

Elżbieta Bloch-Bogusławska

Wpływ czasu zgonu na reaktywność tętnic ogonowych szczura wyzwalaną przez Bay-K 8644 (agonistę działającego bezpośrednio na kanał wapniowy)

The effect of the time of death on the reactivity of rat caudal artery regulated by Bay-K 8644 (an agonist directly affecting the Ca channel)

Z Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej UMK w Toruniu CM w Bydgoszczy
Kierownik: prof. dr hab. med. Karol Śliwka

Badania na perfundowanych Bay-K 8644 tętnicach ogonowych szczura przeprowadzono w 4 grupach czasowych. Badania z użyciem agonisty kanałów wapniowych działającego bezpośrednio na kanał wapniowy wykazały zależny od czasu zgonu spadek reaktywności tętnic. Stwierdzono, że skurcz mięśniówki gładkiej poprzedzony wzrostem stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie można istotnie wydłużyć aktywując drogę bezpośredniego napływu Ca^{2+} z puli zewnątrzkomórkowej.

The research was conducted on Bay-K 8644-perfused rat caudal arteries in four different time groups. Investigations using the direct Ca channel agonist demonstrated a time-dependent decrease of arterial reactivity. The authors determined that the contractions of the smooth muscle coat preceded by an increased cytoplasm Ca^{++} level were significantly prolonged by the activation of direct Ca^{++} inflow from the extracellular space.

Słowa kluczowe: czas zgonu, Bay-K 8644
Key word: time of death, Bay-K 8644

WSTĘP

Receptory sprzężone z białkami G w błonie komórkowej są funkcjonalnie i strukturalnie połączone z kanałami dla Ca^{2+} (ROC) [1, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18] i mogą kontrolować funkcję kanałów jono-

wych przez mechanizmy nie angażujące żadnych przekaźników drugiego rzędu, jak z cAMP czy IP_3 [18]. Reakcję skurczu mięśniówki gładkiej poprzedza wzrost stężenia wolnego Ca^{2+} w cytoplazmie [1]. Wzrost poziomu tego jonu w cytoplazmie może być spowodowany nie tylko napływem Ca^{2+} z puli zewnątrzkomórkowej przez specyficzne kanały błony komórkowej, ale źródłem tego jonu może być także pula wapnia wewnątrzkomórkowego uwalniany z retikulum. Czynnikiem nadzorującym kanały Ca^{2+} jest potencjał błony komórkowej [13, 17]. Uwalnianie jonów z puli wewnątrzkomórkowej jest kontrolowane przez dwa typy receptorów [19, 2]. Teoretycznie alfa-1 agoniści mogą aktywować obie ścieżki przekazu, ale wydajność alfa-1 receptora regulowana przez fosfolipazę C (PLC) jest relatywnie niska w porównaniu ze ścieżką, która reguluje funkcje kanałów wapniowych [14]. Parpura i wsp. [12] podkreślali wpływ noradrenaliny (NA) agonisty glutaminianu na podwyższenie poziomu wapnia w astrocytach, co wskazywało, że aktywacja szlaku uwalniającego glutaminian jest związana z fizjologicznym poziomem wewnątrzkomórkowego wapnia. Wyniki badań Lepretre i wsp. [10] nie wykazały wzrostu stężenia wapnia w roztworze wolnym od wapnia lub w obecności oxydypiny, która jest substancją hamującą napięciowo zależne kanały wapniowe. Dodatkowo nie stwierdzono akumulacji IP_3 w obecności 0,1 μM prazosinu. W oparciu o przeprowadzone badania badacze ci przyjęli, że aktywacja alfa-adrenoreceptorów promuje napływ wap-

nia przez kanały napięciowo zależne typu L. Z większym uwalnianiem Ca^{2+} z retikulum endoplazmatycznego Kim i wsp. [8] wiązali znacznie szybszą inaktywację kanałów wapniowych typu L u gryzoni w stosunku do innych ssaków. Napływ Ca^{2+} przez kanały typu L oraz wymiana sodowo-wodorowa pełnią synergistyczną rolę w wywoływaniu dodatniego efektu inotropowego wyzwalanego przez PHE-agonistę alfa-1 receptorów oraz receptory endotelinowe i angiotensynowe [16]. Drescher i wsp. [5] wykazali, że usunięcie zewnątrzkomórkowych Ca^{2+} redukowało noradrenalinozależny skurcz naczyń w miarę upływu czasu badania. Zastosowanie blokerów kanałów wapniowych typu L redukowało odpowiedź skurczową wywołaną przez NA nawet do 65%. Z badań Hamada i wsp. [7] wynika, że PHE pobudza stały, szybki wzrost stężenia Ca^{2+} w komórce. Wahania w stężeniu Ca^{2+} są zależne od obecności jonów wewnątrzkomórkowych i nie wymagają aktywności napięciowo zależnych kanałów wapniowych.

CEL PRACY

Prowadzone dotychczas badania nad pośmiertną reaktywnością tętnic ze szczególnym uwzględnieniem przemian zachodzących na poziomie receptora metabotropowego obejmowały analizę powiązań pomiędzy białkiem G a enzymami. Receptory sprzężone z białkiem G same mogą kontrolować funkcję kanałów jonowych przez mechanizmy nie angażujące żadnych przekaźników drugiego rzędu. Dążąc do wyjaśnienia mechanizmów skurczu naczyniowego na poziomie receptorów postanowiono prześledzić, czy funkcjonujące za życia mechanizmy receptorowe działają po śmierci osobniczej organizmu oraz podjąć próbę określenia jaki jest spadek ich reaktywności w zależności od czasu po zgonie. Za celowe uznano więc przeanalizowanie wpływu czasu jaki upłynął od zgonu na funkcjonowanie powiązania pomiędzy białkiem G a kanałem wapniowym.

MATERIAŁ I METODA

Badania prowadzono na perfundowanych tętnicach ogonowych szczura w czterech grupach czasowych: 0, 2, 4 i 8 godzin po zgonie (p.m.). Liczebność każdej z grup wynosiła $n = 12$. Samce szczurów rasy Wistar o wadze 250-300 g usypiano uretanem wstrzykiwanym dootrzewnowo w dawce 120 mg/kg. Po wypreparowaniu odcinka tętnicy o długości 3-3,5 cm i oczyszczeniu z otaczających tkanek, od

strony proksymalnej wprowadzano kaniulę, którą następnie łączono z układem do perfuzji i zestawem umożliwiającym stały pomiar i rejestrację ciśnienia perfuzyjnego. Po obciążeniu dystalnego końca wypreparowanej tętnicy ciężarkiem 500 mg, preparat umieszczano w pozycji pionowej w naczyniu do narządów izolowanych o pojemności 20 ml. Naczynie, w którym umieszczono tętnicę, wypełniano natlenionym płynem fizjologicznym o temperaturze 37°C. Do przepływu perfuzatu zastosowano pompę perystaltyczną. Przepływ zwiększano stopniowo, aż do uzyskania optymalnego przepływu wynoszącego 1 ml/minutę. Po tym przepływie rejestrowane ciśnienie perfuzyjne stabilizowało się na poziomie 40-60 mmHg. Czas stabilizacji preparatu wynosił około 1-1,5 godz.

Do badań używano dwa rodzaje płynu Krebsa: płyn EGTA – Ca^{2+} – Krebsa zawierającym Ca^{2+} o składzie: NaCl (71,8 mM), KCl (4,7 mM), CaCl_2 (1,7 mM), NaHCO_3 (28,4 mM), MgSO_4 (2,4 mM), KH_2PO_4 (1,2 mM), EGTA (30 mM) i glukoza (11,1 mM) oraz płyn EGTA – Krebsa bez Ca^{2+} o składzie: NaCl (71,8 mM), KCl (4,7 mM), NaHCO_3 (28,4 mM), MgSO_4 (2,4 mM), KH_2PO_4 (1,2 mM), EGTA (30 mM) i glukoza (11,1 mM). W doświadczeniach korzystano też z odczynnika Bay-K 8644.

WYNIKI BADAŃ

Bay-K 8644 w zakresie stężeń od 3 nM do 10^{-3} μM w badaniach na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie powoduje zależny od stężenia wzrost ciśnienia perfuzyjnego. Krzywą stężenie-efekt dla Bay-K 8644 wyznaczone na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie są przesunięte w prawo względem krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy stężeniem agonisty a wyrażoną w procentach frakcją zajętych receptorów RA/RT (ryc. 1).

Ryc. 1. Reaktywność tętnicy wyzwalana przez Bay-K 8644. Fig. 1. Bay-K 8644-regulated reactivity of the artery.

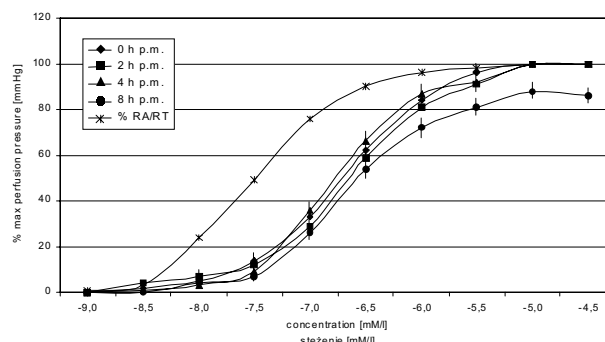


Tabela I. Zestawienie parametrów EC_{50} , pD_2 , E_{max} , K_A i pK_A reaktywności tętnic wyzwalanych przez Bay-K 0, 2 i 4 godz. p.m.

Table I. Mean values of EC_{50} , pD_2 , E_{max} , K_A and pK_A parameters describing the reactivity of arteries subjected to Bay-K stimulation after 0, 2 and 4 hours after death.

Bay-K 8644 Bay-K 8644 Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	ED_{50} (SE)	pD_2	E_{max}
0 godz. p.m. 0 h p.m.	12	$2,12 \times 10^{-7} (\pm 0,71)$	6,67	100
2 godz. p.m. 2 h p.m.	11	$3,47 \times 10^{-7} (\pm 1,03)$	6,46	92
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$3,61 \times 10^{-7} (\pm 1,06)$	6,44	88
8 godz. p.m. 8 h p.m.	8	$4,09 \times 10^{-7} (\pm 1,12)$	6,39	74

Średnia wartość EC_{50} wyznaczona dla Bay-K 8644 w grupie badanej bezpośrednio po zgonie wynosi $2,12 (\pm 0,71) \times 10^{-7}$ M/l (tab. I). Krzywe stężenie-efekt wyznaczone na tętnicach pobranych w 2 godz. p.m. ulegają dalszemu nieznacznemu przesunięciu w prawo w stosunku do krzywej RA/RT z obniżeniem wartości E_{max} do 92 %. W tych warunkach średnia wartość EC_{50} wynosiła $3,47 (\pm 1,03) \times 10^{-7}$ M/l. Dalsze stopniowe przesunięcie krzywej stężenie-efekt w prawo uzyskano na tętnicach wyizolowanych po 4 i 8 godzinach p.m. (ryc. 1). W tych przedziałach czasowych obserwowano też obniżenie wartości E_{max} do poziomu 88 % w grupie 4 godz. p.m. i 86 % w grupie 8 godz. p.m. Uzyskane wartości EC_{50} w tych grupach nie wykazywały różnic statystycznie istotnych i wynosiły odpowiednio $3,61 (\pm 0,06) \times 10^{-7}$ M/l w grupie 4 godz. p.m. i $4,09 (\pm 1,12) \times 10^{-7}$ M/l 8 godz. p.m. (tab. I).

DYSKUSJA

Przeprowadzone badania z użyciem agonisty kanałów wapniowych Bay-K 8644 wykazały zależny od czasu zgonu spadek reaktywności tętnic. Utrzymanie wartości E_{max} na poziomie 88 % w grupie 4 godz. p.m. wskazuje na stosunkowo małą wrażliwość kanału Ca^{2+} na niedotlenienie. Wyniki badań własnych wskazują, że przy skurczu wyzwa-

lanym przez NA i PHE uzyskane w tych przedziałach czasowych wartości E_{max} wynosiły dla NA 32 % a dla PHE 39 %. Wskazuje to, że skurcz mięśniówki gładkiej poprzedzony wzrostem stężenia wolnego Ca^{2+} w cytoplazmie można utrzymać znacznie dłużej p.m. aktywując drogę bezpośredniego napływu Ca^{2+} z puli zewnątrzkomórkowej. Na relatywnie niską wydajność aktywności skurczowej poprzez pobudzenie ścieżki przekazu regulowanej przez PLC w porównaniu ze ścieżką, która reguluje funkcje kanałów wapniowych wykazał też Rufflo i wsp. [14]. Promocyjną rolę napływu wapnia przez kanały napięciowo zależne typu L w stosunku do szlaku enzymatycznego IP_3 podkreślał również Lepretre i wsp. [10]. Uzyskane wyniki nie przeczą spostrzeżeniom poczynionym przez Hamada i wsp. [7] co do wahań stężenia Ca^{2+} w zależności od wielkości puli wewnątrzkomórkowej, podkreślają jedynie, poprzez stosunkowo długo utrzymującą się wysoką reaktywność tętnicy, wydajność kanałów wapniowych w okresie interletalnym. Zbliżone wyniki uzyskano również w badaniach pośmiertnej reaktywności tętnicy wyzwalanej przez AVP po uzupełnieniu Ca^{2+} z puli zewnątrzkomórkowej po zastosowaniu płynu EGTA-Krebsa zawierającego Ca^{2+} . Uruchomienie mechanizmów umożliwiających transport Ca^{2+} do wnętrza komórki poprzez zastosowanie płynu EGTA-Krebsa zawierającego Ca^{2+} pozwalało na zachowanie zdolności tętnicy do reakcji skurczowej do 8 godz. p.m. [3].

WNIOSKI

1. Czas pośmiertnej reakcji skurczowej tętnicy wyzwalanej przez Bay-K 8644 (agonistę kanału wapniowego) jest istotnie dłuższy w stosunku do reakcji opartej na aktywacji puli wewnątrzkomórkowej Ca^{2+} .

2. W miarę upływu czasu od zgonu obniża się reaktywność tętnicy na Bay-K 8644.

3. Zastosowany model badawczy wskazuje na jego przydatność do ustalania czasu zgonu.

PIŚMIENNICTWO

1. Berridge M. J.: Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol* 1997, 499, 291.

2. Berridge M. J.: Inosid trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993, 361, 315.

3. Bloch-Bogusławska E.: Wpływ czasu zgonu, jonów Ca i NO na reaktywność tętnic ogonowych szczura wyzwalaną przez AVP. *Arch. Med. Sąd. i Krym.* 2003, 53, 193.

4. Clapham D. E.: Calcium signaling. *Cell.* 1995, 80, 259.

5. Drescher P., Eckert R. E., Madsen P. O.: Role of intracellular Ca^{2+} stores in smooth muscle contractions of the guinea pig vas deferens. *Urol. Res.* 1993, 21, 319.

6. Ertel E. A. i wsp.: Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* 2000, 25, 533.

7. Hamada H., Damron D. S. i wsp.: Phenylephrine – induced Ca^{2+} oscillations in canine pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1997, 5, 812.

8. Kim S.-J. i wsp.: A novel mechanism for myocardial stunning involving impaired Ca^{2+} handling. *Circulation Research* 2001, 26, 831.

9. Lacovelli L. i wsp.: Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. *FASEB J.* 1999, 13, 1.

10. Lepretre N., Mironneau J.: Alfa2-adrenoceptors activate dihydropyridine – sensitive calcium channels via Gi-proteins and protein kinase C in rat portal vein myocytes. *Eur. J. Physiol* 1994, 429, 253.

11. Lorenson N. M., Beam K. G.: Calcium channelopathies. *Kidney Int.* 2000, 57, 794.

12. Pappas V., Haydon Ph.: Physiological astrocytic calcium levels stimulate glutamate release to modulate adjacent neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000, 15, 8629.

13. Randall A. D.: The molecular basis of voltage – gated Ca^{2+} channel diversity: Is it time for T / J. *Memb, Biol.* 1998, 161, 207

14. Rufflo R. R. Jr., Nichols A. J., Oriwo M. A.: Interaction of vascular alfa-1 adrenoceptors with multiple signal transduction pathways. *Blood Vessels.* 1991, 28, 122.

15. Stressing J. i wsp.: Structural basis of drug binding to L-type Ca^{2+} channels. *Trends Pharmacol. Sci.* 1998, 19, 108.

16. Talukder M. A. H., Endoh M.: Pharmacological differentiation of synergistic contribution of L-type Ca^{2+} channels and Na^+/H^+ exchange to the positive inotropic effect of phenylephrine, endothelin-3 and angiotensin II in rabbit ventricular myocardium. *Arch. Pharmacol.* 1997, 355, 87.

17. Triggle D. J.: The pharmacology of ion channels: With particular reference to voltage – gated Ca^{2+} channels. *Eur. J. Pharmacol* 1999, 375, 311.

18. Wickman K. D., Clapham D. E.: G-protein regulation of ion channels. *Current opinion in Neurobiology* 1995, 5, 278.

19. Zucchi R., Ronca-Testoni S.: The sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} channel/ryanodine receptor: Modulation by endogenous effectors, drug and disease states. *Pharmacol. Rev.* 1997, 49, 1.

Adres autora:

Dr med. Elżbieta Bloch-Bogusławska
Katedra Medycyny Sądowej UMK w Toruniu
Collegium Medicum w Bydgoszczy
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9
85-094 Bydgoszcz