

Tętnica ogona szczura — wciąż aktualny farmakometryczny model doświadczalny

Grzegorz Grzešek^{1, 2}, Ahmad El-Essa², Krzysztof Demidowicz² i Jacek Kubica²

¹Katedra i Zakład Farmakologii i Terapii *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

²Katedra i Klinika Kardiologii i Chorób Wewnętrznych *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Streszczenie

Model doświadczalny perfundowanej tętnicy ogonowej szczura pozwala ocenić zarówno zjawiska receptorowe, jak i dotyczące śródbłonna naczyniowego oraz mięśniówki gładkiej. Pod względem aktywności receptorów na powierzchni błony komórkowej mięśniówki gładkiej tętnica odpowiada drobnej tętnicy oporowej. Doświadczenia farmakometryczne dotyczące tętnicy ogonowej mogą opierać się na analizie ciśnienia perfuzyjnego jako wykładnika skurczu mięśniówki gładkiej lub bezpośrednio na skurczu izometrycznym. Model doświadczalny jest skutecznie stosowany i udoskonalany od ponad 30 lat — zmieniają się jedynie idee doświadczeń i używane odczynniki. (Folia Cardiologica Excerpta 2006; 1: 358–361)

Słowa kluczowe: tętnica ogonowa szczura, mięśniówka gładka, śródbłonek

Wstęp

Badania doświadczalne obejmujące podstawowe dziedziny medycyny zawsze stanowiły podwaliny dla nauk klinicznych. Wyniki prowadzonych doświadczeń pozwalają określić znaczenie procesów zachodzących w tkankach i narządach prowadzących do rozwoju schorzeń, a jednocześnie wskazują potencjalne kierunki działań terapeutycznych.

Ze względu na częstość występowania chorób układu sercowo-naczyniowego i ich olbrzymie konsekwencje — nie tylko zdrowotne, ale także społeczne i ekonomiczne — naczynia krwionośne są obiektem szczególnego zainteresowania naukowców.

W strukturze ściany naczyń krwionośnych tętnic i żył można wyróżnić 3 warstwy: błonę wewnętrzną, środkową oraz przydanekę.

Tętnice można podzielić na 3 rodzaje:

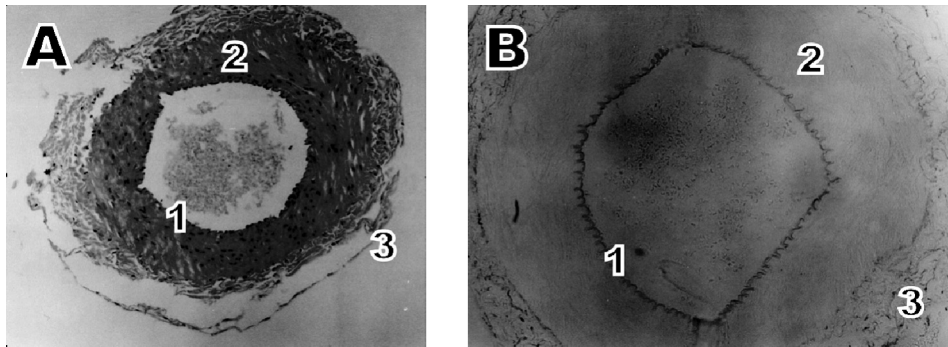
- typu sprężystego, czyli naczynia tętnicze duże (np. aorta, tętnica udowa);
- typu mięśniowego, czyli naczynia tętnicze średnie (np. tętnica wieńcowa);
- małe, czyli tętniczki.

Podział ten opiera się na różnicach w strukturze ściany tętnic oraz ich średnicy [1, 2].

Tętnica ogonowa szczura pod względem budowy anatomicznej i aktywności układów receptorowych odpowiada małej tętnicy oporowej. Średnica tętnic małego kalibru to ok. 0,1–1 mm (ryc. 1).

Podstawą badań prowadzonych na tętnicy ogonowej jako na modelu doświadczalnym drobnej tętnicy oporowej może być określenie ciśnienia perfuzyjnego lub bezpośrednie pomiary zmian napięcia mięśniówki gładkiej. Samą metodykę opisano ponad 30 lat temu; ciągle jest ona udoskonalana, a obecnie model doświadczalny perfundowanej tętnicy można uznać za jeden z lepiej i dogłębniej opracowanych [3–6]. Pomiar ciśnienia perfuzyjnego prawdopodobnie jest metodą bardziej zbliżoną do warunków rzeczywistych. Ponadto perfuzatem, oprócz zwykle stosowanych różnych odmian płynu Krebsa, może być dowolny płyn, w tym krew.

Adres do korespondencji: Dr med. Grzegorz Grzešek
 Katedra i Klinika Kardiologii i Chorób Wewnętrznych
Collegium Medicum UMK
 ul. M. Skłodowskiej-Curie 9, 85–094 Bydgoszcz
 tel. (0 52) 585 40 23, faks (0 52) 585 40 24
 e-mail: ggrzesk@cm.umk.pl
 Nadesłano: 5.10.2006 r. Przyjęto do druku: 10.10.2006 r.



Rycina 1. Budowa tętnicy ogonowej szczura; 1 — śródbłonek naczyniowy; 2 — błona mięśniowa; 3 — tkanki otaczające. Tętnica barwiona hematoksyliną i eozyną (A) oraz orceiną (B)

Pomiar skurczu izometrycznego wymaga odpowiedniego przygotowania preparatu. Zwykle tętnicę tnie się na pierścienie, a następnie mocuje w układzie pomiarowym. Pewien problem mogą stanowić doświadczenia, których celem jest ocena funkcji śródbłonka naczyniowego. Przygotowywanie preparatu do badania skurczu izometrycznego może doprowadzić do uszkodzenia śródbłonka naczyniowego. W przypadku badania perfuzji łatwiej przygotować preparat z prawidłowo działającym śródbłonkiem naczyniowym. Ponadto równie łatwo przygotować preparaty pozbawione (chemicznie lub mechanicznie) śródbłonka naczyniowego.

Tętnica ogonowa jest doskonałym naczyniem do badań, w których wykładnikiem skurczu mięśniówki gładkiej naczynia jest ciśnienie perfuzyjne, gdyż można w jej przebiegu łatwo odnaleźć 2–3-centymetrowy odcinek bez znaczących odgałęzień.

Preparowanie i przygotowanie materiału

Do badań na perfundowanych tętnicach ogonowych szczurów przygotowuje się grupę samców o masie ciała 220–270 g. Tętnicę pobiera się w głębokiej narkozie uretanowej (120 mg/kg i.p.), a po pobraniu narządów zwierzęta uśmierca się przez skrwawianie. Następnie tętnice ogonowe szczura oczyszcza się z otaczających tkanek.

Przygotowanie preparatu do perfuzji tętnicy wymaga kaniulowania proksymalnego odcinka o długości ok. 2–3 cm, a następnie umieszczenia go w pozycji pionowej w naczyniu do narządów izolowanych z zastosowaniem ustalonego doświadczenie napięcia spoczynkowego. W doświadczeniach przeprowadzanych przez autorów niniejszej pracy stosuje się napięcie spoczynkowe wynoszące ok. 0,5 g [3–6]. We wstępnej fazie eksperymentu naczynia stabilizuje się przez ok. 2 godziny w natlenionym płynie Krebsa (pH 7,4; temp. 37,0°C),

stopniowo zwiększając przepływ perfuzatu w zakresie 0,25–1,0 ml/min aż do osiągnięcia ciśnienia perfuzyjnego 2–4 kPa. Schemat układu przedstawiono na rycinie 2 [4–6]. Wygodną metodą przygotowania preparatów tętnicy pozbawionej śródbłonka naczyniowego jest zastosowanie powietrza. Brak śródbłonka potwierdza obecność skurczu naczynia po podaniu acetylocholinie [7].

Wyznaczanie krzywych zależności efektu od stężenia agonisty

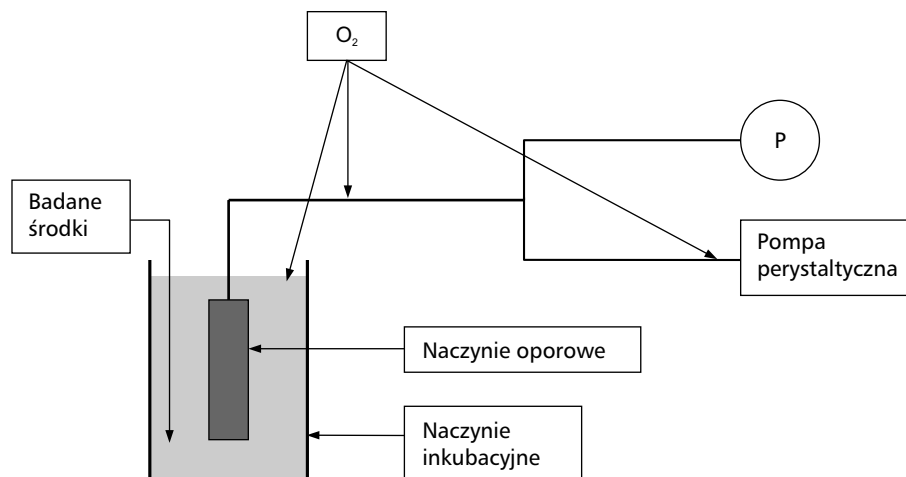
Za wykładnik skurczu naczyń w odpowiedzi na stymulację agonistą przyjmuje się zmianę ciśnienia perfuzyjnego przy stałej prędkości przepływu perfuzatu (ok. 1 ml/min).

Reakcję skurczową tętnicy ogonowej szczura wywołuje się, podając agonistów receptorów lub aktywatory układów enzymatycznych w coraz większych stężeniach [8]. Następne, większe stężenie podaje się dopiero po osiągnięciu stanu równowagi na uprzednio podane stężenie. Serie doświadczeń powtarza się w 30-minutowych odstępach, aż do osiągnięcia stałej wrażliwości tkanki (ryc. 3) [8, 9].

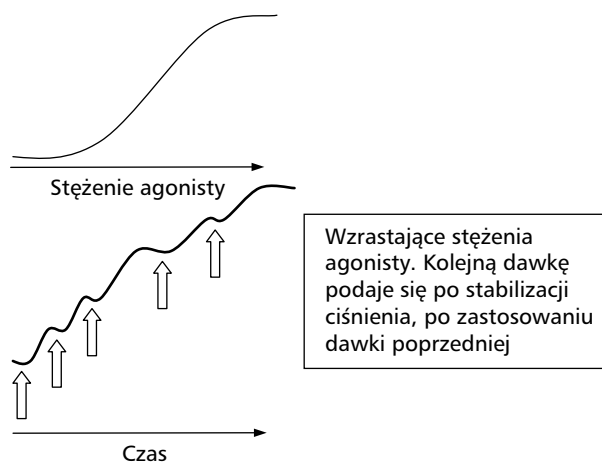
Poza krzywymi kontrolnymi wyznacza się krzywe w obecności badanych środków oddziałujących bezpośrednio lub pośrednio na funkcję układów receptorowych.

Badanie napływu wapnia z przestrzeni zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej

Badanie zależności efektu od aktywacji odpowiedniej frakcji wapnia komórkowego przeprowadza się na podstawie klasycznych metod farmakometrycznych, których istotą jest analiza efektu — skurczu mięśniówki gładkiej w następstwie aktywacji frakcji jonów wapnia pochodzących z zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowej frakcji jonów.



Rycina 2. Schemat układu do pomiaru ciśnienia perfuzyjnego w tętnicy. Ciśnienie perfuzyjne (P) jest wykładnikiem skurczu mięśniówki gładkiej naczynia przy stałym przepływie płynu perfuzyjnego. Badane środki podaje się do naczynia inkubacyjnego, czyli do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Wszystkie elementy układu zapewniają właściwe natlenienie stosowanych płynów, a także pozwalają utrzymać stałą temperaturę



Rycina 3. Schemat wyznaczania krzywej zależności efektu od stężenia agonisty

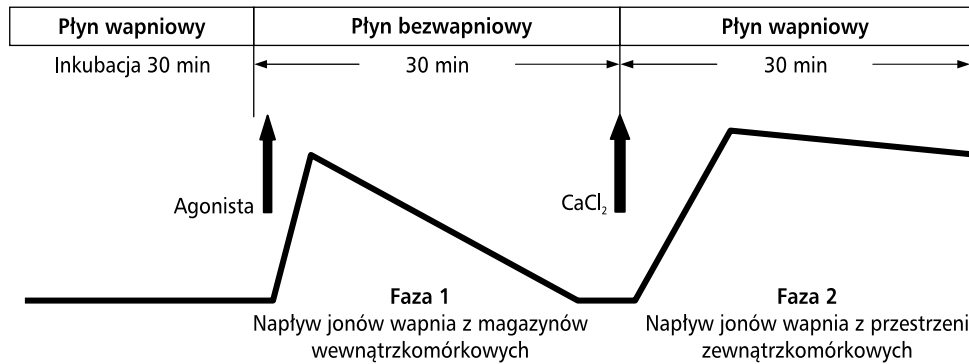
Po wstępnej, 30-minutowej inkubacji tkanki w płynie wapniowym Krebsa, której celem jest uzupełnienie wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia, tkankę umieszcza się w płynie Kresa — bezwapniowym z dodatkiem związku wiążącego jony wapniowe. Skurcz mięśniówki gładkiej wywołany przez aktywację receptora metabotropowego sprzężonego z fosfolipazą C jest następstwem wyłącznie uwolnienia jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów wapnia. Tę pierwszą fazę doświadczenia nazwano fazą I — związaną z aktywacją frakcji wapnia wewnątrzkomórkowego. Po opróżnieniu maga-

zynów wewnątrzkomórkowych wapnia, po ok. 30 minutach dodaje się do płynu inkubacyjnego chlorek wapnia. Skurcz będący następstwem wprowadzenia jonów wapnia do roztworu zależy od wielkości napływu wapnia z przestrzeni zewnątrzkomórkowej do cytoplazmy, gdyż kanały wapniowe błony cytoplazmatycznej zostały aktywowane po uprzednim podaniu agonisty. Siła skurczu mięśniówki gładkiej i przyrost ciśnienia perfuzyjnego odpowiada więc wielkości skurczu wywołanego wapniem pochodzącym z puli zewnątrzkomórkowej. Fazę tę określa się mianem fazy II — związaną z aktywacją wapnia zewnątrzkomórkowego (ryc. 4). Porównując wielkość skurczu wywołanego w odpowiednich fazach doświadczenia z wielkościami obserwowanymi w warunkach kontrolnych, można określić, czy badany czynnik modulujący wpływał bezpośrednio na wielkość napływu wapnia do cytoplazmy z odpowiedniej puli wapnia — zewnątrz- lub wewnątrzkomórkowej [10, 11].

Farmakometryczny opis reakcji receptorowej

Dodatkowe wnioski można uzyskać, stosując oprócz aktywacji receptora, agonistów lub antagonistów poszczególnych enzymów w układzie receptorem; wówczas można precyzyjnie określić element, na którego poziomie jest hamowane lub aktywowane przewodnictwo sygnału z receptora do efektoru.

Na podstawie danych uzyskanych w doświadczeniach można zidentyfikować parametry liczbowe



Rycina 4. Fazy skurczu mięśniówki gładkiej w zależności od aktywacji odpowiedniej frakcji jonów wapnia. Faza 1 — skurcz wywołany aktywacją wapnia wewnątrzkomórkowego; faza 2 — skurcz wywołany aktywacją wapnia zewnątrzkomórkowego

określające funkcję układu receptorowego, takie jak: EC_{50} , czyli wartość stężenia agonisty wywołająca odpowiedź równą 50% odpowiedzi maksymalnej, K_A — stała dysocjacji kompleksu agonista–receptor, K_B — stała dysocjacji kompleksu antagonisty–receptor. Uzyskane wartości umożliwiają określenie zależności K_A/EC_{50} będącej bardzo dobrym wykładnikiem liczbowym zmiany wielkości rezerwy receptorowej. Na podstawie znanej wartości K_A można także wyznaczyć zależności efektu stymulacji od względnej frakcji receptorów wiążących się z agonistą.

Oprócz analizy farmakometrycznej można przeprowadzić równoległą analizę biochemiczną, określając nie tylko efekt, ale prowadzące do niego zmiany aktywności poszczególnych elementów układu receptorowego.

Podsumowanie

Próby farmakometryczne mają swoją ugruntowaną pozycję w badaniach doświadczalnych. Pozwalają one odpowiedzieć na bardzo istotne pytania wynikające z badań biochemicznych, określając zależność między obserwowanymi zmianami biochemicznymi i rzeczywistą odpowiedzią tkanki na różne typy stymulacji. Metodyka badań opartych na modelu doświadczalnym tętnicy oporowej z wykorzystaniem perfuzji jako wykładnika siły skurczu jest doskonała od ponad 30 lat — zmieniają się jedynie idee doświadczeń i odczynniki, pozwalając coraz dokładniej analizować procesy zachodzące w tętnicy.

Piśmiennictwo

1. Rawicki W. *Histologia*. PZWL, Warszawa 2000: 236–245.
2. Stevens A., Lowe J. *Histologia człowieka*. PZWL, Warszawa 2000: 138–141.
3. Nicholas T.E. A perfused tail artery preparation from the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 1969; 21: 826–832.
4. Medgett I.C., Rajanayagam M.A.S. Effects of reduced calcium ion concentration and of diltiazem on vasoconstrictor responses to noradrenaline and sympathetic nerve stimulation in rat isolated tail artery. *Br. J. Pharmacol.* 1984; 83: 889–898.
5. Grzešek G., Szadujkis-Szadurski L. Pharmacometric analysis of α_1 -adrenoceptor function in pretreated with lipopolysaccharides rat tail artery. *Pol. J. Pharmacol.* 2001; 53: 605–613.
6. Grzešek G., Szadujkis-Szadurski L. Physiological antagonism of angiotensin II and lipopolysaccharides in early endotoxemia: pharmacometric analysis. *Pol. J. Pharmacol.* 2003; 55: 753–762.
7. Koller A., Sun D., Huang A., Kaley G. Corelease of nitric oxide and prostaglandins mediates flow-dependent dilation of rat gracilis muscle arterioles. *Am. J. Physiol.* 1994; 267: H326–H332.
8. van Rossum J. Cumulative dose — response curves. Technique for the making of dose — response curves in isolated organs and the evaluation of drugs parameters. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1963; 143: 299–330.
9. Kenakin T. *Pharmacologic analysis of drug-receptor interaction*. Raven Press, Nowy Jork 1997.
10. Khalil R.A., van Breemen C. Sustained contraction of vascular smooth muscle: calcium influx or C-kinase activation? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 244: 537–542.
11. Khalil R.A., van Breemen C. Mechanisms of calcium mobilization and homeostasis in vascular smooth muscle and their relevance to hypertension. W: Laragh J.H., Brenner B.M. red. *Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management*. Raven Press, Nowy Jork 1995; 523–540.