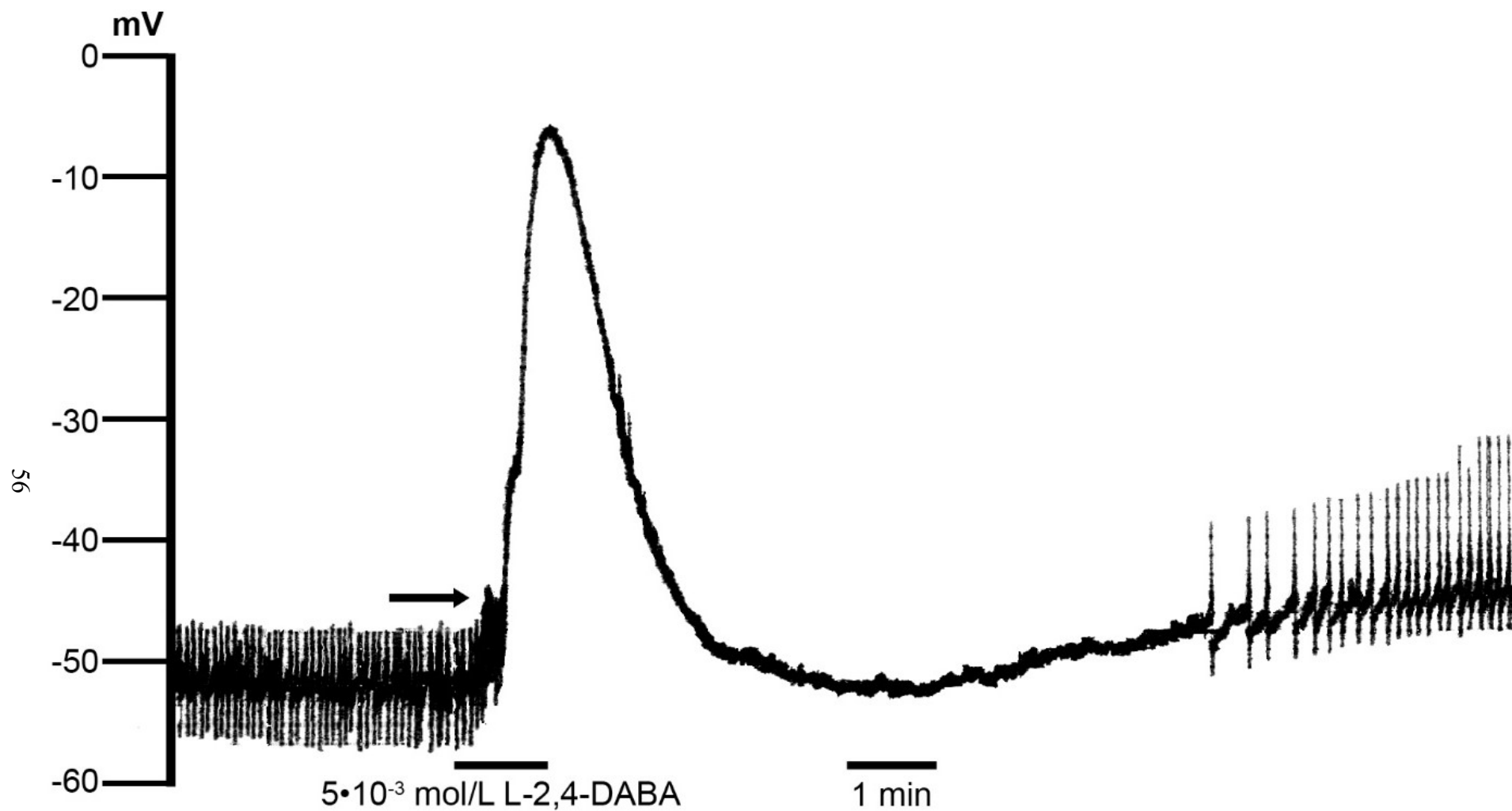
Primenjivane su koncentracije od  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L L-2,4-DABA, odnosno DL-2,4-DABA, pošto je ovo koncentracija supstancije za koju je pokazano da dovodi do izražene depolarizacije membranskog potencijala, koja je prevazilazila amplitudu od 30 mV (Tabela 1., Slika 6.), čime se razlikuje od drugih ekscitatornih aminokiselina. Takođe, skraćenje vremena izlaganja izomerima DABA na jedan minut, omogućavalo je potpun funkcionalni oporavak Retzius-ovih neurona nakon uklanjanja istih. Potpuni funkcionalni oporavak neurona iskoristili smo da primenimo oba izomera na istoj ćeliji zaredom. Kako bismo izbegli mogućnost uticaja uzastopnih aplikacija 2,4-DABA na rezultate (pojačanje ili smanjenje dejstva izoforme koja se naknadno primenjuje), naizmenično je menjan redosled izlaganja Retzius-ovog neurona izomerima 2,4-DABA – u nekim eksperimentima prvo je primenjena L-2,4-DABA, a u nekim DL-2,4-DABA. Dodatno, nakon inicijalne jednogminutne primene jedne izoforme, ispiranja i potpunog funkcionalnog oporavka neurona, naknadna primena drugog izomera vršena je tek nakon dvadeset minuta stabilne električne aktivnosti ćelije.

Rezultati eksperimenata sumirani su u Tabeli 4.

Primenom  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L L-2,4-DABA tokom jednog minuta javila se visoko statistički značajna depolarizacija membranskog potencijala sa  $-48,31 \pm 2,34$  mV za  $38,64 \pm 3,57$  mV ( $p < 0,01$ ,  $n=7$ ). Pored depolarizacije, prilikom početka primene ove aminokiseline došlo je do ubrzanja frekvencije akcionih potencijala, a potom i prestanka spontane električne aktivnosti ćelija – depolarizacionog bloka tokom primene ove izoforme 2,4-DABA. Takođe, L-2,4-DABA dovela je do pojave depolarizacije membranskog potencijala u dve faze, pri čemu vrednosti amplituda depolarizacija u pomenutim fazama nisu bile statistički značajno različite u odnosu na dejstvo DL – izomera (Tabela 4., Slike 9. i 10.).



**Slika 9.** Dejstvo  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na mirovni membranski potencijal i električnu aktivnost Retzius-ovog neurona tokom jednogminutnog izlaganja ćelije. Strelica označava prvu fazu depolarizacije membranskog potencijala.



**Slika 10.** Dejstvo  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L L-2,4-DABA na mirovni membranski potencijal i električnu aktivnost Retzius-ovog neurona tokom jednogminutnog izlaganja ćelije. Strelica označava prvu fazu depolarizacije membranskog potencijala.



**Tabela 4.** Poređenje promena membranskog potencijala Retzius-ovih neurona pijavice uzrokovanih jednominutnom primenom  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA i L-2,4-DABA.

Supstancija	MMP (mV)	I faza (mV)	II faza (mV)	<i>n</i>
DL-2,4-DABA	$-47,82 \pm 3,27$	$7,91 \pm 0,81$ ( $p^* > 0,05$ )	$39,63 \pm 2,22$ ( $p^* > 0,05$ )	8
L-2,4-DABA	$-48,31 \pm 2,34$	$8,69 \pm 1,49$ ( $p^{**} > 0,05$ )	$38,64 \pm 3,57$ ( $p^{**} > 0,05$ )	7

Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška merenja, MMP – mirovni membranski potencijal, I faza – prva faza depolarizacije, II faza – druga faza depolarizacije (kompletna depolarizacija), DL-2,4-DABA – DL-2,4-diaminobuterna kiselina, L-2,4-DABA – L-2,4-diaminobuterna kiselina,  $p^*$  - značajnost razlike t-testa u odnosu na primenu DL-2,4-DABA tokom 3 minuta,  $p^{**}$  - značajnost razlike t-testa u odnosu na primenu DL-2,4-DABA tokom 1 minuta,  $n$  – broj jedinica posmatranja.

#### **4.6 Dejstvo DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona u izmenjenim jonskim uslovima**

Pošto su prethodni rezultati pokazali da je 2,4-DABA ekscitatorna aminokiselina i da se javlja izražena depolarizacija membranskog potencijala, sledeću seriju oglada izveli smo sa ciljem da izučimo mehanizme ovog dejstva. Dostupni literaturni podaci ukazuju da je direktni učinak ove aminokiseline na ćelije posredovan aktivacijom jonotropnih glutamatnih receptora (iGluR) i transportnog sistema A za neutralne aminokiseline (TSA), koji, iako različiti, zavise od prisustva jona natrijuma. Stoga smo ispitivali uticaj izmenjenih jonskih uslova na ekscitatorni učinak 2,4-DABA na Retzius-ovima neuronima.

Izmena jonskih uslova podrazumevala je zamenu jona natrijuma TRIS(hidroksimetil)aminometan-hloridom (TRIS), te je standardni Ringerov rastvor za pijavice bio modifikovan (videti poglavlje Materijal i metode) i nazvan je TRIS – Ringerov rastvor. TRIS – Ringerov rastvor je po svim karakteristikama odgovarao standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice, s tim što TRIS, zbog svoje veličine, nije mogao da prođe kroz kanale za natrijumove jone.

Budući da, prema našim saznanjima, ne postoje podaci o elektrofiziološkim ispitivanjima učinaka 2,4-DABA u sredini lišenoj jona natrijuma, praćen je eksperimentalni protokol koji je u našoj laboratoriji korišćen za druge, ranije ispitivane sredinske ekscitatorne aminokiseline (Cemerikic i sar., 2001). U našim eksperimentima ispitivan je uticaj  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona u TRIS – Ringerovom rastvoru, a rezultati su poređeni sa učinkom ove aminokiseline u standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice na istoj ćeliji. Ovim pristupom se

mogla istražiti zavisnost dejstva 2,4-DABA od jona natrijuma. Retzius-ovi neuroni su izlagani  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, tokom jednog minuta, pošto prethodni rezultati pokazuju da je ova koncentracija aminokiseline dovodila do izražene depolarizacije membranskog potencijala i da su ćelije dobro podnosile njenu jednominutnu primenu. Ranija istraživanja na ovom modelu pokazala su da TRIS ne oštećuje Retzius-ove neurone (Lopičić, 2004).

Rezultati eksperimenata sumirani su u Tabeli 5.

**Tabela 5.** Poređenje dejstva  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona tokom jednominutnog izlaganja u TRIS – Ringerovom i standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice

Rastvor	Membranski potencijal (mV)		Maksimalna depolarizacija (mV)	n
	Mirovni	DL-2,4-DABA		
TRIS-Ringer	$-61,80 \pm 4,60$ ( $p^{\#} < 0,01$ )	$-58,53 \pm 4,16$ ( $p < 0,01$ )	$3,26 \pm 0,62$ ( $p < 0,01$ )	6
standardni Ringer	$-51,34 \pm 4,39$	$-9,87 \pm 3,14$	$41,47 \pm 2,89$	5

Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška merenja, DL-2,4-DABA – DL-2,4-diaminobuterna kiselina,  $p^{\#}$  - značajnost razlike t-testa u odnosu na mirovni membranski potencijal u standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice,  $p$  - značajnost razlike t-testa u odnosu na jednominutnu primenu DL-2,4-DABA u standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice,  $n$  – broj jedinica posmatranja.

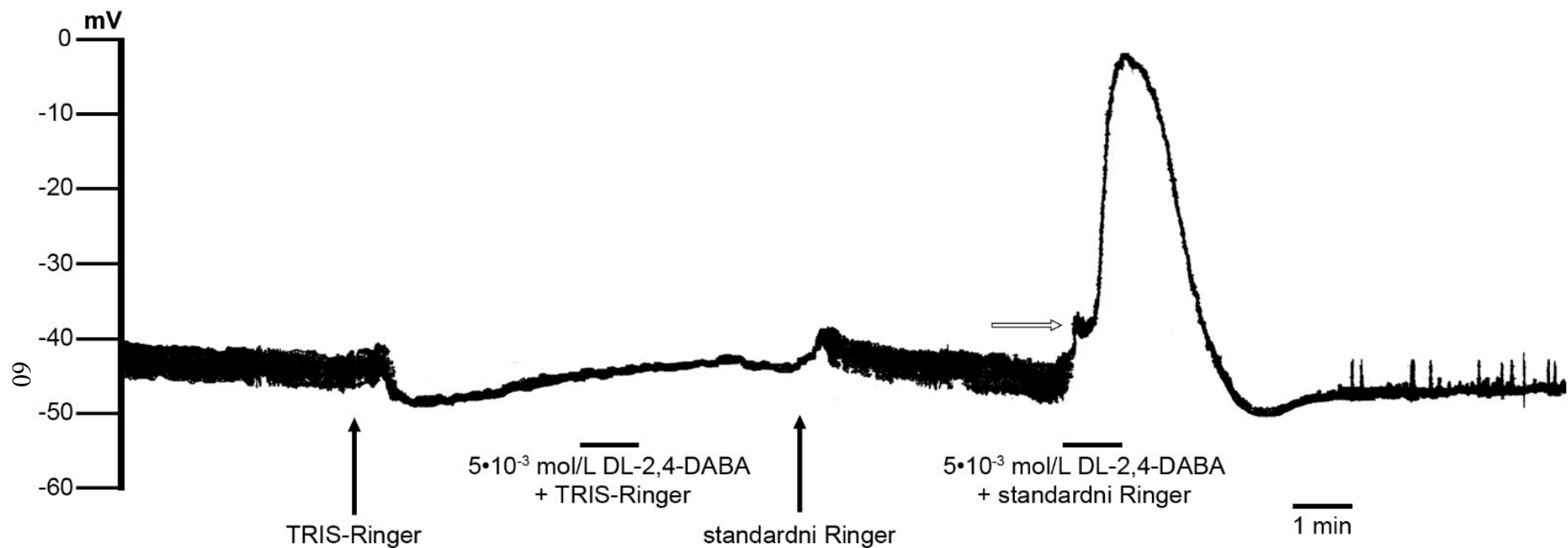
Nakon penetracije Retzius-ovog neurona i stabilizacije zapisa električne aktivnosti ćelije u standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice, sadržaj eksperimentalne komore zamenjen je TRIS-Ringerovim rastvorom. Kao što se može videti na Slici 11., primena TRIS-Ringerovog rastvora u prvih dva minuta izazvala je blagu, ali visoko statistički značajnu hiperpolarizaciju mirovnog membranskog potencijala od  $-53,80 \pm 3,87$  mV za  $8,00 \pm 1,86$  mV na  $-61,80 \pm 4,60$  mV ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ), kao i gubitak spontanog izbijanja akcionih potencijala Retzius-ovih neurona. Ovakva reakcija Retzius-ovih neurona predstavlja uobičajen odgovor ćelija na odsustvo jona natrijuma u rastvoru, koji je ranije opisan i objašnjen (James i sar., 1979; Mat Jais i sar., 1984; Cemerikic i sar., 1988; Cemerikic i sar., 2001).

Po uspostavljanju konstantne vrednosti mirovnog membranskog potencijala u TRIS-Ringerovom rastvoru, odnosno prilagođavanju ćelije sredini bez natrijumovih jona, primenjeno je  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA rastvorene u TRIS-Ringerovom rastvoru, tokom jednog minuta. Ovo

je izazvalo diskrentu, ali visoko statistički značajnu depolarizaciju membranskog potencijala od  $3,26 \pm 0,62$  mV ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ), bez pojave akcionih potencijala. Ova mala depolarizacija nije pokazala dvofaznu prirodu i brzo se gubila još tokom primene supstancije.

Nakon jednogminutne primene  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA sadržaj komore bio je zamenjen svežim TRIS-Ringerovim rastvorom. Čeliji je dozvoljeno da se prilagodi ovoj zameni rastvora i potpuno oporavi tokom tri minuta, a zatim je eksperimentalna komora isprana standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice. Pri izmeni TRIS-Ringerovog rastvora standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice javilo se povećanje vrednosti mirovnog membranskog potencijala neurona na  $-51,34 \pm 4,39$  mV i ponovo je uspostavljena spontana električna aktivnost ćelije. Nakon trominutne stabilizacije neurona u standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice, primenjeno je  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA rastvorene u standardnom Ringerovom rastvoru tokom jednog minuta. Kao i u ranije pomenutim eksperimentima, javila se depolarizacija membranskog potencijala Retzius-ovih neurona koja se razvijala kroz dve faze. Amplituda prve faze depolarizacije iznosila  $9,68 \pm 0,30$  mV, dok je jačina druge faze, odnosno kompletne depolarizacije bila  $41,47 \pm 2,89$  mV. Nakon uklanjanja supstancije javila se karakteristična prolazna hiperpolarizacija praćena potpunim oporavkom ćelije.

Rezultati ispitivanja uticaja izmenjenih jonskih uslova na učinak  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na Retzius-ovim neuronima pokazali su da je jačina depolarizacije membranskog potencijala ćelija uzrokovana ovom aminokiselinom u odsustvu jona natrijuma bila statistički značajno snižena za 91% ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ , Tabela 5.). Takođe, uočeno je i odsustvo dvofazne depolarizacije, karakterističnog odgovora Retzius-ovih neurona na 2,4-DABA u standardnom Ringerovom rastvoru koji sadrži jone natrijuma. Ovo bi moglo potvrditi našu pretpostavku da 2,4-DABA dovodi do depolarizacije koja se razvija kroz dve faze zahvaljujući aktivaciji non-NMDA glutamatnih receptora propustljivih za jone natrijuma, ali i natrijum-zavisnog transportnog sistema za neutralne aminokiseline, za koji se smatra da služi kao kotransporter jona natrijuma i 2,4-DABA u ćelije.



**Slika 11.** Dejstvo  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovog neurona tokom jednog minute primene u TRIS-Ringerovom rastvoru i standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice. Crne strelice pokazuju početak primene TRIS-Ringerovog rastvora i ispiranje standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice. Bela strelica pokazuje prvu fazu depolarizacije membranskog potencijala ćelije.

#### 4.7 Uticaj DL-2,4-DABA na ulazni otpor membrane Retzius-ovih neurona

Dosadašnji rezultati pokazali su da sve koncentracije DL-2,4-DABA imaju sposobnost da u znatnoj meri menjaju membranski potencijal neurona, odnosno izazivaju depolarizaciju. U fiziološkim uslovima, membrana pruža određen otpor prolasku struje, a taj otpor se smanjuje kada se jonski kanali ćelijske membrane otvore. Ovaj otpor predstavlja ulazni otpor membrane (UOM). Na ulazni otpor membrane Retzius-ovih neurona izloženih 2,4-DABA trebalo bi da utiče pretpostavljena aktivacija kako jonotropnih glutamatnih receptora (iGluR), tako i natrijum-zavisnog elektrogenog transportnog sistema za neutralne aminokiseline (TSA).

Stoga smo posmatrali vrednosti ulaznog otpora membrane u nekoliko ključnih trenutaka – pre primene DL-2,4-DABA, tokom primene DL-2,4-DABA kada je postignuta kompletna depolarizacija membranskog potencijala Retziusovog neurona i nakon ispiranja Retzius-ovog neurona, odnosno nakon uklanjanja DL-2,4-DABA. Vrednosti UOM izračunavane su na osnovu Jednačine 1., registrovanog napona membrane Retzius-ovih neurona i jačine struje nametnute tehnikom strujnog uklještenja (engl. *current-clamp*).

Rezultati eksperimenata su sumirani u Tabeli 6.

**Tabela 6.** Uticaj  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na ulazni otpor membrane Retzius-ovih neurona tokom jednominutnog izlaganja ćelije

Kontrolni UOM pre primene DL-2,4-DABA (MΩ)	UOM u toku primene DL-2,4-DABA (MΩ)	UOM po uklanjanju DL-2,4-DABA (MΩ)	Smanjenje UOM tokom primene DL-24-DABA (MΩ)	<i>p</i>	<i>n</i>
12,23 ± 1,24	3,96 ± 0,92	10,19 ± 2,02	8,27 ± 1,47	< 0,01	6

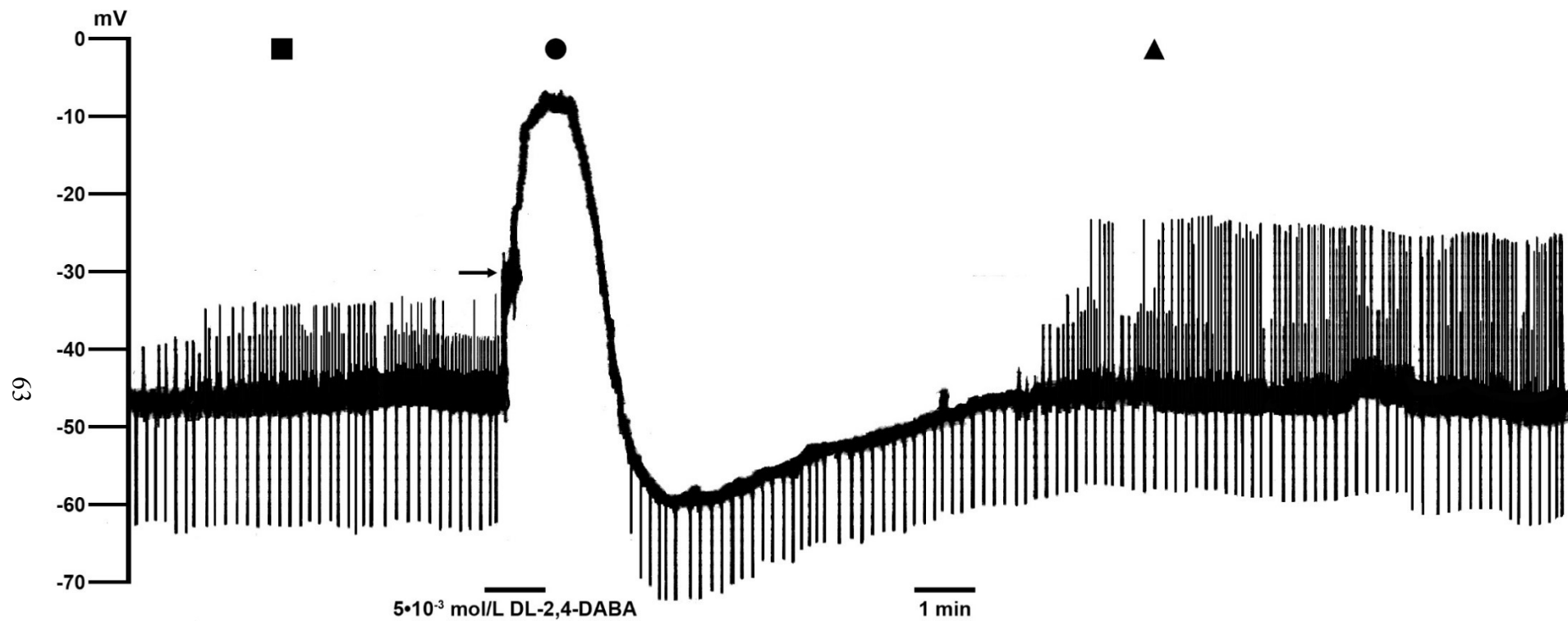
Podaci prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška merenja, UOM – ulazni otpor membrane, DL-2,4-DABA – DL-2,4-diaminobuterna kiselina, *p* - značajnost razlike t-testa u odnosu na ulazni otpor membrane pre primene DL-2,4-DABA, *n* – broj jedinica posmatranja.

Ulazni otpor membrane Retzius-ovog neurona pre primene DL-2,4-DABA iznosio je  $12,23 \pm 1,24$  MΩ. Vrednosti UOM Retzius-ovih neurona u mirovanju u eksperimentima slagali su se sa literaturnim podacima (Sawyer, 1986). Relativno velike vrednosti ulaznog otpora membrane Retzius-ovih neurona tokom pojedinih faza eksperimenata ukazivale su na činjenicu da je oštećenje ćelijske membrane prilikom njene penetracije elektrodom za registrovanje bilo zanemarljivo.

Tokom jednogminutne primene  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, pri najizraženijem depolarišućem učinku, vrednost UOM neurona bila je statistički značajno smanjena za  $8,27 \pm 1,47$  M $\Omega$ , odnosno za 67,60 % i iznosila je  $3,96 \pm 0,92$  M $\Omega$  ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ , Tabela 6.). Nakon ispiranja eksperimentalne komore standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice, vrednost ulaznog otpora membrane brzo i potpuno se vratila onim koje odgovaraju ćeliji u mirovanju, odnosno pre primene aminokiseline.

Uticaoj  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na UOM Retzius-ovih neurona potvrđuju i uporedni zapisi dobijeni tokom eksperimenata zabeleženi na mehaničkom pisacu (Slika 12.) i na termo-štampanju osciloskopa (Slika 13.).

Na Slici 12. prikazan je zapis mehaničkog pisaca. Na ovom zapisu mogu se zapaziti negativni otkloni od membranskog potencijala, koji predstavljaju naponski odgovor membrane Retzius-ovog neurona na hiperpolarisuje strujne pulseve stimulatora. Ovi hiperpolarisujuci otkloni bili su jednakog intenziteta pre primene DL-2,4-DABA, kao što se može videti na zapisu (deo zapisa obeležen kvadratom na Slici 12.). Tokom jednogminutne primene  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA uočavalo se progresivno smanjenje amplitude ovih otklona, a potom i njihov privremeni nestanak koji se poklapao sa pojavom depolarizacionog bloka, odnosno prestankom spontane električne aktivnosti neurona. Najniže vrednosti ulaznog otpora membrane Retzius-ovih neurona postignute su u toku maksimalnog učinka i kompletne depolarizacije membrane izazvane DL-2,4-DABA (deo zapisa obeležen krugom na Slici 12.). Jedan minut po uklanjanju ove aminokiseline ispiranjem ćelija standardnim Ringerovim rastvorom, ponovo su se javljali progresivno jači hiperpolarisujuci otkloni, koji su nakon oporavka ćelije postizali amplitude jednake onim na početku eksperimenta (deo zapisa obeležen trouglom na Slici 12.).



**Slika 12.** Promena ulaznog otpora direktno polarizovane membrane Retzius-ovog neurona, zabeleženo mehaničkim pisačem. (■) pre primene DL-2,4-DABA; (●) tokom maksimalnog učinka  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA; (▲) nakon uklanjanja DL-2,4-DABA ispiranjem i oporavka neurona. Strelica pokazuje prvu fazu depolarizacije.

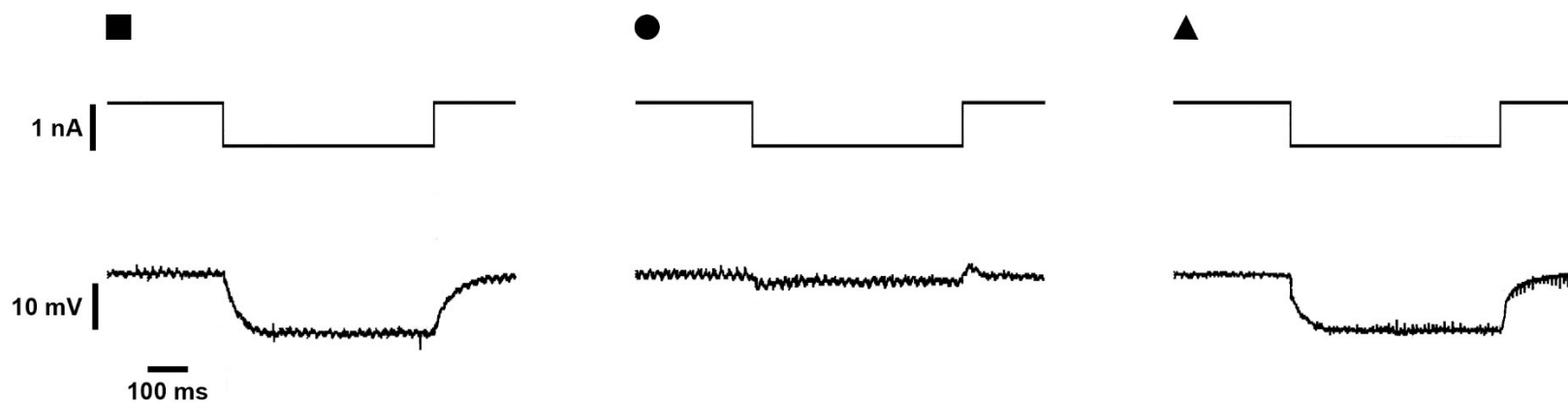
Zbog mehaničkih ograničenja pisaača za preciznije merenje voltažnog odgovora ćelija, košićene su registracije zabeležene pomoću termo-štampača, vezanog za osciloskop. Na Slici 13. prikazana su tri snimka, koja prikazuju efekte draženja Retzius-ovog neurona koji se nalazi: u standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice, pre primene supstancije (deo zapisa obeležen kvadratom); u rastvoru  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA, prilikom dostizanja maksimalne depolarizacije membranskog potencijala (deo zapisa obeležen krugom) i u standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice nakon ukljanjanja supstancije i oporavka ćelije (deo zapisa obeležen trouglom). Sliku 13. sačinjavaju dva zapisa. Gornji zapis predstavlja strujni hiperpolarišući impuls draženja, a donji zapis registrovan membranski potencijal neurona kao odgovor na draženje. Zapis membranskog potencijala nema pravougaoni oblik kao strujni impulsi draženja. Karakterističan oblik zapisa odgovora membrane, tj. promene membranskog potencijala prilikom draženja, posledica je električnih osobina membrane. Pošto membrana neurona u električnom smislu predstavlja kondenzator i otpornik vezane paralelno, protok struje kroz membranu te zapis promene njenog potencijala u sebi sadrže i kapacitativnu komponentu, zbog čega on odstupa od oblika impulsa struje draženja.

Sa gornjeg zapisa Slike 13. se može videti da tokom eksperimenta nije menjana jačina struje draženja, pa se zaključuje da su promene u registrovanom potencijalu membrane posledica dejstva  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA. Posmatranjem donjeg zapisa na istoj slici uočeno je da je prilikom delovanja DL-2,4-DABA promena membranskog potencijala uzrokovana strujom draženja bila daleko manja nego u standardnom Ringerovom rastvoru pre primene ove aminokiseline. Nakon ukljanjanja supstancije zapaženo je da se potencijal membrane vraća na prvobitnu vrednost. Pošto vrednost UOM pri konstantnoj jačini struje draženja direktno proporcionalno odgovara veličini promene potencijala (Jednačina 1.), jasno je da pri dejstvu DL-2,4-DABA dolazi do smanjenja ulaznog otpora membrane.

Rezultati ovih eksperimenata govore u prilog pretpostavci da 2,4-DABA smanjuje UOM, odnosno da membrana Retzius-ovih neurona postaje permeabilnija. Literaturni podaci ukazuju da su mogući uzroci povećanja permeabilnosti membrane pod dejstvom 2,4-DABA aktivacija jonotropnih glutamatnih receptora (iGluR) i/ili natrijum-zavisnog elektrogenog transportnog sistema za neutralne aminokiseline.

Stoga smo u daljim eksperimentima ispitivali uticaj specifičnih blokatora non-NMDA glutamatnih receptora ili natrijum-zavisnog transportnog sistema za neutralne aminokiseline na ekscitatorno dejstvo 2,4-DABA na Retzius-ovim nervnim ćelijama.





**Slika 13.** Promena ulaznog otpora direktno polarizovane membrane Retzius-ovog neurona, zabeleženo termo-štampanjem osciloskopa pre primene DL-2,4-DABA (■), tokom maksimalnog učinka  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA (●) i nakon uklanjanja DL-2,4-DABA ispiranjem i oporavka neurona (▲). Na svim registracijama gornji zapis predstavlja struju draženja, a donji zapis rezultujuću promenu napona.

#### **4.8 Uticaj blokatora non-NMDA jonotropnih glutamatnih receptora CNQX na promenu membranskog potencijala uzrokovanu primenom DL-2,4-DABA**

Do sada prikazani rezultati pokazali su ekscitatornu prirodu dejstva DL-2,4-DABA, čiji mehanizam najverovatnije leži u povećanju propustljivosti membrane Retzius-ovih neurona za jone natrijuma. Učinak DL-2,4-DABA na membranski potencijal ćelija je jedinstven zbog postojanja dvofazne prirode depolarizacije. Takođe, zapaženo je podudaranje teorijske vrednosti amplitude prve faze depolarizacije membranskog potencijala izazvane 2,4-DABA sa maksimalnim teorijskim vrednostima ekscitatornog učinka glutamata, aspartata, BMAA i BOAA na membranski potencijal neurona, za koje se pretpostavlja da deluju aktivacijom non-NMDA glutamatnih receptora (Tabela 3.). Oslanjajući se na rezultate prethodnih eksperimenata, pretpostavljeno je da DL-2,4-DABA dovodi do prve faze depolarizacije membrane aktivirajući jonotropne glutamatne receptore non-NMDA tipa. Stoga je ispitan učinak antagoniste ovih receptora, 6-cijano-7-nitrokvinoxalin-2,3-diona (CNQX) na vrednosti depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona izazvane  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA. Antagonista non-NMDA receptora je korišćen pošto su ranija istraživanja pokazala da N-metil-D-aspartat (NMDA) pokazuje vrlo slabe efekte na membranski potencijal Retzius-ovih neurona ili čak ne dovodi do njihove pojave. Takođe, pokazano je da na ovim ćelijama postoji izraženo prisustvo non-NMDA receptora (James i sar., 1980b; Dorner i sar., 1990; Dorner i sar., 1994). Koristili smo  $10^{-5}$  mol/L CNQX, budući da je to koncentracija koja je u prethodnim ogledima u našoj laboratoriji pokazala adekvatan antagonistički učinak (Lopicic i sar., 2009a; Lopicic i sar., 2009b).

U eksperimentima isti Retzius-ovi neuroni uzastopno su izlagani  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA sa  $10^{-5}$  mol/L CNQX tokom jednog minuta i  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA samostalno u istom trajanju. Kako bismo izbegli mogućnost uticaja uzastopnih aplikacija 2,4-DABA na rezultate (pojačanje ili smanjenje dejstva naknadno primenjene supstancije), naizmenično je menjan redosled izlaganja Retzius-ovih neurona supstancijama. U nekim eksperimentima prvo su primenjivani DL-2,4-DABA i CNQX, pa potom samostalno DL-2,4-DABA, a u nekim je redosled primene bio obratan. Dodatno, nakon inicijalne jednogminutne primene supstancije ili mešavine supstancija, ispiranja i potpunog funkcionalnog oporavka neurona, naknadna primena vršena je tek nakon deset minuta stabilne električne aktivnosti ćelije.

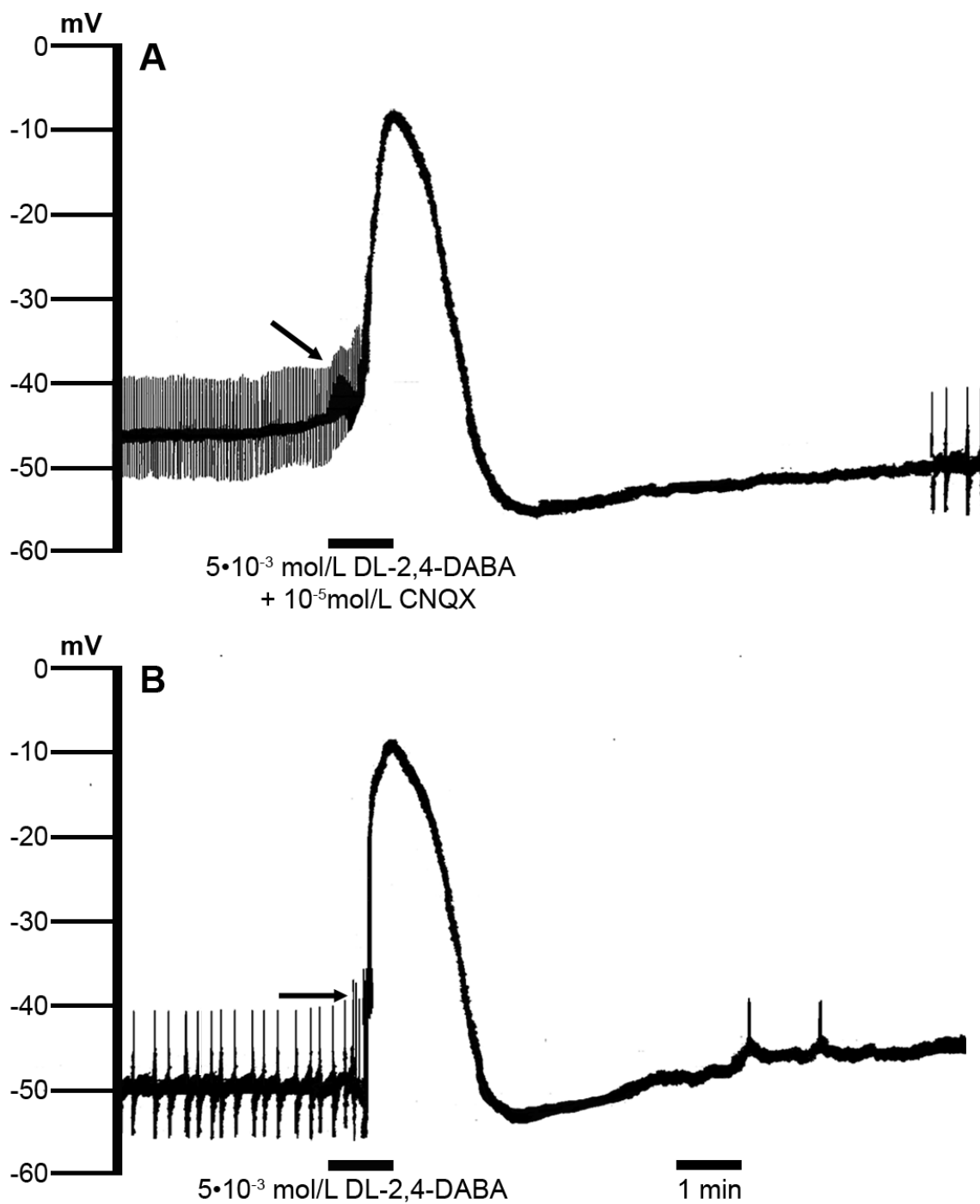
Rezultati ovih eksperimenata sumirani su u Tabeli 7.

**Tabela 7.** Dejstvo  $10^{-3}$  mol/L CNQX na depolarizaciju membranskog potencijala izazvanu  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA tokom jednogminutnog izlaganja neurona

Supstancije (mol/L)	MMP (mV)	Depolarizacija (mV)		<i>n</i>
		I faza	II faza	
$5 \cdot 10^{-3}$ DL-2,4-DABA	$-57,87 \pm 5,08$	$6,65 \pm 1,58$	$37,96 \pm 7,83$	6
$5 \cdot 10^{-3}$ DL-2,4-DABA + $10^{-5}$ CNQX	$-56,28 \pm 5,42$	$4,05 \pm 1,53$ ( $p < 0,05$ )	$33,46 \pm 6,45$ ( $p > 0,05$ )	6

Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška merenja, DL-2,4-DABA – DL-2,4-diaminobuterna kiselina, CNQX – 6-cijano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion, MMP – mirovni membranski potencijal, I faza – prva faza depolarizacije, II faza – druga faza depolarizacije (kompletna depolarizacija), *p* - značajnost razlike t-testa u odnosu na primenu DL-2,4-DABA samostalno, *n* – broj jedinica posmatranja.

Primena  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA samostalno izazivala je izraženu depolarizaciju membranskog potencijala koja se razvijala kroz dve faze, pri čemu je amplituda prve faze depolarizacije iznosila  $6,65 \pm 1,58$  mV, a jačina druge faze  $37,96 \pm 7,83$  mV. U prisustvu  $10^{-5}$  mol/L CNQX,  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA takođe je izazivala dvofaznu depolarizaciju, pri čemu je jačina prve faze depolarizacije membranskog potencijala iznosila  $4,05 \pm 1,53$  mV (Slika 14.A), te bila niža u odnosu na amplitudu inicijalne faze depolarizacije izazvane primenom  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA (Slika 14.B). Antagonist non-NMDA glutamatnih receptora, CNQX značajno je umanjio amplitudu prve faze depolarizacije membranskog potencijala izazvane DL-2,4-DABA za  $2,59 \pm 0,98$  mV, odnosno za 40% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ), ali nije ispoljavao statistički značajan učinak na kompletnu depolarizaciju membrane ćelija ( $p > 0,05$ ,  $n=6$ ). Na Slici 14. može se videti da se spontana električna aktivnost Retzius-ovih neurona i u prisustvu CNQX gasila ubrzo nakon prve faze depolarizacije membrane. Takođe, po ispiranju eksperimentalne komore standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice, odnosno nakon uklanjanja DL-2,4-DABA i CNQX (Slika 14.A) ili DL-2,4-DABA (Slika 14.B) javljala se prolazna hiperpolarizacija nakon koje su se postepeno ćelije funkcionalno oporavljale.



**Slika 14.** Dejstvo  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona tokom jednogminutne primene u prisustvu  $10^{-5}$  mol/L CNQX (A) i bez  $10^{-5}$  mol/L CNQX (B). Za obe traseje važi ista vremenska baza. Strelica ukazuje na prvu fazu depolarizacije.

#### **4.9 Uticaj kompetitivnog inhibitora transportnog sistema A (TSA), L-alanina na promenu membranskog potencijala uzrokovanu primenom DL-2,4-DABA**

Upadljivo umanjeno depolarizujuće dejstvo  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovog neurona, kada se primenjuje u rastvoru u kom nema jona natrijuma (TRIS-Ringerov rastvor), ukazuje na njihovu značajnu ulogu u mehanizmu ekscitatornog dejstva ove sredinske aminokiseline. Poredeći učinak 2,4-DABA sa efektima drugih endogenih i sredinskih ekscitatornih aminokiselina ispitivanih na našem modelu, uviđa se da 2,4-DABA ima najjači efekat na membranski potencijal neurona. Amplitude prve faze depolarizacije membranskog potencijala, izazvane 2,4-DABA, poklapaju se sa izračunatim maksimalnim vrednostima depolarizacija za druge ispitivane aminokiseline, najverovatnije posredovanih aktivacijom non-NMDA glutamatnih receptora. Iz ovih rezultata nameće se pretpostavka da za postizanje druge faze depolarizacije membranskog potencijala, odnosno pun efekat na membranski potencijal Retzius-ovih neurona, 2,4-DABA angažuje dodatni mehanizam. Stoga je ispitivana uloga natrijum-zavisnog transportnog sistema za neutralne aminokiseline (TSA) u depolarizaciji membrane koju izaziva 2,4-DABA.

Natrijum-zavisni transporter za male neutralne aminokiseline pripada SLC38 familiji transportera koji su očuvani u svim živim organizmima (Zhang i sar., 2009). Prisustvo pomenutog transportnog sistema potvrđeno je u različitim vrstama člankovitih glista (Preston i sar., 2015). Aktivacija ovog transportera omogućava ulazak neutralnih aminokiselina i jona natrijuma u ćelije (Reimer i sar., 2000), što dovodi do depolarizacije ćelijske membrane i objašnjava elektrogenu prirodu ovog transportera.

Kako bi se blokirala aktivacija ovog transportera, korišćen je njegov kompetitivni inhibitor L-alanin. Iako je N-metil- $\alpha$ -aminoizobutirat (MeAIB) daleko poznatiji kompetitivni inhibitor transportnog sistema A, izbor L-alanina za naše eksperimente leži u činjenici da MeAIB pokazuje slabu povezanost transporta i promena električne aktivnosti membrana koje ovaj transporter poseduju (Reimer i sar., 2000). Takođe, u literaturi se sve češće pominje potreba za ponovnom procenom pogodnosti MeAIB kao supstrata za TSA (Mackenzie i sar., 2003; Mackenzie i sar., 2004). U našim eksperimentima, Retzius-ovi neuroni izlagani su istim koncentracijama L-alanina i DL-2,4-DABA, pošto se ovim pristupom omogućava podjednaka dostupnost supstancija transporteru (Ronquist i sar., 1980; Ronquist i sar., 1984).

Rezultati ovih eksperimenata sumirani su u Tabeli 8.

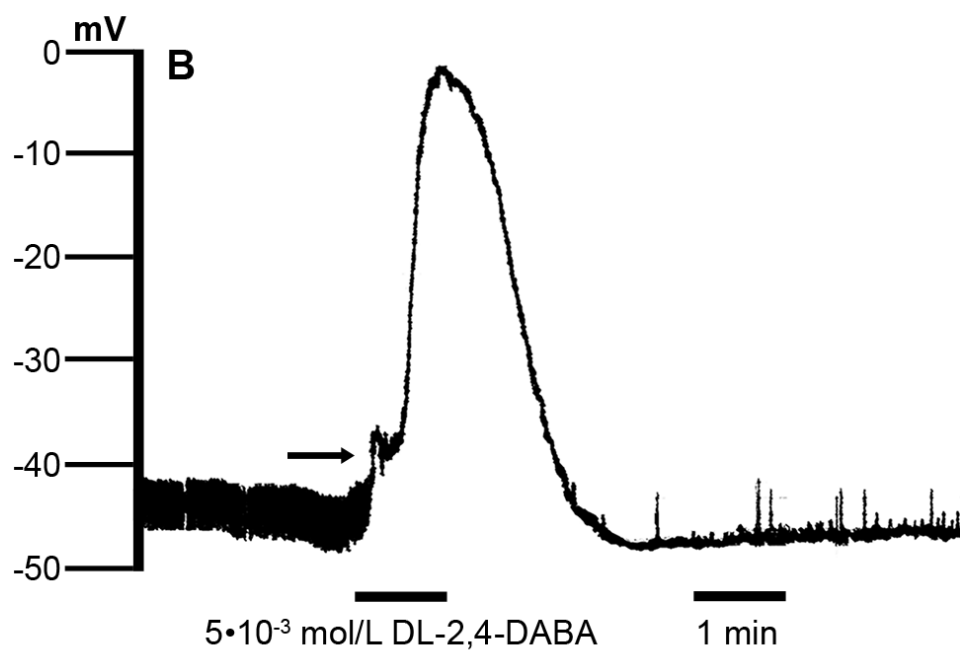
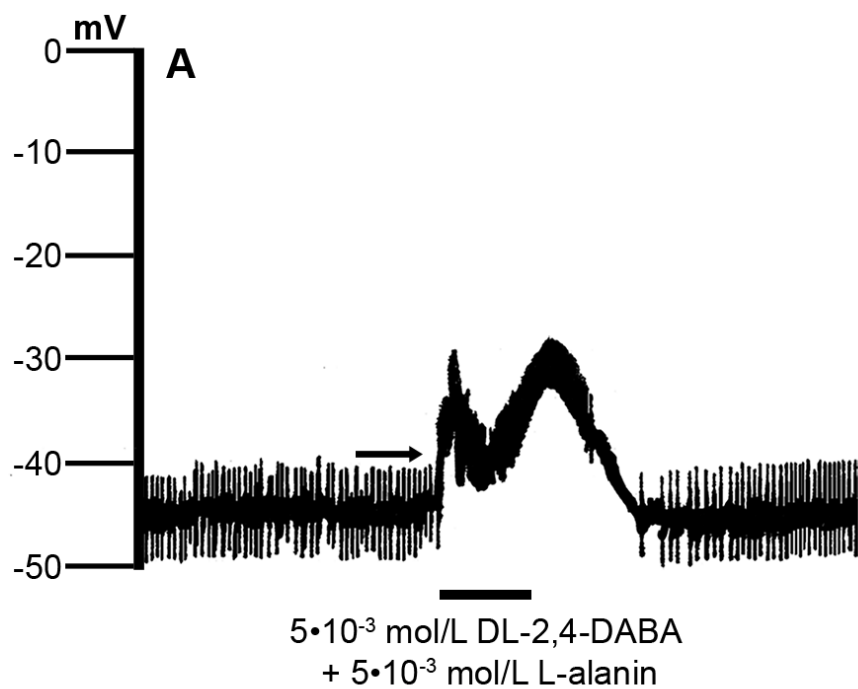
**Tabela 8.** Dejstvo  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L L-alanina na depolarizaciju membranskog potencijala izazvanu istom koncentracijom DL-2,4-DABA tokom jednogminutnog izlaganja neurona

Supstancije (mol/L)	MMP (mV)	Depolarizacija (mV)		<i>n</i>
		I faza	II faza	
$5 \cdot 10^{-3}$ DL-2,4-DABA	$-47,82 \pm 3,27$	$7,91 \pm 0,81$	$39,63 \pm 2,22$	8
$5 \cdot 10^{-3}$ DL-2,4-DABA + $5 \cdot 10^{-3}$ L-alanin	$-57,50 \pm 5,19$	$10,26 \pm 1,51$ ( $p > 0,05$ )	$16,28 \pm 2,59$ ( $p < 0,01$ )	6

Podaci prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  standardna greška merenja, DL-2,4-DABA – DL-2,4-diaminobuterna kiselina, MMP – mirovni membranski potencijal, I faza – prva faza depolarizacije, II faza – druga faza depolarizacije (kompletna depolarizacija), *p* - značajnost razlike t-testa u odnosu na primenu DL-2,4-DABA samostalno, *n* – broj jedinica posmatranja.

Primena  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA i L-alanina tokom jednog minuta, izazvala je karakterističnu dvofaznu depolarizaciju membranskog potencijala Retzius-ovih neurona. L-alanin nije imao statistički značajan uticaj na amplitudu prve faze depolarizacije membrane ( $p > 0,05$ ,  $n=6$ ; Tabela 8., Slika 15.). Međutim, prisustvo L-alanina u rastvoru dovelo je do visoko statistički značajnog smanjenja amplitude druge faze depolarizacije membranskog potencijala izazvane DL-2,4-DABA sa  $39,63 \pm 2,22$  mV na  $16,28 \pm 2,58$  mV, odnosno za 58,92 % ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ; Tabela 8., Slika 15.).

Depolarizacioni blok, tokom druge faze depolarizacije Retzius-ovih neurona pri primeni  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA izostaje kada su ćelije bile izložene i L-alaninu. Spontana električna aktivnost neurona, odnosno sponatno izbijanje akcionih potencijala ćelija bilo je očuvano tokom konkomitantne primene DL-2,4-DABA i L-alanina, a primetno je i povećanje frekvencije izbijanja akcionih potencijala (Slika 15.A). Sa druge strane, samostalna primena DL-2,4-DABA dovodila do depolarizacionog bloka (Slika 15.B). Nakon ispiranja ćelija standardnim Ringerovim rastvorom za pijavice u oba slučaja, tj. nakon uklanjanja DL-2,4-DABA primenjene samostalno ili DL-2,4-DABA i L-alanina nastajala je diskretnija prolazna hiperpolarizacija membranskog potencijala i postepeni funkcionalni oporavak Retzius-ovih neurona (Slika 15.).



**Slika 15.** Dejstvo  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L DL-2,4-DABA na membranski potencijal Retzius-ovih neurona tokom jednogminutne primene u prisustvu  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L L-alanina (A) i bez  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L L-alanina (B). Za obe traseje važi ista vremenska baza. Strelica ukazuje na prvu fazu depolarizacije.





## 5. DISKUSIJA

2,4-diaminobuterna kiselina (2,4-DABA) je ekscitatorna, neurotoksična aminokiselina prisutna u svim sredinama, ali se njeno prisustvo najčešće vezuje za vodene ekosisteme. Ova aminokiselina predstavlja komponentu polimiksinskih antibiotika (Catch i sar., 1948) i ugrađuje se u ćelijski zid pojedinih bakterija (Perkins i sar., 1964). Prisustvo 2,4-DABA dokazano je u nekoliko vrsta biljke *Lathyrus sp.* (VanEtten i sar., 1963; Ressler, 1964), mozgu sisara (Nakajima i sar., 1967), cijanobakterijama (Kruger i sar., 2010), ljuskarima (Banack i sar., 2014), ribama, vodenim biljkama i vodenim rezervoarima (Al-Sammak i sar., 2014; Chatziefthimiou i sar., 2018). Takođe, ustanovljeno je da veliki broj navedenih vodenih organizama poseduje mogućnost bioakumulacije 2,4-DABA (Jonasson i sar., 2010; Reveillon i sar., 2015).

Ova ekscitatorna sredinska aminokiselina otkrivena je i u uzorcima zemljišta i vazduha u okolini vodenih površina poznatih po „cvetanju“ cijanobakterija (Banack i sar., 2015). Sa druge strane, pokazano je prisustvo 2,4-DABA u pustinjским pokoricama i zemljištu (Cox i sar., 2009; Metcalf i sar., 2015; Chatziefthimiou i sar., 2016). Ubikvitarnost cijanobakterija i pokazana povezanost cijanobakterija i neurotoksičnosti njihovih metaboličkih produkata za ljude i životinje (Li i sar., 2016; Main i sar., 2018) postavljaju 2,4-DABA u središte interesovanja.

Iako je izvedeno nekoliko *in vivo* i *in vitro* eksperimentalnih ispitivanja dejstva 2,4-DABA, uočava se nedostatak elektrofizioloških ispitivanja uticaja ove aminokiseline na neurone.

Ekscitatorno dejstvo 2,4-DABA pokazano u našim eksperimentima ogleda se u depolarizaciji membranskog potencijala, čija amplituda je bila zavisna od koncentracije aminokiseline kojoj su Retzius-ovi neuroni izlagani. Pokazan podražujući efekat 2,4-DABA na Retzius-ovim neuronima u saglasnosti je sa hiperekscitabilnošću, tremorom i konvulzijama, opisanim kod eksperimentalnih životinja u većini *in vivo* ispitivanja neurotoksičnosti 2,4-DABA (Riggs i sar., 1954; Ressler i sar., 1961; O'Neal i sar., 1968; Chen i sar., 1972; Beart i sar., 1977; Johnston i sar., 1977; Ronquist i sar., 1980).

Weiss i saradnici (1989a) jedini su koristeći elektrofiziološke metode prethodno prikazali učinak 2,4-DABA na kulturi kortikalnih neurona miševa, kada je opaženo da 1,5 mM aminokiseline izaziva diskretnu depolarizaciju membranskog potencijala. Međutim, grafički prikaz ove depolarizacije nije praćen brojčanim vrednostima njene jačine, pošto su autori iskoristili 2,4-DABA samo radi poređenja sa elektrofiziološkim dejstvom BMAA, koja je bila predmet njihovog elektrofiziološkog istraživanja. Stoga možemo reći da detaljnija elektrofiziološka ispitivanja dejstva 2,4-DABA nisu ranije sprovedena.

Elektrofiziološka ispitivanja učinaka drugih ekscitatornih aminokiselina, kao što su domoićna kiselina (Debonnel i sar., 1989), BOAA (Lopicic i sar., 2009b) i BMAA (Lopicic i sar., 2009a), a koje danas smatramo sredinskim neurotoksinima, pokazala su da je ekscitotoksičnost glavni mehanizam njihovog dejstva. Depolarizacija membranskog potencijala neobično dugog trajanja i/ili jačine glavna je odlika ekscitotoksičnosti i pokreće niz procesa koji dovode do smrti neurona. Pošto je pokazano da 2,4-DABA izaziva izuzetno jaku depolarizaciju membrane neurona, možemo pretpostaviti da ova aminokiselina poseduje sposobnost izazivanja ekscitotoksičnosti. Takođe, ustanovili smo da 2,4-DABA može dovesti do dosta jače depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona od ranije ispitivanih endogenih (glutamat, aspartat) i sredinskih (BOAA, BMAA) aminokiselina na ovom modelu.

Neurotoksični potencijal 2,4-DABA ogleda se i u izostanku funkcionlanog oporavka neurona nakon njihovog izlaganja većim koncentracijama ove aminokiseline. Nakon primene  $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L 2,4-DABA i uklanjanja supstancije iz rastvora, samo polovina Retzius-ovih neurona oporavila je svoju električnu aktivnost. Međutim, neuroni izlagani još većoj koncentraciji 2,4-DABA od  $10^{-2}$  mol/L nisu imali sposobnost da se oporave nakon ispiranja, odnosno javljao se nepovratan gubitak električne aktivnosti. Ovi rezultati u saglasnosti su sa nalazima Ronquist i saradnika, koji su ukazali da je vijabilnost ćelija fibrosarkoma bila koncentraciono-zavisna, te da izlaganje ćelija 5 mM 2,4-DABA nije ubilo sve ćelije, dok je primena 10 mM 2,4-DABA to činila (Ronquist i sar., 1980).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da L- i DL-2,4-DABA ispoljavaju isto dejstvo, kada su direktno primenjivane na ganglione u kojima se nalaze Retzius-ovi neuroni, odnosno direktno na nervni sistem. Ovo su ranije u svojim *in vivo* eksperimentima pokazali Chen i saradnici (1972) pošto su uočili pojavu neurotoksičnih efekata kod pacova (hiperiritabilnost, tremor i konvulzije) nakon primene D- i L- izoformi 2,4-DABA u moždane komore životinja, te izlaganja nervnog tkiva direktnom uticaju ove aminokiseline. Sa druge strane, intraperitonealnu primenu jedino L-2,4-DABA pratile su pomenute manifestacije neurotoksičnosti, što govori u prilog propustljivosti krvno-moždane barijere za ovu izoformu aminokiseline. Direktna primena 2,4-DABA na nervni sistem u našim eksperimentima u skladu je sa literaturnim podacima, pošto je prisustvo 2,4-DABA pokazano u mozgovima pacova kojima je ova aminokiselina supkutano primenjivana (Vivanco i sar., 1966) ili u mozgovima miševa nakon intravenske primene 2,4-DABA u repnu venu (Appelgren i sar., 1982). Takođe, 2,4-DABA detektovana je u mozgu riba koje su nastanjivale jezera poznatim po „cvetanju“ cijanobakterija, te su najverovatnije ingestijom unosile ovu aminokiselinu (Banack i sar., 2015).

Direktan uticaj 2,4-DABA na neurone, odnosno pojava funkcionalnih, električnih promena u njima, koje smo zabeležili u našim eksperimentima nisu u saglasnosti sa ranijim tvrdnjama O'Neal i saradnika (1968). U njihovim *in vivo* eksperimentima, pretpostavljeno je da L-2,4-DABA,

intraperitonealno data pacovima, izaziva oštećenja jetre i onemogućava iskorišćavanje amonijaka za sintezu ureje, što sekundarno dovodi do hronične endogene intoksikacije životinja amonijakom. Smatrano je da su iritabilnost, tremor i konvulzije bile manifestacije štetnog dejstva amonijaka na nervni sistem. Međutim, pojedini rezultati njihovih eksperimenata nisu mogli da opravdaju njihove pretpostavke, pošto je ustanovljeno da je povišene koncentracije amonijaka u tkivima i krvi životinja, pratilo i povećanje koncentracije ureje, što je odgovaralo i histopatološkim nalazima potpuno očuvane citoarhitektonike uzoraka tkiva jetre životinja, odnosno da oštećenje jetre nije bilo prisutno. Sa druge strane, zapazili su da je nakon intraperitonealne aplikacije, L-2,4-DABA bila prisutna u mozgovima životinja, kao i da je u uzorcima tkiva mozгова tretiranih životinja uočen gubitak neurona u svim delovima hipokampusa uz demijelinizaciju.

Koncentracije 2,4-DABA koje se detektuju u uzorcima tkiva nervnog sistema drastično se razlikuju i prema literaturnim podacima iznose od nekoliko desetina ng/g tkiva (Chatziefthimiou i sar., 2018) sve do nekoliko stotina µg/g tkiva (Bishop i sar., 2018). Stoga je i koncentracije 2,4-DABA koje se koriste u eksperimentima teže proceniti u skladu sa realnim stepenom izloženosti životinja i ljudi ovoj aminokiselini. Povezivanje nalaza *in vitro* i *ex vivo* eksperimenata sa opisanim učincima 2,4-DABA kod životinja i ljudi zahtevaju preciznije informacije o učestalosti pojave ove aminokiseline u prirodi, rasprostranjenosti njenih proizvođača, potencijalnoj bioakumulaciji u prirodi, kao i metabolizmu i eliminaciji iz organizma.

Iako postoje pretpostavke o ulozi 2,4-DABA u nastanku i razvoju neurodegenerativnih oboljenja, mehanizmi dejstva ove aminokiseline, odnosno nastanka strukturnih i funkcionalnih oštećenja neurona su nepoznati. Prema našim saznanjima, jedino elektrofiziološko ispitivanje dejstva 2,4-DABA na kulturama mišjih kortikalnih neurona pretpostavilo je da je ekscitatorni efekat posredovan aktivacijom jonotropnih glutamatnih receptora, ali i da postoji mogućnost da se deo učinka ove aminokiseline odvija mehanizmima van glutamatnih receptora (Weiss i sar., 1989a). Sa druge strane, postoje pretpostavke i da se direktan uticaj 2,4-DABA na neurone postiže aktivacijom natrium-zavisnog transportera za male, neutralne aminokiseline (TSA) (Panasci i sar., 1988).

Izlaganje Retzius-ovih neurona DL-2,4-DABA u koncentracijama većim od  $10^{-3}$  mol/L izaziva depolarizaciju membranskog potencijala koja se odvija u dve faze. Amplituda inicijalne depolarizacije membranskog potencijala po jačini je odgovarala depolarizacijama izazvanim endogenim i sredinskim aminokiselinama (glutamat, aspartat, BMAA i BOAA), ranije ispitivanim na našem modelu (Lopicic i sar., 2009a; Lopicic i sar., 2009b), a čiji je jedan od glavnih mehanizama dejstva ekscitotoksičnost. Druga faza depolarizacije bila je višestruko veće amplitude, praćena prekidom spontane električne aktivnosti neurona – depolarizacionim blokom, ali i pojavom nepotpunog funkcionalnog oporavka ćelija ili čak njegovim odsustvom.

Depolarizacija membranskog potencijala neurona koja se razvija u dve faze, prema našim saznanjima, prvi put je opisan fenomen u smislu ekscitatornog dejstva aminokiselina na našem modelu (Spasic i sar., 2018), a moguće i šire. James i Walker (1979) i Mat Jais i saradnici (1983) pokazali su postojanje bifaznog odgovora Retzius-ovih neurona na glutamat, u koncentracijama sličnim DL-2,4-DABA iz naših eksperimenata, ali je u njihovim ogledima prva faza bila hiperpolarizujuća, dok su kod nas obe faze bile depolarizujuće. Depolarizaciji membrane prethodila je inicijalna hiperpolarizacija, koja je nestajala pri ponovnim aplikacijama glutamata (Mat Jais i sar., 1983). Kako je poznato da glutamat svoje ekscitatorno dejstvo ispoljava aktivacijom jonotropnih receptora, na šta ukazuje i povećanje provodljivosti membrane aktivacijom non-NMDA receptora (James i sar., 1979), može se pretpostaviti da se jedna od faza depolarizacije membrane indukovane DL-2,4-DABA, i to najverovatnije inicijalna faza, odvija istim mehanizmom. Za razliku od bifaznog odgovora membranskog potencijala na glutamat, 2,4-DABA odlikuje dvostepena depolarizacija membrane Retzius-ovog neurona. Ovo ukazuje na postojanje još najmanje jednog mehanizma kojim se ćelijska membrana dodatno depolarizuje, odnosno postiže kompletnu amplitudu depolarizacije. Ovu pretpostavku potkrepljuju zaključci Weiss i saradnika (1989a) da je moguće da učinak 2,4-DABA na neurone prevazilazi aktivaciju jonotropnih glutamatnih receptora. Kainat, aminokiselina koja je oko 100 puta potentnija od glutamata (James i sar., 1980b), tek je pri ponavljanim milimolarnim aplikacijama izazivala dvofaznu depolarizaciju membrane Retzius-ovih neurona, pri čemu prilikom inicijalne faze nije bilo spontane električne aktivnosti ćelija (Mat Jais i sar., 1984). Naša ispitivanja pokazuju da 2,4-DABA izaziva dvofaznu depolarizaciju membrane pri inicijalnoj i svakoj ponovnoj primeni ove aminokiseline na istoj ćeliji. Takođe, za razliku od učinaka kainata (Mat Jais i sar., 1984; Lohrke i sar., 1996), pri ponovnim izlaganjima Retzius-ovih neurona 2,4-DABA, nije dolazilo do pojave potencijacije, odnosno pojačanja odgovora membrane, već su depolarizacije bile relativno konstantnih amplituda.

Električna aktivnost Retzius-ovih neurona u TRIS-Ringerovom rastvoru koji ne sadrži jone natrijuma svodila se na hiperpolarizaciju ćelijske membrane i prestanak spontanog izbijanja akcionih potencijala ćelija u našim eksperimentima, što je u saglasnosti je sa nalazima James i Walker (James i sar., 1979). Karakteristična depolarizacija membranskog potencijala koja se sastojala iz dve faze pri primeni 2,4-DABA u standardnim uslovima, odnosno standardnom Ringerovom rastvoru za pijavice, nije se javljala kada je ćelija u TRIS-Ringerovom rastvoru. Štaviše, odgovor Retzius-ovih neurona pri izlaganju većoj koncentraciji 2,4-DABA ( $5 \cdot 10^{-3}$  mol/L) u rastvoru koji nije sadržao jone natrijuma, sveden na diskretnu depolarizaciju membranskog potencijala. Uporedno slično umanjeње efekata pokazano je, pod istim uslovima, na Retzius-ovim neuronima izlaganim ekscitatornim aminokiselinama za koje se smatra da deluju preko jonotropnih glutamatnih receptora – *Lathyrus sativus* neurotoksinu (BOAA) (Cemerikic i sar., 2001), aspartatu (Cemerikic i sar., 1988) ili kainatu

(Mat Jais i sar., 1984; Kilb i sar., 1999). Ovo može ukazivati na značaj jona natrijuma na celokupnu depolarizaciju membrane Retzius-ovih neurona, odnosno i na prvu fazu za koju se pretpostavlja da nastaje aktivacijom non-NMDA glutamatnih receptora i na drugu fazu depolarizacije koja moguće uključuje aktivaciju elektrogenog natrijum-zavisnog transportera za male, neutralne aminokiseline (TSA).

Danas je poznato da je aktivnost membranskog transportera za male, neutralne aminokiseline (TSA) zavisna od prisustva jona natrijuma. Elektrofiziološke studije na oocitama *Xenopus sp.* koje na membrani eksprimiraju SA1 protein transporternog sistema A i kulturama HEK293T<sup>19</sup> ćelija koje eksprimiraju SNAT2 pokazale su povezanost ulaznih transmembranskih struja sa preuzimanjem neutralnih aminokiselina u ćelije. Izmena jona natrijuma ekstraćelijskog medijuma holinom, odnosno N-metilglukaminom dovela je do prestanka kako transmembranskog transporta aminokiselina, tako i ulaznih transmembranskih struja, ukazujući na ulogu TSA u ulasku jona natrijuma u ćeliju (Reimer i sar., 2000; Zhang i sar., 2007). Druge studije koje nisu koristile elektrofiziološke metode, takođe su ispitivale uticaj jona natrijuma na dejstvo 2,4-DABA preko TSA. Christensen i saradnici su tako pokazali da je smanjenje koncentracije jona natrijuma u ekstraćelijskoj sredini bilo praćeno smanjenjem preuzimanja 2,4-DABA u ćelije (Christensen i sar., 1969).

Kako oba predložena mehanizma dejstva 2,4-DABA - aktivacija jonotropnih glutamatnih receptora (iGluR) i transportnog sistema za neutralne aminokiseline, zahtevaju prisustvo jona natrijuma u ekstraćelijskom medijumu, a rezultati eksperimenata pokazuju da je učinak 2,4-DABA zavisan od jona natrijuma, ne može se sa sigurnošću izabrati jedan od dva pomenuta mehanizma kojim ova aminokiselina deluje. Stoga se može pretpostaviti da oba mehanizma mogu imati udela u depolarizaciji membrane Retzius-ovih neurona.

Iako rezultati eksperimenata u TRIS-Ringerovom rastvoru ukazuju da 2,4-DABA ispoljava svoj učinak na Retzius-ove neurone angažovanjem natrijum-zavisnih mehanizama, mora se obratiti pažnja na pojavu diskretne depolarizacije membrane ćelija izloženim 2,4-DABA i u ovim uslovima. Jedan od mogućih razloga je oslobađanje jona natrijuma iz ćelija ganglionia tokom eksperimenta, pogotovo iz ćelija koje su prethodno bile penetrirane. Drugi razlog može biti mogućnost pokretanja mehanizama pod uticajem 2,4-DABA, koji nisu zavisni od jona natrijuma, kao što su neki natrijum-nezavisni transporteri (Christensen i sar., 1969). Treći mehanizam nastanka ove depolarizacije može biti izlazak jona kalijuma iz ćelija kroz aktivirane jonotropne glutamatne receptore. Poslednja pretpostavka je najverovatnija, pošto prethodna elektrofiziološka ispitivanja Retzius-ovih neurona ukazuju na smanjenje unutarćelijske koncentracije jona kalijuma pri izlaganju različitim ekscitatornim aminokiselinama (Cemerikic i sar., 1988; Cemerikic i sar., 2001). Takođe,

---

<sup>19</sup> Humane embrionalne ćelije bubrega 293T (engl. *Human embryonic kidney 293T cells*, HEK293T)

kao i u našim eksperimentima, u nekoliko elektrofizioloških ispitivanja opažena je nepotpuna blokada depolarizacije membranskog potencijala pri primeni kainata (Kilb i sar., 1999), aspartata (Cemerikic i sar., 1988) ili BOAA (Cemerikic i sar., 2001) u rastvoru koji ne sadrži jone natrijuma.

Ispitivanje uticaja 2,4-DABA na ulazni otpor membrane ćelija, odnosno neurona, prema našim saznanjima do sada nije ispitivano. Rezultati našeg istraživanja pokazali su da 2,4-DABA značajno smanjuje vrednost ulaznog otpora membrane Retzius-ovih neurona odnosno povećava njenu provodljivost (Spasic i sar., 2019). Brojni agonisti AMPA/ kainatnih receptora koji su ispitivani na našem modelu, kao što su glutamat (James i sar., 1979; Mat Jais i sar., 1984), aspartat (Cemerikic i sar., 1988), AMPA (Mat Jais i sar., 1984), kainat (Mat Jais i sar., 1984; Lohrke i sar., 1996), BOAA (Cemerikic i sar., 2001) i BMAA, koji je strukturni izomer 2,4-DABA (Nedeljkov i sar., 2005; Lopicic i sar., 2009a) pokazali su isti učinak na ulazni otpor membrane ćelija. Sa druge strane, pokazano je da aktivacija TSA egzokrinih acinarnih ćelija pankreasa miševa dovodi do smanjenja ulaznog otpora ovih ćelija (Iwatsuki i sar., 1980), dok kod ćelija plivajuće jetrenjače (*Riccia fluitans*) povećava membransku provodljivost (Felle, 1981).

Pošto se iz literaturnih podataka može videti da aktivacija kako jonotropnih glutamatnih receptora tako i elektrogenog transportera za male neutralne aminokiseline (TSA) dovode do smanjenja ulaznog otpora membrane ćelija, elektrofiziološka ispitivanja učinka 2,4-DABA na Retzius-ovim neuronima koja smo sprovedeli nisu mogla da isključe ni jedan od pomenutih mehanizama depolarizacije membranskog potencijala uzrokovane ovom aminokiselinom, pa su korišćeni specifični antagonisti obeju ovih membranskih struktura.

Naši eksperimenti pokazali su da je CNQX, kompetitivni antagonista AMPA/ kainatnih receptora, smanjivao amplitudu prve faze depolarizacije, dok nije pokazivao statistički značajno suprimirajuće dejstvo na jačinu druge faze depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona. Međutim, tokom eksperimenata je uočeno da inhibitorni uticaj CNQX na učinke 2,4-DABA nije bio potpun. Ova pojava i ranije je pokazana pri ispitivanju CNQX-posredovane inhibicije ekscitatornog dejstva BMAA (Lopicic i sar., 2009a), kainata i glutamata (Dorner i sar., 1990; Dorner i sar., 1994) na Retzius-ovim neuronima. Takođe, Weiss i saradnici opisali su umanjenje ekscitatornih efekata 2,4-DABA na neuronima, koji su prethodno bili izloženi kinurenatu, neselektivnom antagonisti jonotropnih glutamatnih receptora (Weiss i sar., 1989a). Eksperimenti koje smo mi izvodili pokazali su da je prva faza depolarizacije membranskog potencijala izazvane 2,4-DABA po vrednosti amplitude i sveukupnim karakteristikama vrlo slična učinku drugih ekscitatornih aminokiselina ispitivanih na našem modelu (Nedeljkov i sar., 1979; Cemerikic i sar., 1988; Dierkes i sar., 1996; Cemerikic i sar., 2001; Lopicic i sar., 2009a; Lopicic i sar., 2009b; Spasic i sar., 2018), a za koje se pretpostavlja da svoje dejstvo ispoljavaju aktivacijom jonotropnih glutamatnih receptora. Još značajniji su rezultati naših ispitivanja uticaja CNQX na depolarizaciju izazvanu 2,4-DABA, koji

su ukazali na značajan suprimirajući učinak ovog inhibitora jonotropnih glutamatnih receptora na prvu fazu depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona (Spasic i sar., 2019). Na osnovu pomenutih literaturnih podataka i rezultata naših eksperimenata možemo pretpostaviti da 2,4-DABA izaziva depolarizaciju membranskog potencijala Retzius-ovih neurona, čija prva faza je posredovana aktivacijom jonotropnih glutamatnih receptora, AMPA/kainatnog tipa.

Poznato je da preterana aktivacija jonotropnih glutamatnih receptora dovodi do pojave ekscitotoksičnosti. Ekscitotoksičnost predstavlja poseban električni fenomen kod neurona i mehanizam koji dovodi do smrti nervnih ćelija. Danas se smatra da je ekscitotoksičnost veoma bitan faktor u patogenezi neurodegenerativnih bolesti (Dong i sar., 2009), a pokazano je i da ima presudnu ulogu u neurotoksičnim efektima sredinskih ekscitatornih aminokiselina (Weiss i sar., 1989b; Lobner, 2009; Chiu i sar., 2012). Akutna ekscitotoksičnost prouzrokovana je aktivacijom AMPA tipa jonotropnih glutamatnih receptora, pri čemu dolazi do izražene depolarizacije membranskog potencijala i bubrenja neurona usled ulaska jona natrijuma i vode u ćelije (Choi, 1987; Doble, 1999; Beck i sar., 2003). Ovo neuronsko opterećenje može doprineti smrti ćelija, posebno ukoliko je ekscitatorni uticaj na neurone veoma jak (Doble, 1999). Takođe, poznato je da depolarizacija membrane neurona omogućava aktivaciju NMDA tipa jonotropnih glutamatnih receptora, pošto omogućava uklanjanje magnezijumskog bloka i time čini ove receptore osetljivijim na uticaj endogenih i/ili egzogenih agonista. Preterana stimulacija NMDA receptora dovodi od unutarćelijskog nakupljanja jona kalcijuma, čija količina nadvladava puferske mehanizme koji ograničavaju nivo kalcijuma u ćelijama, te nastaje opterećenje neurona ovim dvovalentnim katjonom. Visoke koncentracije kalcijuma unutar ćelija aktiviraju kalcijum-zavisne enzime – lipaze, proteaze, fosfolipaze, protein kinazu C, endonukleaze i neuronalnu azot-oksidi sintetazu koji dovode do oštećenja ćelijskih struktura, ali i proizvodnje slobodnih radikala (ROS) (Doble, 1999; Meldrum, 2000). Rezultati skorijeg istraživanja Takser i saradnika pokazali su da 2,4-DABA indukuje proizvodnju ROS u ćelijama neuroblastoma N2a, koje su bile izložene ovoj aminokiselini (Takser i sar., 2016). Opterećenje neurona kalcijumovim jonima utiče i na funkcionalnost mitohondrija, gde se remeti aktivnost respiratornog lanca i proizvodnja ATP te se javlja hipoenergoza ćelija i oksidativni stres usled stvaranja slobodnih radikala i u mitohondrijama (Meldrum, 2000; Blasco i sar., 2014). Međutim, u literaturi ne postoje podaci o postojanju NMDA glutamatnih receptora na membrani Retzius-ovih neurona, a rezultati pojedinih elektrofizioloških ispitivanja pokazali su odsustvo ekscitatornog dejstva NMDA na membranski potencijal ovih ćelija (James i sar., 1980b; Dorner i sar., 1990; Dorner i sar., 1994). Takođe, imunohistohemijske metode nisu uspele da dokažu prisustvo konstitutivne NMDAR1 subjedinice NMDA glutamatnih receptora u nervnom sistemu pijavica (Thorogood i sar., 1999). Drugi jonotropni glutamatni receptori na membrani Retzius-ovih neurona, AMPA/ kainatnog tipa nisu propustljivi za jone kalcijuma (Dierkes i sar., 1996), ali se pretpostavlja

da depolarizacija membrane i influks jona natrijuma aktiviraju voltažno-zavisne kalcijumske kanale, kroz koje joni kalcijuma pojačano ulaze u ćelije (Choi, 1987; Munsch i sar., 1995).

Obeležja ekscitotoksičnosti, kao što su bubrenje neurona i/ili stvaranje ROS, opisani su kod ćelija izlaganih 2,4-DABA, pokazujući ulogu ovih mehanizama u neurotoksičnom potencijalu aminokiseline. Weiss i saradnici uočili su da izlaganje kultura zrelih neurona pacova milimolarnim koncentracijama 2,4-DABA dovodi do akutnog bubrenja neurona (Weiss i sar., 1989a), dok su ranije pomenuti rezultati istraživanja Takser i saradnika pokazali da 2,4-DABA indukuje proizvodnju ROS u ćelijama neuroblastoma N2a, koje su bile izložene ovoj aminokiselini (Takser i sar., 2016). Naše istraživanje pruža dodatne dokaze o aktivaciji jonotropnih glutamatnih receptora 2,4-diaminobuternom kiselinom i mogućoj ulozi procesa ekscitotoksičnosti u neurotoksičnom dejstvu ove aminokiseline.

Primena ekvimolarne koncentracije L-alanina uz 2,4-DABA u našem istraživanju, pokazala je značajno smanjenje jačine druge faze depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona izazvanih 2,4-DABA. Sa druge strane, L-alanin nije pokazivao statistički značajan suprimirajući efekat na prvu fazu membranske depolarizacije ćelija. Prema našim saznanjima, ovo je prvo elektrofiziološko istraživanje koje je pokazalo inhibitorni učinak L-alanina na depolarizaciju membranskog potencijala izazvanu 2,4-DABA (Spasic i sar., 2019).

2,4-diaminobuterna kiselina pogodan je supstrat za natrijum-zavisni transporter malih, neutralnih aminokiselina. Brojne *in vitro* studije, uključujući i one na eksperimentalnim modelima nervnog sistema, potvrdile su ovu tvrdnju, opisujući nesaturabilnu kinetiku preuzimanja 2,4-DABA u ćelije pomoću transportnog sistema A (TSA), koju je mogao inhibirati alanin (Christensen i sar., 1966; Naeslund i sar., 1979; Ronquist i sar., 1980; Ronquist i sar., 1984; Antoni i sar., 1997).

Naime, iako je 2,4-DABA katjonska aminokiselina, smatra se da pri fiziološkim vrednostima pH preuzima dipolarnu, „*zwitter*” formu, postajući pogodan supstrat za transportni sistem A (TSA), koji pored ovog zahteva i kotransport jona natrijuma (Christensen i sar., 1973). Po ulasku u ćeliju dipolarni oblik 2,4-DABA se reprotonuje i ponovo zauzima katjonsku formu (Christensen i sar., 1969; Christensen i sar., 1992), te se čitav proces aktivacije TSA završava neto influksom dva pozitivna jona – organskog katjona i jona natrijuma. Koncentrovanje 2,4-DABA i jona natrijuma u citoplazmi dovodi do porasta količine pozitivnog naelektrisanja unutar ćelija i izaziva izraženu depolarizaciju membranskog potencijala. Preterana depolarizacija membrane može doprineti nastanku ekscitotoksičnog oštećenja ćelija. Sa druge strane, nakupljanje pomenutih jona proizvodi osmotski stres ćelija, remeteći osmotsku ravnotežu i dovodi do bubrenja ćelija (Christensen i sar., 1952b), a naročito neurona (Weiss i sar., 1989a). Bubrenje ćelija može oštetiti pojedine ćelijske strukture i, na kraju, čitavu ćeliju. Takođe, unutarćelijsko koncentrovanje jona natrijuma dovodi do



trošenja energetske rezerve ćelija, pošto se preteranom ulasku natrijuma suprotstavlja  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-azna pumpa koja svojom aktivnošću razlaže ATP.

Može se zaključiti da aktivacija transportnog sistema za neutralne aminokiseline od strane 2,4-DABA dovodi do izražene depolarizacije membrane ćelija, kao i bubrenja ćelija. Naše istraživanje pokazuje da je izražena jačina membranske depolarizacije Retzius-ovih neurona zaista pratilac primene 2,4-DABA (Spasic i sar., 2018). Sa druge strane, bubrenje Retzius-ovih neurona povezano je sa sniženjem vrednosti ulaznog otpora membrane ćelija (Coulon i sar., 2008). Moguće je da je za uočen pad ulaznog otpora membrane Retzius-ovih neurona pri izlaganju 2,4-DABA u našim eksperimentima (Spasic i sar., 2019) delom zaslužno aktiviranje volumen-zavisnih jonskih kanala.

Na kraju možemo uvideti da druga faza depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona izazvana 2,4-DABA po amplitudi višestruko premašuje ekscitatorni učinak drugih aminokiselina ispitivanih na našem modelu (Spasic i sar., 2018). Literaturni podaci pružaju detaljan uvid u nesaturabilnu kinetiku preuzimanja 2,4-DABA preko natrijum-zavisnog transportnog sistema za male, neutralne aminokiseline (TSA). Rezultati našeg istraživanja pokazuju visoko statistički značajan inhibitorni učinak L-alanina, poznatog kompetitivnog inhibitora TSA, samo na drugu fazu membranske depolarizacije ćelija. Imajući u vidu pomenute činjenice, možemo zaključiti da je druga faza depolarizacije membrane Retzius-ovih neurona posredovana aktivacijom elektrogenog, natrijum-zavisnog transportera za neutralne aminokiseline (TSA) ili nekog srodnog transportera.



## 6. ZAKLJUČCI

1. 2,4-diaminobuterna kiselina je potentna aminokiselina koja deluje ekscitatorno na Retzius-ove neurone. Ovaj učinak ogleda se u izraženoj depolarizaciji membranskog potencijala, ubrzanju frekvencije spontane električne aktivnosti ćelija i pojavi depolarizacionog bloka.
2. Depolarizacija membranskog potencijala neurona izazvana 2,4-diaminobuternom kiselinom pokazuje koncentraciono-zavisnu prirodu.
3. Depolarizacija membrane Retzius-ovih neurona izloženih 2,4-diaminobuternoj kiselini u koncentracijama od  $3 \cdot 10^{-3}$  mol/L i većim, razvija se kroz dve istaknute faze, koje se nadovezuju jedna na drugu. Ova dvofazna depolarizacija membrane je prvi put opisan ekscitatorni fenomen na našem modelu do sada.
4. 2,4-diaminobuterna kiselina na Retzius-ovim neuronima višestruko je efikasnija od svih endogenih i sredinskih ekscitatornih aminokiselina ispitivanih na našem modelu. Prva faza depolarizacije membranskog potencijala po amplitudi odgovara maksimalnom učinku pomenutih ekscitatornih aminokiselina, dok je druga faza depolarizacije (kompletna depolarizacija) višestruko jača.
5. Primena većih koncentracija 2,4-diaminobuterne kiseline ( $5 \cdot 10^{-3}$  i  $10^{-2}$  mol/L) na Retzius-ove neurone bespovratno remeti funkcionalni oporavak ovih ćelija – mirovni membranski potencijal i spontano izbijanje akcionih potencijala.
6. Funkcionalni oporavak Retzius-ovih neurona izlaganih 2,4-diaminobuternoj kiselini pokazuje koncentraciono-zavisnu prirodu.
7. Direktno aplikovanje DL- i L- izoformi 2,4-diaminobuterne kiseline pokazuje istovetne ekscitatorne učinke na Retzius-ovim neuronima.
8. Ekscitatorna dejstva 2,4-diaminobuterne kiseline na Retzius-ove neurone zavisna su od prisustva jona natrijuma u ekstraćelijskom prostoru, pošto se u uslovima odsustva jona natrijuma drastično smanjuje jačina depolarizacije membrane i nedostaje njena dvofazna priroda.
9. 2,4-diaminobuterna kiselina dovodi do značajnog smanjenja ulaznog otpora slobodne membrane Retzius-ovih neurona.
10. Antagonist non-NMDA glutamatnih receptora 6-cijano-7-nitrokvinoxalin-2,3-dion statistički značajno smanjuje amplitudu samo prve faze depolarizacije membranskog potencijala Retzius-ovih neurona izazavane 2,4-diaminobuternom kiselinom, dok je bez statistički značajnog uticaja na drugu fazu.

11. Pošto je uočeno da prva faza depolarizacije izazvane 2,4-diaminobuternom kiselinom po jačini odgovara sveukupnom ekscitatornom učinku endogenih i drugih sredinskih aminokiselina koje deluju preko jonotropnih glutamatnih receptora na našem modelu, i pošto antagonist non-NMDA glutamatnih receptora statistički značajno suprimira amplitudu samo prve faze depolarizacije, zaključujemo da se ova faza depolarizacije membrane indukovana 2,4-diaminobuternom kiselinom odigrava usled aktivacije jonotropnih glutamatnih receptora non-NMDA tipa.
12. Kompetitivni inhibitor natrijum-zavisnog, elektrogenog transportera za neutralne aminokiseline (TSA) L-alanin statistički značajno utiče isključivo na drugu fazu depolarizacije membranskog potencijala pokrenutu 2,4-diaminobuternom kiselinom umanjujući njenu jačinu, dok nema statistički značajan uticaj na prvu fazu.
13. Obzirom na izraženu kompletnu depolarizaciju membranskog potencijala Retzius-ovih neurona koja, posmatrajući njenu amplitudu, višestruko prevazilazi efekte aktivacije jonotropnih glutamatnih receptora Retzius-ovih neurona i statistički značajan suprimirajući uticaj inhibitora natrijum-zavisnog transportera za neutralne aminokiseline na ovu fazu depolarizacije, zaključujemo da se druga faza depolarizacije membrane, uzrokovana 2,4-diaminobuternom kiselinom, javlja zahvaljujući aktivaciji natrijum-zavisnog transportera za neutralne aminokiseline.
14. Prikazani rezultati pokazuju da se u osnovi ekscitatornog dejstva 2,4-diaminobuterne kiseline na Retzius-ovim neuronima pijavice nalaze dva mehanizma, koji su zajedno odgovorni za pomenute faze depolarizacije membranskog potencijala ćelija.
15. Pomenuti mehanizmi mogu imati značajnu ulogu u neurotoksičnom potencijalu 2,4-diaminobuterne kiseline, pošto pokreću proces ekscitotoksičnosti, izazivaju poremećaj regulacije osmotske ravnoteže i smanjenje energentskih rezervi neurona, a mogu aktivirati i druge mehanizme.

## 7. LITERATURA

- Abeywardena NM, Gascoigne SJL, Anandappa A. Algal Bloom Expansion Increases Cyanotoxin Risk in Food. *Yale J Biol Med* 2018;91(2):129-142.
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Snow DD, Cassada D. Methods for simultaneous detection of the cyanotoxins BMAA, DABA, and anatoxin-a in environmental samples. *Toxicon* 2013;76:316-325.
- Al-Sammak MA, Hoagland KD, Cassada D, Snow DD. Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. *Toxins (Basel)* 2014;6(2):488-508.
- Allen CN, Spencer PS, Carpenter DO. Beta-N-methylamino-L-alanine in the presence of bicarbonate is an agonist at non-N-methyl-D-aspartate-type receptors. *Neuroscience* 1993;54(3):567-574.
- Allen CN, Omelchenko I, Ross SM, Spencer P. The neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) interacts with the strychnine-insensitive glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Neuropharmacology* 1995;34(6):651-658.
- Andreeva N, Khodorov B, Stelmashook E, Cragoe E, Jr., Victorov I. Inhibition of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange enhances delayed neuronal death elicited by glutamate in cerebellar granule cell cultures. *Brain Res* 1991;548(1-2):322-325.
- Antoni G, Omura H, Bergstrom M, Furuya Y, Moulder R, Roberto A i sar. Synthesis of L-2,4-diamino[4-11C]butyric acid and its use in some in vitro and in vivo tumour models. *Nucl Med Biol* 1997;24(6):595-601.
- Appelgren LE, Lindqvist I, Nilsson O, Ronquist G. Distribution of some non-physiological amino acids (AIB, DAB, MeAIB) in mice. *Acta Physiol Scand* 1982;115(2):261-268.
- Arendash GW, Millard WJ, Dunn AJ, Meyer EM. Long-term neuropathological and neurochemical effects of nucleus basalis lesions in the rat. *Science* 1987;238(4829):952-956.
- Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003;34(4-5):325-337.
- Banack SA, Cox PA. Biomagnification of cycad neurotoxins in flying foxes: implications for ALS-PDC in Guam. *Neurology* 2003a;61(3):387-389.
- Banack SA, Cox PA. Distribution of the neurotoxic nonprotein amino acid BMAA in *Cycas micronesica*. *Botanical Journal of the Linnean Society* 2003b;143(2):165-168.
- Banack SA, Caller TA, Stommel EW. The cyanobacteria derived toxin Beta-N-methylamino-L-alanine and amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins (Basel)* 2010a;2(12):2837-2850.

- Banack SA, Downing TG, Spacil Z, Purdie EL, Metcalf JS, Downing S i sar. Distinguishing the cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) from its structural isomer 2,4-diaminobutyric acid (2,4-DAB). *Toxicon* 2010b;56(6):868-879.
- Banack SA, Metcalf JS, Bradley WG, Cox PA. Detection of cyanobacterial neurotoxin beta-N-methylamino-l-alanine within shellfish in the diet of an ALS patient in Florida. *Toxicon* 2014;90:167-173.
- Banack SA, Caller T, Henegan P, Haney J, Murby A, Metcalf JS i sar. Detection of cyanotoxins, beta-N-methylamino-L-alanine and microcystins, from a lake surrounded by cases of amyotrophic lateral sclerosis. *Toxins (Basel)* 2015;7(2):322-336.
- Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW. Chronic quinolinic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci* 1991;11(6):1649-1659.
- Beal MF. Does impairment of energy metabolism result in excitotoxic neuronal death in neurodegenerative illnesses? *Ann Neurol* 1992;31(2):119-130.
- Bear PM, Bilal K. 1-2,4-Diaminobutyric acid and the GABA system. *Neurosci Lett* 1977;5(3-4):193-198.
- Beck J, Lenart B, Kintner DB, Sun D. Na-K-Cl cotransporter contributes to glutamate-mediated excitotoxicity. *J Neurosci* 2003;23(12):5061-5068.
- Beleslin B. Lack of electrotonic transmission between retzius nerve cells in the fifth and sixth free ganglion of horse leech *Haemopsis sanguisuga*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A Physiology* 1977;56(4):509-512.
- Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med* 1994;330(9):585-591.
- Bergenheim AT, Roslin M, Ungerstedt U, Waldenstrom A, Henriksson R, Ronquist G. Metabolic manipulation of glioblastoma in vivo by retrograde microdialysis of L-2, 4 diaminobutyric acid (DAB). *J Neurooncol* 2006;80(3):285-293.
- Bishop SL, Kerkovius JK, Menard F, Murch SJ. N-beta-Methylamino-L-Alanine and Its Naturally Occurring Isomers in Cyanobacterial Blooms in Lake Winnipeg. 2018;33(1):133-142.
- Blasco H, Mavel S, Corcia P, Gordon PH. The glutamate hypothesis in ALS: pathophysiology and drug development. *Curr Med Chem* 2014;21(31):3551-3575.
- Blind PJ, Waldenstrom A, Berggren D, Ronquist G. Antitumour effect of L-2,4 diaminobutyric acid on a hepatoma cell line. *Anticancer Res* 2000;20(6b):4275-4278.
- Blind PJ, Waldenstrom A, Hafstrom L, Berggren D, Ronquist G. Unique antitumour effects of L-2,4 diaminobutyric acid on cultured hepatoma cells. *Anticancer Res* 2003;23(2b):1245-1248.
- Carretta M. The Retzius cells in the leech: a review of their properties and synaptic connections. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1988;91(3):405-413.

- Catch JR, Jones TS, Wilkinson S. The chemistry of polymyxin A; isolation of the amino-acids D-leucine, L-threonine, L-alpha gamma-diaminobutyric acid, and an unknown fatty acid. *Biochem J* 1948;43(2):27.
- Cemerikic D, Nedeljkov V, Beleslin B. Effects of L-aspartate on cellular Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> activities in Retzius nerve cells of the leech. *Comp. Biochem. Physiol.* 1988;89A:67-74.
- Cemerikic D, Nedeljkov V, Lopicic S, Dragovic S, Beleslin B. Excitotoxicity of lathyrus sativus neurotoxin in leech retzius neurons. *Physiol Res* 2001;50(2):205-214.
- Chatziefthimiou AD, Metcalf JS, Glover WB, Banack SA, Dargham SR, Richer RA. Cyanobacteria and cyanotoxins are present in drinking water impoundments and groundwater wells in desert environments. *Toxicon* 2016;114:75-84.
- Chatziefthimiou AD, Deitch EJ, Glover WB, Powell JT, Banack SA, Richer RA i sar. Analysis of Neurotoxic Amino Acids from Marine Waters, Microbial Mats, and Seafood Destined for Human Consumption in the Arabian Gulf. *Neurotox Res* 2018;33(1):143-152.
- Chen CH, Flory W, Koeppe RE. Variation of neurotoxicity of L- and D-2,4-diaminobutyric acid with route of administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 1972;23(2):334-338.
- Chiu AS, Gehringer MM, Braidy N, Guillemain GJ, Welch JH, Neilan BA. Excitotoxic potential of the cyanotoxin beta-methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicon* 2012;60(6):1159-1165.
- Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987;7(2):369-379.
- Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988;1(8):623-634.
- Christensen HN, Riggs TR, Fischer H, Palatine IM. Intense concentration of alpha, gamma-diaminobutyric acid by cells. *J Biol Chem* 1952a;198(1):17-22.
- Christensen HN, Riggs TR, Fischer H, Palatine IM. Amino acid concentration by a free cell neoplasm; relations among amino acids. *J Biol Chem* 1952b;198(1):1-15.
- Christensen HN, Liang M. Transport of diamino acids into the Ehrlich cell. *J Biol Chem* 1966;241(23):5542-5551.
- Christensen HN, Antonioli JA. Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na<sup>+</sup>-dependent inhibition of Na<sup>+</sup>-independent transport. *J Biol Chem* 1969;244(6):1497-1504.
- Christensen HN, de Cespedes C, Handlogten ME, Ronquist G. Energization of amino acid transport, studied for the Ehrlich ascites tumor cell. *Biochim Biophys Acta* 1973;300(4):487-522.
- Christensen HN, Ronquist G. Membrane transport properties of L-2,4-diaminobutyrate revisited. *J Membr Biol* 1992;127(1):1-7.
- Cires S, Casero MC, Quesada A. Toxicity at the Edge of Life: A Review on Cyanobacterial Toxins from Extreme Environments. *Mar Drugs* 2017;15(7):233.

- Cluskey S, Ramsden DB. Mechanisms of neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Pathol* 2001;54(6):386-392.
- Codd GA. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. *Ecol. Eng.* 2000;16:51-60.
- Collingridge GL, Lester RA. Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 1989;41(2):143-210.
- Combes A, El Abdellaoui S, Vial J, Lagrange E, Pichon V. Development of an analytical procedure for quantifying the underivatized neurotoxin beta-N-methylamino-L-alanine in brain tissues. *Anal Bioanal Chem* 2014;406(19):4627-4636.
- Copani A, Canonico PL, Nicoletti F. Beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) is a potent agonist of 'metabotropic' glutamate receptors. *Eur J Pharmacol* 1990;181(3):327-328.
- Copani A, Canonico PL, Catania MV, Aronica E, Bruno V, Ratti E i sar. Interaction between beta-N-methylamino-L-alanine and excitatory amino acid receptors in brain slices and neuronal cultures. *Brain Res* 1991;558(1):79-86.
- Coulon P, Wusten HJ, Hochstrate P, Dierkes PW. Swelling-activated chloride channels in leech *Retzius* neurons. *J Exp Biol* 2008;211(Pt 4):630-641.
- Couratier P, Hugon J, Sindou P, Vallat JM, Dumas M. Cell culture evidence for neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis being linked to glutamate AMPA/kainate receptors. *Lancet* 1993;341(8840):265-268.
- Cox PA, Sacks OW. Cycad neurotoxins, consumption of flying foxes, and ALS-PDC disease in Guam. *Neurology* 2002;58(6):956-959.
- Cox PA, Banack SA, Murch SJ. Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(23):13380-13383.
- Cox PA, Richer R, Metcalf JS, Banack SA, Codd GA, Bradley WG. Cyanobacteria and BMAA exposure from desert dust: a possible link to sporadic ALS among Gulf War veterans. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10 Suppl 2:109-117.
- Cox PA, Davis DA, Mash DC, Metcalf JS, Banack SA. Dietary exposure to an environmental toxin triggers neurofibrillary tangles and amyloid deposits in the brain. *Proc Biol Sci* 2016;283(1823):20152397. doi:10.1098/rspb.2015.2397
- Coyle JT, Molliver ME, Kuhar MJ. In situ injection of kainic acid: a new method for selectively lesioning neural cell bodies while sparing axons of passage. *J Comp Neurol* 1978;180(2):301-323.
- Craighead D, Metcalf JS, Banack SA, Amgalan L, Reynolds HV, Batmunkh M. Presence of the neurotoxic amino acids beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diamino-butyrac acid



- (DAB) in shallow springs from the Gobi Desert. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10 Suppl 2:96-100.
- Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 1959;183(4661):611-612.
- Curtis DR, Watkins JC. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* 1960;6:117-141.
- Curtis DR, Watkins JC. Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones. *J Physiol* 1963;166:1-14.
- Curtis DR, Malik R. A neurophysiological analysis of the effect of kainic acid on nerve fibres and terminals in the cat spinal cord. *J Physiol* 1985;368:99-108.
- Dawson TM, Golde TE. Animal models of neurodegenerative diseases. 2018;21(10):1370-1379.
- De Cristobal J, Moro MA, Davalos A, Castillo J, Leza JC, Camarero J i sar. Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 2001;79(2):456-459.
- Debonnel G, Beauchesne L, de Montigny C. Domoic acid, the alleged "mussel toxin," might produce its neurotoxic effect through kainate receptor activation: an electrophysiological study in the dorsal hippocampus. *Can J Physiol Pharmacol* 1989;67(1):29-33.
- Dick F, Kelly JS. L-2,4-diaminobutyric acid (L-DABA) as a selective marker for inhibitory nerve terminals in rat brain. *Br J Pharmacol* 1975;53(3):439.
- Dierkes PW, Hochstrate P, Schlue WR. Distribution and functional properties of glutamate receptors in the leech central nervous system. *J Neurophysiol* 1996;75(6):2312-2321.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22(9):391-397.
- Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: implications for therapy. *Pharmacol Ther* 1999;81(3):163-221.
- Dong XX, Wang Y, Qin ZH. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2009;30(4):379-387.
- Dorner R, Ballanyi K, Schlue WR. Glutaminergic responses of neuropile glial cells and Retzius neurones in the leech central nervous system. *Brain Res* 1990;523(1):111-116.
- Dorner R, Zens M, Schlue WR. Effects of glutamatergic agonists and antagonists on membrane potential and intracellular Na<sup>+</sup> activity of leech glial and nerve cells. *Brain Res* 1994;665(1):47-53.
- Drobac D, Tokodi N, Simeunovic J, Baltic V, Stanic D, Svircev Z. Human exposure to cyanotoxins and their effects on health. *Arh Hig Rada Toksikol* 2013;64(2):119-130.

- Duncan MW, Steele JC, Kopin IJ, Markey SP. 2-Amino-3-(methylamino)-propanoic acid (BMAA) in cycad flour: an unlikely cause of amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia of Guam. *Neurology* 1990;40(5):767-772.
- Erecinska M, Troeger MB, Alston TA. Amino acid neurotransmitters in the CNS: properties of diaminobutyric acid transport. *J Neurochem* 1986;46(5):1452-1457.
- Ezza H, Khadrawy Y. Glutamate Excitotoxicity and Neurodegeneration. *J Mol Genet Med* 2014;8(4):141.
- Faassen EJ, Gillissen F, Zweers HA, Lurling M. Determination of the neurotoxins BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) and DAB (alpha-,gamma-diaminobutyric acid) by LC-MSMS in Dutch urban waters with cyanobacterial blooms. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10 Suppl 2:79-84.
- Fan H, Qiu J, Fan L, Li A. Effects of growth conditions on the production of neurotoxin 2,4-diaminobutyric acid (DAB) in *Microcystis aeruginosa* and its universal presence in diverse cyanobacteria isolated from freshwater in China. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015;22(8):5943-5951.
- Fan MM, Raymond LA. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor function and excitotoxicity in Huntington's disease. *Prog Neurobiol* 2007;81(5-6):272-293.
- Favaron M, Manev H, Siman R, Bertolino M, Szekely AM, DeErasquin G i sar. Down-regulation of protein kinase C protects cerebellar granule neurons in primary culture from glutamate-induced neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(5):1983-1987.
- Felle H. Stereospecificity and electrogenicity of amino acid transport in *Riccia fluitans*. *Planta* 1981;152(6):505-512.
- Ferrante RJ, Kowall NW, Cipolloni PB, Storey E, Beal MF. Excitotoxin lesions in primates as a model for Huntington's disease: histopathologic and neurochemical characterization. *Exp Neurol* 1993;119(1):46-71.
- Field NC, Metcalf JS, Caller TA, Banack SA, Cox PA, Stommel EW. Linking beta-methylamino-L-alanine exposure to sporadic amyotrophic lateral sclerosis in Annapolis, MD. *Toxicon* 2013;70:179-183.
- Foster JG. Flatpea (*Lathyrus Sylvestris* L.): A New Forage Species? A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy* 1990;43:241-313.
- Fowden L, Bryant M. Nitrogenous compounds and nitrogen metabolism in the Liliaceae. 4. Isolation of azetidine-2-carboxylic acid and evidence for the occurrence of alpha gamma-diaminobutyric acid in *Polygonatum*. *Biochem J* 1958;70(4):626-629.
- Gantar M, Svircev Z. Microalgae and Cyanobacteria: Food for thought. *J Phycol* 2008;44(2):260-268.

- Garruto RM, Y. Y. Neurodegenerative disorders of the western Pacific: the search for mechanisms of pathogenesis. *TINS* 1986;9:368-374.
- Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 1991;14(2):60-67.
- Glover WB, Baker TC, Murch SJ, Brown PN. Determination of beta-N-methylamino-L-alanine, N-(2-aminoethyl)glycine, and 2,4-diaminobutyric acid in Food Products Containing Cyanobacteria by Ultra-Performance Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry: Single-Laboratory Validation. *J AOAC Int* 2015;98(6):1559-1565.
- Greenwood SM, Connolly CN. Dendritic and mitochondrial changes during glutamate excitotoxicity. *Neuropharmacology* 2007;53(8):891-898.
- Harris M, Hopkin JM, Neal MJ. Effect of centrally acting drugs on the uptake of gamma-aminobutyric acid (GABA) by slices of rat cerebral cortex. *Br J Pharmacol* 1973;47(2):229-239.
- Haskew RE, Mongin AA, Kimelberg HK. Peroxynitrite enhances astrocytic volume-sensitive excitatory amino acid release via a src tyrosine kinase-dependent mechanism. *J Neurochem* 2002;82(4):903-912.
- Hazell AS, Itzhak Y, Liu H, Norenberg MD. 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) decreases glutamate uptake in cultured astrocytes. *J Neurochem* 1997;68(5):2216-2219.
- Hof PR, Nimchinsky EA, Buee-Scherrer V, Buee L, Nasrallah J, Hottinger AF i sar. Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam: quantitative neuropathology, immunohistochemical analysis of neuronal vulnerability, and comparison with related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol* 1994a;88(5):397-404.
- Hof PR, Perl DP, Loerzel AJ, Steele JC, Morrison JH. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia from Guam: differences in neurofibrillary tangle distribution and density in the hippocampal formation and neocortex. *Brain Res* 1994b;650(1):107-116.
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S. Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 1991;252(5007):851-853.
- Hugon J, Vallat JM, Spencer PS, Leboutet MJ, Barthe D. Kainic acid induces early and delayed degenerative neuronal changes in rat spinal cord. *Neurosci Lett* 1989;104(3):258-262.
- Ince P, Stout N, Shaw P, Slade J, Hunziker W, Heizmann CW i sar. Parvalbumin and calbindin D-28k in the human motor system and in motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1993;19(4):291-299.
- Inglefield JR, Schwartz-Bloom RD. Activation of excitatory amino acid receptors in the rat hippocampal slice increases intracellular Cl<sup>-</sup> and cell volume. *J Neurochem* 1998;71(4):1396-1404.

- Iversen LL, Johnston GA. GABA uptake in rat central nervous system: comparison of uptake in slices and homogenates and the effects of some inhibitors. *J Neurochem* 1971;18(10):1939-1950.
- Iwatsuki N, Petersen OH. Amino acid-evoked membrane potential and resistance changes in pancreatic acinar cells. *Pflugers Arch* 1980;386(2):153-159.
- James VA, Walker RJ. Structure-activity studies on an excitatory glutamate receptor of leech neurones [proceedings]. *Br J Pharmacol* 1978;62(3):432p-433p.
- James VA, Walker RJ. The ionic mechanism responsible for L-glutamate excitation of leech Retzius cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 1979;64(2):261-265.
- James VA, Sharma RP, Walker RJ, Wheal HV. Actions of glutamate, kainate, dihydrokainate and analogues on leech neurone acidic amino acid receptors. *Eur J Pharmacol* 1980a;62(1):35-39.
- James VA, Walker RJ, Wheal HV. Structure-activity studies on an excitatory receptor for glutamate on leech Retzius neurones. *Br J Pharmacol* 1980b;68(4):711-717.
- Johnston GA, Twitchin B. Stereospecificity of 2,4-diaminobutyric acid with respect to inhibition of 4-aminobutyric acid uptake and binding. *Br J Pharmacol* 1977;59(1):218-219.
- Jonasson S, Eriksson J, Berntzon L, Spacil Z, Ilag LL, Ronnevi LO i sar. Transfer of a cyanobacterial neurotoxin within a temperate aquatic ecosystem suggests pathways for human exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(20):9252-9257.
- Jones-Humble SA, Morgan PF, Cooper BR. The novel anticonvulsant lamotrigine prevents dopamine depletion in C57 black mice in the MPTP animal model of Parkinson's disease. *Life Sci* 1994;54(4):245-252.
- Karamyan VT, Speth RC. Animal models of BMAA neurotoxicity: a critical review. *Life Sci* 2008;82(5-6):233-246.
- Kennedy AJ, Neal MJ. Uptake systems for (-)-2,4-diaminobutyric acid in rat cerebral cortical slices [proceedings]. *Br J Pharmacol* 1977;61(3):477-478.
- Kennedy AJ, Neal MJ. Evidence for heterogeneity of L-2,4-diaminobutyric acid uptake in rat cortex. *Journal of Neurochemistry* 1978;30(2):459-463.
- Kerkut GA, Walker RJ. The action of acetylcholine, dopamine and 5-hydroxytryptamine on the spontaneous activity of the cells of Retzius of the leech, *Hirudo medicinalis*. *Br J Pharmacol Chemother* 1967;30(3):644-654.
- Kiedrowski L, Brooker G, Costa E, Wroblewski JT. Glutamate impairs neuronal calcium extrusion while reducing sodium gradient. *Neuron* 1994;12(2):295-300.
- Kiedrowski L, Czyz A, Baranauskas G, Li XF, Lytton J. Differential contribution of plasmalemmal Na/Ca exchange isoforms to sodium-dependent calcium influx and NMDA excitotoxicity in depolarized neurons. *J Neurochem* 2004;90(1):117-128.

- Kilb W, Schlue WR. Mechanism of the kainate-induced intracellular acidification in leech Retzius neurons. *Brain Res* 1999;824(2):168-182.
- Kisby GE, Ellison M, Spencer PS. Content of the neurotoxins cycasin (methylazoxymethanol beta-D-glucoside) and BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in cycad flour prepared by Guam Chamorros. *Neurology* 1992;42(7):1336-1340.
- Kristan WB, Jr., Calabrese RL, Friesen WO. Neuronal control of leech behavior. *Prog Neurobiol* 2005;76(5):279-327.
- Kruger T, Monch B, Oppenhauser S, Luckas B. LC-MS/MS determination of the isomeric neurotoxins BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in cyanobacteria and seeds of *Cycas revoluta* and *Lathyrus latifolius*. *Toxicon* 2010;55(2-3):547-557.
- Kurland LT, Mulder DW. Epidemiologic investigations of amyotrophic lateral sclerosis. I. Preliminary report on geographic distribution and special reference to the Mariana Islands, including clinical and pathologic observations. *Neurology* 1954;4(6):438-448.
- Kurland LT. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. *Trends Neurosci* 1988;11(2):51-54.
- Kuzuhara S, Kokubo Y. Atypical parkinsonism of Japan: amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia complex of the Kii peninsula of Japan (Muro disease): an update. *Mov Disord* 2005;20 Suppl 12:S108-113.
- Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* 1996;347(9013):1425-1431.
- Lee HC, Galione A, Walseth TF. Cyclic ADP-ribose: metabolism and calcium mobilizing function. *Vitam Horm* 1994;48:199-257.
- Lehotsky J, Kaplan P, Murin R, Raeymaekers L. The role of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pumps (PMCA) in pathologies of mammalian cells. *Front Biosci* 2002;7:d53-84.
- Lent CM. Retzius cells: neuroeffectors controlling mucus release by the leech. *Science* 1973;179(4074):693-696.
- Lent CM. The Retzius cells within the central nervous system of leeches. *Prog Neurobiol* 1977;8(2):81-117.
- Li A, Fan H, Ma F, McCarron P, Thomas K, Tang X i sar. Elucidation of matrix effects and performance of solid-phase extraction for LC-MS/MS analysis of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and 2,4-diaminobutyric acid (DAB) neurotoxins in cyanobacteria. *Analyst* 2012;137(5):1210-1219.

- Li A, Song J, Hu Y, Deng L, Ding L, Li M. New Typical Vector of Neurotoxin beta-N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) in the Marine Benthic Ecosystem. *Mar Drugs* 2016;14(11):E202.
- Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E. Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997;56(8):901-911.
- Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L i sar. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* 1998;20(3):589-602.
- Lobner D, Piana PM, Salous AK, Peoples RW. Beta-N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiol Dis* 2007;25(2):360-366.
- Lobner D. Mechanisms of beta-N-methylamino-L-alanine induced neurotoxicity. *Amyotroph Lateral Scler* 2009;10 Suppl 2:56-60.
- Lohrke S, Deitmer JW. Kainate responses of leech Retzius neurons in situ and in vitro. *J Neurobiol* 1996;31(3):345-358.
- Lopicic S, Cemerikic D, Pavlovic D, Wendt M, Grgurevic M, Ristanovic D. Excitatory effect of beta-N-methylamino-L-aspartate on Retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. *European Journal of Neurology* 2002:139.
- Lopicic S, Nedeljkov V, Cemerikic D. Augmentation and ionic mechanism of effect of beta-N-methylamino-L-alanine in presence of bicarbonate on membrane potential of Retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2009a;153(3):284-292.
- Lopicic S, Nedeljkov V, Cemerikic D, Dudvarski Z, Pavlovic D, Cutura N. Comparison of effects of endogenous and exogenous excitatory amino acids on Retzius nerve cells of the leech. *Folia Biol (Krakow)* 2009b;57(1-2):83-90.
- Lopičić S. Intraćelijska studija neurotoksičnog efekta ekscitatornih aminokiselina na Retziusove živčane ćelije [magistarska teza]. Beograd: Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2004.
- Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 1957;58(2):193-201.
- Mackenzie B, Schafer MK, Erickson JD, Hediger MA, Weihe E, Varoqui H. Functional properties and cellular distribution of the system A glutamine transporter SNAT1 support specialized roles in central neurons. *J Biol Chem* 2003;278(26):23720-23730.
- Mackenzie B, Erickson JD. Sodium-coupled neutral amino acid (System N/A) transporters of the SLC38 gene family. *Pflugers Arch* 2004;447(5):784-795.

- Main BJ, Bowling LC, Padula MP, Bishop DP, Mitrovic SM, Guillemin GJ i sar. Detection of the suspected neurotoxin beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in cyanobacterial blooms from multiple water bodies in Eastern Australia. *Harmful Algae* 2018;74:10-18.
- Masseret E, Banack S, Boumediene F, Abadie E, Brient L, Pernet F i sar. Dietary BMAA exposure in an amyotrophic lateral sclerosis cluster from southern France. *PLoS One* 2013;8(12):e83406. doi:10.1371/journal.pone.0083406
- Mat Jais AM, Kerkut GA, Walker RJ. The ionic mechanism associated with the biphasic glutamate response on leech retzius cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 1983;74(2):425-432.
- Mat Jais AM, Kerkut GA, Walker RJ. The ionic mechanisms associated with the excitatory response of kainate, L-glutamate, quisqualate, ibotenate, AMPA and methyltetrahydrofolate on leech Retzius cells. *Comp Biochem Physiol C* 1984;77(1):115-126.
- Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J Neurosci* 1992;12(2):376-389.
- McCarron P, Logan AC, Giddings SD, Quilliam MA. Analysis of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) in spirulina-containing supplements by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Aquat Biosyst* 2014;10:5.
- Meldrum BS. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 2000;130(4S Suppl):1007s-1015s.
- Metcalf JS, Banack SA, Kotut K, Krienitz L, Codd GA. Amino acid neurotoxins in feathers of the Lesser Flamingo, *Phoeniconaias minor*. *Chemosphere* 2013;90(2):835-839.
- Metcalf JS, Banack SA, Richer R, Cox PA. Neurotoxic amino acids and their isomers in desert environments. *Journal of Arid Environments* 2015;112:140-144.
- Mills LR, Kater SB. Neuron-specific and state-specific differences in calcium homeostasis regulate the generation and degeneration of neuronal architecture. *Neuron* 1990;4(1):149-163.
- Mulder DW, Kurland LT. Motor neuron disease: epidemiologic studies. *Adv Exp Med Biol* 1987;209:325-332.
- Munsch T, Deitmer JW. Maintenance of Fura-2 fluorescence in glial cells and neurons of the leech central nervous system. *J Neurosci Methods* 1995;57(2):195-204.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA. A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004a;101(33):12228-12231.
- Murch SJ, Cox PA, Banack SA, Steele JC, Sacks OW. Occurrence of beta-methylamino-l-alanine (BMAA) in ALS/PDC patients from Guam. *Acta Neurol Scand* 2004b;110(4):267-269.

- Naeslund G, Lindqvist I, Ronquist G, Nilson BO. The effect of alpha-aminoisobutyric acid and 2,4-diaminobutyric acid on mouse blastocyst outgrowth in vitro. *Acta Physiol Scand* 1979;107(1):57-61.
- Nakajima T, Wolfgram F, Clark WG. Identification of 1,4-methylhistamine, 1,3-diaminopropane and 2,4-diaminobutyric acid in bovine brain. *J Neurochem* 1967;14(12):1113-1118.
- Nakamura R, Kamakura K, Kwak S. Late-onset selective neuronal damage in the rat spinal cord induced by continuous intrathecal administration of AMPA. *Brain Res* 1994;654(2):279-285.
- Nedeljkov V, Lekic D, Beleslin B. Does Lathyrus sativus neurotoxin has a direct effect on Retzius nerve cells of the leech. *Period. Biol.* 1979;81:658-659.
- Nedeljkov V, Lopacic S, Pavlovic D, Cemerikic D. Electrophysiological effect of beta-N-methylamino-L-alanine on retzius nerve cells of the leech *Haemopsis sanguisuga*. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1048:349-351.
- Nicholls JG, Kuffler SW. Extracellular space as a pathway for exchange between blood and neurons in the central nervous system of the leech: ionic composition of glial cells and neurons. *J Neurophysiol* 1964;27:645-671.
- Nunn PB, O'Brien P. The interaction of beta-N-methylamino-L-alanine with bicarbonate: an <sup>1</sup>H-NMR study. *FEBS Lett* 1989;251(1-2):31-35.
- O'Neal RM, Chen CH, Reynolds CS, Meghal SK, Koeppe RE. The 'neurotoxicity' of L-2,4-diaminobutyric acid. *Biochem J* 1968;106(3):699-706.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C i sar. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Mov Disord* 2008;23 Suppl 3:S548-559.
- Olney JW. Neurotoxicity of excitatory amino acids. U: McGeer EG, Olney JW, McGeer PL, urednik. *Kainic Acid as a Tool in Neurobiology*. New York: Raven Press; 1978. p. 95-121.
- Olney JW, Wozniak DF, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and Alzheimer's disease. *Restor Neurol Neurosci* 1998;13(1-2):75-83.
- Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989;10(7):281-285.
- Pablo J, Banack SA, Cox PA, Johnson TE, Papapetropoulos S, Bradley WG i sar. Cyanobacterial neurotoxin BMAA in ALS and Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand* 2009;120(4):216-225.
- Pai KS, Shankar SK, Ravindranath V. Billion-fold difference in the toxic potencies of two excitatory plant amino acids, L-BOAA and L-BMAA: biochemical and morphological studies using mouse brain slices. *Neurosci Res* 1993;17(3):241-248.
- Palacin M, Estevez R, Bertran J, Zorzano A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiol Rev* 1998;78(4):969-1054.



- Pan M, Mabry TJ, Cao P, Moini M. Identification of nonprotein amino acids from cycad seeds as N-ethoxycarbonyl ethyl ester derivatives by positive chemical-ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1997;787(1-2):288-294.
- Panasci L, McQuillan A, Feindel W. The cytolytic effect of L-2,4 diaminobutyric acid with malignant glioma cells and fibroblasts. *Cancer Chemother Pharmacol* 1988;21(2):143-144.
- Paschen W. Endoplasmic reticulum: a primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium* 2003;34(4-5):365-383.
- Perkins HR, Cummins CS. Chemical structure of bacterial cell walls. Ornithine and 2,4-diaminobutyric acid as components of the cell walls of plant pathogenic corynebacteria. *Nature* 1964;201:1105-1107.
- Pisharodi M, Nauta HJ. An animal model for neuron-specific spinal cord lesions by the microinjection of N-methylaspartate, kainic acid, and quisqualic acid. *Appl Neurophysiol* 1985;48(1-6):226-233.
- Plaitakis A, Constantakakis E, Smith J. The neuroexcitotoxic amino acids glutamate and aspartate are altered in the spinal cord and brain in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1988;24(3):446-449.
- Plato CC, Garruto RM, Galasko D, Craig UK, Plato M, Gamst A i sar. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam: changing incidence rates during the past 60 years. *Am J Epidemiol* 2003;157(2):149-157.
- Prehn JH, Lippert K, Kriegstein J. Are NMDA or AMPA/kainate receptor antagonists more efficacious in the delayed treatment of excitotoxic neuronal injury? *Eur J Pharmacol* 1995;292(2):179-189.
- Preston RL, Stevens BR. Kinetic and Thermodynamic Aspects of Sodium-Coupled Amino Acid Transport by Marine Invertebrates1. *Integrative and Comparative Biology* 2015;22(3):709-721.
- Rakonczay Z, Matsuoka Y, Giacobini E. Effects of L-beta-N-methylamino-L-alanine (L-BMAA) on the cortical cholinergic and glutamatergic systems of the rat. *J Neurosci Res* 1991;29(1):121-126.
- Rao SD, Banack SA, Cox PA, Weiss JH. BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Exp Neurol* 2006;201(1):244-252.
- Reimer RJ, Chaudhry FA, Gray AT, Edwards RH. Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(14):7715-7720.
- Ressler C, Redstone PA, Erenberg RH. Isolation and identification of a neuroactive factor from *Lathyrus latifolius*. *Science* 1961;134(3473):188-190.
- Ressler C. Neurotoxic amino acids of certain species of *Lathyrus* and *Vetch*. *Fed Proc* 1964;23:1350-1353.

- Reveillon D, Abadie E, Sechet V, Brient L, Savar V, Bardouil M i sar. Beta-N-methylamino-L-alanine: LC-MS/MS optimization, screening of cyanobacterial strains and occurrence in shellfish from Thau, a French Mediterranean lagoon. *Mar Drugs* 2014;12(11):5441-5467.
- Reveillon D, Abadie E, Sechet V, Masseret E, Hess P, Amzil Z. beta-N-methylamino-l-alanine (BMAA) and isomers: Distribution in different food web compartments of Thau lagoon, French Mediterranean Sea. *Mar Environ Res* 2015;110:8-18.
- Reveillon D, Sechet V, Hess P, Amzil Z. Systematic detection of BMAA (beta-N-methylamino-l-alanine) and DAB (2,4-diaminobutyric acid) in mollusks collected in shellfish production areas along the French coasts. *Toxicon* 2016;110:35-46.
- Richer R, Banack SA, Metcalf JS, Cox PA. The persistence of cyanobacterial toxins in desert soils. *Journal of Arid Environments* 2015;112:134-139.
- Riggs TR, Coyne BA, Christensen HN. Amino acid concentration by a free cell neoplasm; structural influences. *J Biol Chem* 1954;209(1):395-411.
- Ronquist G, Hugosson R, Westermark B. Antitumor activity of L-2,4 diaminobutyric acid against mouse fibrosarcoma cells in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol* 1980;96(3):259-268.
- Ronquist G, Westermark B, Hugosson R. Induction of complete and irreversible damage to malignant glioma cells by L-2,4 diaminobutyric acid. *Anticancer Res* 1984;4(4-5):225-228.
- Ronquist G, Hugosson R, Sjolander U, Ungerstedt U. Treatment of malignant glioma by a new therapeutic principle. *Acta Neurochir (Wien)* 1992;114(1-2):8-11.
- Rosen J, Hellenas KE. Determination of the neurotoxin BMAA (beta-N-methylamino-L-alanine) in cycad seed and cyanobacteria by LC-MS/MS (liquid chromatography tandem mass spectrometry). *Analyst* 2008;133(12):1785-1789.
- Roskoski R, Jr. Comparison of DABA and GABA transport into plasma membrane vesicles derived from synaptosomes. *J Neurochem* 1981;36(2):544-550.
- Rothman SM. The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 1985;5(6):1483-1489.
- Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB i sar. Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1990;28(1):18-25.
- Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 1992;326(22):1464-1468.
- Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M, Kuncl RW. Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(14):6591-6595.

- Roy-Lachapelle A, Sollic M, Sauve S. Determination of BMAA and three alkaloid cyanotoxins in lake water using dansyl chloride derivatization and high-resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2015;407(18):5487-5501.
- Salinska E, Danysz W, Lazarewicz JW. The role of excitotoxicity in neurodegeneration. *Folia Neuropathol* 2005;43(4):322-339.
- Sawyer R. Nervous system. U: Sawyer R, urednik. Leech biology and behavior. Oxford: Clarendon press; 1986. p. 163-222.
- Schwarcz R, Foster AC, French ED, Whetsell WO, Jr., Kohler C. Excitotoxic models for neurodegenerative disorders. *Life Sci* 1984;35(1):19-32.
- Schwarcz R, Okuno E, White RJ, Bird ED, Whetsell WO, Jr. 3-Hydroxyanthranilate oxygenase activity is increased in the brains of Huntington disease victims. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(11):4079-4081.
- Scimemi A, Meabon JS, Woltjer RL, Sullivan JM, Diamond JS, Cook DG. Amyloid-beta1-42 slows clearance of synaptically released glutamate by mislocalizing astrocytic GLT-1. *J Neurosci* 2013;33(12):5312-5318.
- Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* 1995;4(2):209-216.
- Siman R, Noszek JC, Kegerise C. Calpain I activation is specifically related to excitatory amino acid induction of hippocampal damage. *J Neurosci* 1989;9(5):1579-1590.
- Simon JR, Martin DL. The effects of L-2,4-diaminobutyric acid on the uptake of gamma-aminobutyric acid by a synaptosomal fraction from rat brain. *Arch Biochem Biophys* 1973;157(2):348-355.
- Spacil Z, Eriksson J, Jonasson S, Rasmussen U, Ilag LL, Bergman B. Analytical protocol for identification of BMAA and DAB in biological samples. *Analyst* 2010;135(1):127-132.
- Spasic S, Stanojevic M, Nesovic Ostojic J, Kovacevic S, Prostran M, Lopicic S. Extensive depolarization and lack of recovery of leech Retzius neurons caused by 2,4 diaminobutyric acid. *Aquat Toxicol* 2018;199:269-275.
- Spasic S, Stanojevic M, Nesovic Ostojic J, Kovacevic S, Todorovic J, Dincic M i sar. Two distinct electrophysiological mechanisms underlie extensive depolarization elicited by 2,4 diaminobutyric acid in leech Retzius neurons. *Aquat Toxicol* 2019;220:105398. doi:10.1016/j.aquatox.2019.105398
- Spencer PS, Nunn PB, Hugon J, Ludolph AC, Ross SM, Roy DN i sar. Guam amyotrophic lateral sclerosis-parkinsonism-dementia linked to a plant excitant neurotoxin. *Science* 1987a;237(4814):517-522.

- Spencer PS, Ohta M, Palmer VS. Cycad use and motor neurone disease in Kii peninsula of Japan. *Lancet* 1987b;2(8573):1462-1463.
- Spencer PS, Palemr VS, Herman A, Asmedi A. Cycad use and motor neuron disease in Irian Jaya. *Lancet* 1987c;2:1273-1274.
- Staton PC, Bristow DR. The dietary excitotoxins beta-N-methylamino-L-alanine and beta-N-oxalylamino-L-alanine induce necrotic- and apoptotic-like death of rat cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1997;69(4):1508-1518.
- Strain GM, Flory W, Tucker TA. Inhibition of synaptosomal uptake of amino acid transmitters by diamines. *Neuropharmacology* 1984;23(8):971-975.
- Sutton I, Simmonds MA. The selective blockade by diaminobutyric acid of neuronal uptake of (3H)GABA in rat brain in vivo. *J Neurochem* 1974;23(1):273-274.
- Takser L, Benachour N, Husk B, Cabana H, Gris D. Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects in murine brain cells: Potential implications for neurodegenerative diseases. *Toxicol Rep* 2016;3:180-189.
- Takuma H, Kwak S, Yoshizawa T, Kanazawa I. Reduction of GluR2 RNA editing, a molecular change that increases calcium influx through AMPA receptors, selective in the spinal ventral gray of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 1999;46(6):806-815.
- Talantova M, Sanz-Blasco S, Zhang X, Xia P, Akhtar MW, Okamoto S i sar. Abeta induces astrocytic glutamate release, extrasynaptic NMDA receptor activation, and synaptic loss. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(27):E2518-2527.
- Thorogood MS, Almeida VW, Brodfuehrer PD. Glutamate receptor 5/6/7-like and glutamate transporter-1-like immunoreactivity in the leech central nervous system. *J Comp Neurol* 1999;405(3):334-344.
- Tsai GC, Stauch-Slusher B, Sim L, Hedreen JC, Rothstein JD, Kuncl R i sar. Reductions in acidic amino acids and N-acetylaspartylglutamate in amyotrophic lateral sclerosis CNS. *Brain Res* 1991;556(1):151-156.
- Ungerstedt U, Ljungberg T, Steg G. Behavioral, physiological, and neurochemical changes after 6-hydroxydopamine-induced degeneration of the nigro-striatal dopamine neurons. *Adv Neurol* 1974;5:421-426.
- Urca G, Urca R. Neurotoxic effects of excitatory amino acids in the mouse spinal cord: quisqualate and kainate but not N-methyl-D-aspartate induce permanent neural damage. *Brain Res* 1990;529(1-2):7-15.
- Van Den Bosch L, Vandenberghe W, Klaassen H, Van Houtte E, Robberecht W. Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci* 2000;180(1-2):29-34.

- Van den Bosch L, Van Damme P, Vleminckx V, Van Houtte E, Lemmens G, Missiaen L i sar. An alpha-mercaptoacrylic acid derivative (PD150606) inhibits selective motor neuron death via inhibition of kainate-induced Ca<sup>2+</sup> influx and not via calpain inhibition. *Neuropharmacology* 2002;42(5):706-713.
- Van Den Bosch L, Van Damme P, Bogaert E, Robberecht W. The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2006;1762(11-12):1068-1082.
- Van Raamsdonk JM, Pearson J, Rogers DA, Bissada N, Vogl AW, Hayden MR i sar. Loss of wild-type huntingtin influences motor dysfunction and survival in the YAC128 mouse model of Huntington disease. *Hum Mol Genet* 2005;14(10):1379-1392.
- VanEtten CH, Miller RW. The neuroactive factor alpha-gamma diaminobutyric acid in angiospermous seeds. *Economic Botany* 1963;17(2):107-109.
- Vega A, Bell EA.  $\alpha$ -amino- $\beta$ -methylaminopropionic acid, a new amino acid from seeds of *Cycas circinalis*. *Phytochemistry* 1967;6:759-762.
- Vega A, Bell EA, Nunn PB. The preparation of L- and D-alpha-aminobeta-methylaminopropionic acids and the identification of the compound isolated from *Cycas circinalis* as the L-isomer. *Phytochemistry* 1968:1885-1887.
- Velliquette RA, O'Connor T, Vassar R. Energy inhibition elevates beta-secretase levels and activity and is potentially amyloidogenic in APP transgenic mice: possible early events in Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* 2005;25(47):10874-10883.
- Vivanco F, Ramos F, Jimenez-Diaz C. Determination of gamma-aminobutyric acid and other free amino acids in whole brains of rats poisoned with beta, beta'-iminodipropionitrile and alpha, gamma-diaminobutyric acid with, or without, administration of thyroxine. *J Neurochem* 1966;13(12):1461-1467.
- Weiss JH, Choi DW. Beta-N-methylamino-L-alanine neurotoxicity: requirement for bicarbonate as a cofactor. *Science* 1988;241(4868):973-975.
- Weiss JH, Christine CW, Choi DW. Bicarbonate dependence of glutamate receptor activation by beta-N-methylamino-L-alanine: channel recording and study with related compounds. *Neuron* 1989a;3(3):321-326.
- Weiss JH, Koh JY, Choi DW. Neurotoxicity of beta-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and beta-N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Res* 1989b;497(1):64-71.
- Weitsch-Dick F, Jessell TM, Kelly JS. The selective neuronal uptake and release of [3H]DL-2,4-diaminobutyric acid by rat cerebral cortex. *J Neurochem* 1978;30(4):799-806.
- Wenk GL, Danysz W, Mobley SL. Investigations of neurotoxicity and neuroprotection within the nucleus basalis of the rat. *Brain Res* 1994;655(1-2):7-11.

Zhang Z, Grewer C. The sodium-coupled neutral amino acid transporter SNAT2 mediates an anion leak conductance that is differentially inhibited by transported substrates. *Biophysical journal* 2007;92(7):2621-2632.

Zhang Z, Albers T, Fiumera HL, Gameiro A, Grewer C. A conserved Na<sup>(+)</sup> binding site of the sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2). *J Biol Chem* 2009;284(37):25314-25323.

## SPISAK SKRAĆENICA

<b>2,4-DABA, DABA</b>	2,4-diaminobuterna kiselina
<b>6-OHDA</b>	6-hidroksidopamin
<b>AD</b>	Alchajmerova bolest
<b>AEG</b>	N-2-aminoetil glicin
<b>ALS</b>	Amiotrofična lateralna skleroza
<b>ALS/PDC</b>	kompleks amiotrofična lateralna skleroza- parkinsonizam/demencija
<b>AMPA</b>	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionat
<b>AP5</b>	D-2-amino-5-fosfonopentanoična kiselina
<b>AP-7</b>	D-2-amino-7-fisfonoheptanoična kiselina
<b>A<math>\beta</math></b>	$\beta$ -amiloidni peptid
<b>BMAA</b>	$\beta$ -N-metilamino-L-alanin
<b>BOAA</b>	$\beta$ -N-oksalilamino-L-alanin
<b>CNQX</b>	6-cijano-7-nitrokvinksalin-2,3-dion
<b>CPP</b>	3-(2-Karboksipiperazin-4-il)propil-1-fosfonat
<b>DAPA</b>	2,3-diaminopropionat
<b>DNQX</b>	6,7-dinitrokvinksalin-2,3-dion
<b>EAAT</b>	transporter ekscitatornih aminokiselina
<b>GABA</b>	$\gamma$ -aminobuterna kiselina
<b>GLT</b>	glutamatni transporter
<b>HABs</b>	štetne cvasti modrozelenih algi (cijanobakterija)
<b>HD</b>	Hantingtonova bolest
<b>htt</b>	hantingtin gen
<b>iGluR</b>	jontorjni glutamatni receptor
<b>IP3</b>	inozitol-3-fosfat
<b>LDH</b>	laktatna dehidrogenaza
<b>MeAIB</b>	2-metilamino izobutirat
<b>mGluR</b>	metabotropni glutamatni receptor
<b>MPP+</b>	1-metil-4-fenilpiridinijum
<b>MPTP</b>	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
<b>MSN</b>	trnasti neuroni srednje veličine
<b>NAA</b>	N-acetil-aspartat
<b>NAAG</b>	N-acetil-aspartil-glutamat
<b>NBM</b>	<i>nucleus basalis Meynert</i>

<b>NFT</b>	neurofibrilarna klubad
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartat
<b>NR1, NR2</b>	subjedinice glutamatnih jonotropnih receptora
<b>PD</b>	Parkinsonova bolest
<b>PKC</b>	protein-kinaza C
<b>PLA2</b>	fosfolipaza A2
<b>PMCA</b>	Ca <sup>2+</sup> ATP-azna pumpa plazma membrane
<b>PSD-95</b>	postsinaptički protein 95 kDa
<b>ROS</b>	reaktivna jedinjanja kiseonika
<b>sALS</b>	sporadična amiotrofična lateralna skleroza
<b>SERCA</b>	Ca <sup>2+</sup> ATP-azna pumpa sarkoplazmatskog retikuluma
<b>SNAT</b>	natrijum-zavisni transporter za neutralne aminokiseline
<b>SOD</b>	superosid dizmutaza
<b>TEA</b>	tetraetilamonijum
<b>TRIS</b>	tris(hidroksimetil)aminometan-hlorid
<b>TSA</b>	transportni sistem A
<b>UOM</b>	ulazni otpor membrane



## BIOGRAFIJA AUTORA

Svetolik Spasić, rođen je 03.09.1986. godine u Čačku. Integrisane akademske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu upisao je akademske 2005/2006. godine. Diplomirao je u septembru 2011. godine sa prosečnom ocenom 9,81. Nakon završenog lekarskog staža položio je državni ispit u maju 2012. godine i stekao zvanje doktora medicine. Radio je kao klinički lekar – volonter na Klinici za neurohirurgiju Kliničkog centra Srbije do aprila 2014. godine. U periodu od aprila 2013. godine do septembra 2014. godine bio je angažovan na naučnoistraživačkom projektu OI 175043 Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije na Institutu za medicinsku fiziologiju „Rihard Burian“, Medicinskog fakulteta u Beogradu. Akademske 2014/2015. godine upisao je doktorske akademske studije na smeru Fiziološke nauke na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom prof. dr Srđana Lopičića. Dr Svetolik Spasić izabran je u zvanje saradnika u nastavi za užu naučnu oblast Patološka fiziologija na Medicinskom fakultetu u Beogradu u julu 2014. godine, a od septembra 2016. godine zaposlen je u zvanju asistenta na Institutu za patološku fiziologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Od decembra 2018. godine angažovan je kao istraživač pripravnik na projektu Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije „Bazična i kliničko-farmakološka istraživanja mehanizama dejstva i interakcija lekova u nervnom i kardiovaskularnom sistemu“ pri Institutu za farmakologiju, kliničku farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Član je Srpskog lekarskog društva, Društva za neuronauke Srbije, Društva biofizičara Srbije i Evropske Asocijacije lekara doktoranada, u kojoj zvanično predstavlja Republiku Srbiju.

Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora Svetolik Spasić

Broj indeksa FN-11/13

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

EKSCITATORNO DEJSTVO 2,4-DIAMINO BUTERNE KISELINE NA RETZIUS-OVE NEURONE  
I MEHANIZMI NJEGOVOG NASTANKA

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za sticanje druge diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova;
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis autora**

U Beogradu, 21.01.2020.



Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Svetolik Spasić

Broj indeksa FN-11/13

Studijski program Doktorske akademske studije, modul Fiziološke nauke

Naslov rada EKSCITATORNO DEJSTVO 2,4-DIAMINO BUTERNE KISELINE NA  
RETZIUS-OVE NEURONE I MEHANIZMI NJEGOVOG DEJSTVA

Mentor Prof. dr Srđan Lopičić

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis autora**

U Beogradu, 21.01.2020.



### Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

EKSCITATORNO DEJSTVO 2,4-DIAMINO BUTERNE KISELINE NA RETZIUS-OVE NEURONE I MEHANIZMI NJEGOVOG DEJSTVA

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu i dostupnu u otvorenom pristupu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo (CC BY)

2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)

5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci.

Kratak opis licenci dat je na poledini lista).

**Potpis autora**

U Beogradu, 21.01.2020.

