

Elżbieta Bloch-Bogusławska

Wpływ czasu zgonu na reaktywność tętnic ogonowych szczura wyzwalaną przez noradrenalinę (NA) z równoczesnym zastosowaniem inhibitorów syntazy tlenku azotu (NOS), cykazy guanylanowej (CG) i cyklooxygenazy (COX). Cz. I

The effect of the time of death on the reactivity of rat caudal artery regulated by NA with a simultaneous use of NOS, CG and COX inhibitors. Part I

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

Badania na perfundowanych noradrenaliną (NA) tętnicach ogonowych szczura przeprowadzono w 4 grupach czasowych. W celu wyjaśnienia wpływu czasu zgonu na biochemiczne mechanizmy warunkujące funkcjonowanie receptorów metabotropowych zastosowano równocześnie inhibitory NO-syntazy (NOS), cykazy guanylanowej (CG) i cyklooxygenazy (COX).

Badania wykazały, że zastosowanie inhibitora syntazy NO wpływa na poprawę reaktywności tętnic p.m. co wskazuje zachowanie endogennej syntezy NO po śmierci. Również zastosowanie inhibitora cykazy guanylanowej (CG) wpływa na poprawę reaktywności tętnic i wewnątrzkomórkowego stężenia jonów Ca^{2+} . Efektu wzrostu reaktywności tętnic nie obserwowano w badaniach z zastosowaniem inhibitora cyklooxygenazy (COX).

The investigations were carried out on NA-perfused rat caudal arteries in four different time groups. Inhibitors of NO synthase, CG and COX were used simultaneously to explain the effect of the time of death on biochemical mechanisms regulating the function of metabotropic receptors. The study demonstrated that using the NO synthase inhibitor improved post mortem arterial reactivity, what indicated maintained endogenous NO synthesis after death. The CG inhibitor was also found to improve arterial reactivity and intracellular Ca^{++} ion concentration. No improvement in arterial reactivity was observed when COX was used in the experiment.

Słowa kluczowe: czas zgonu, NOS, CG, COX
Key words: time of death, NOS, CG, COX

WSTĘP

Jednym z ważniejszych zagadnień z zakresu medycyny są badania zmierzające do ustalenia czasu jaki mógł upłynąć od chwili śmierci człowieka do chwili badania jego zwłok. Osiągnięcia w tym zakresie ciągle nie zaspokajają oczekiwań codziennej praktyki [12, 21, 22]. Rozwój warsztatu badawczego, nowoczesna aparatura i zmiany stosowanych bodźców mają istotny wpływ na poprawę dokładności w ustalaniu czasu zgonu. Opracowana przez Śliwkę metoda wykorzystania pośmiertnej pobudliwości mięśni izolowanych, przechowywanych w zmodyfikowanym płynie Tyroda, wskazywała na możliwość jej zastosowania do ustalenia czasu śmierci w okresie późniejszym po zgonie [28]. Kontynuacją tych badań było zastosowanie metody drażnienia mięśnia pośrednio poprzez nerw [4, 29]. Metoda ta pozwoliła na dokładniejsze ustalenie czasu zgonu w stosunkowo krótkim czasie po zgonie. Metodyka ustalania czasu śmierci jest bardzo szczegółowo przedstawiona w doniesieniu książkowym Henssge C. i wsp. [14]. Dlatego w przedmiotowym cyklu prac zajęto się głównie omówieniem pośmiert-

nej reaktywności tętnic. Szadurski i wsp. [26] oraz Medgett i wsp. [17] wykazali, że w proksymalnym odcinku tętnicy ogonowej szczura postsynaptycznie reprezentowane są receptory alfa-1 i alfa-2. Furchgott [11] wskazał na zależność wielkości reakcji efektora od stężenia kompleksu receptor-agonista. Badania Miścickiej-Śliwki [18] przeprowadzone na tętnicy ogonowej szczura – naczyniu o przewodzie postsynaptycznych receptorów alfa-1 z użyciem fenylefryny jako środka farmakologicznego, wykazały, że czas utrzymywania się reaktywności tętnicy zależnej od temperatury przechowywania zwierząt po śmierci. W miarę upływu czasu po śmierci reaktywność tętnicy uległa obniżeniu, co przejawiało się wzrostem wartości stałej dysocjacji i dawek efektywnych, wywołujących określoną reakcję tętnicy oraz przesunięciem w prawo krzywej dawka-efekt. Przeprowadzone badania nie wykazały zależności reaktywności tętnic od przyczyny zgonu. Naturalną konsekwencją tych zainteresowań stały się badania zmierzające do wyjaśnienia wpływu czasu zgonu na biochemiczne mechanizmy warunkujące funkcjonowanie receptorów. Receptory metabotropowe są złożonymi elementami układu sygnalizacyjnego komórki. Za pośrednictwem białek G są funkcjonalnie sprzężone z kanałami dla jonów lub enzymami błon komórkowych. Białka G należą do rodziny białek związanych z wewnętrzną częścią błony komórkowej, a ich nazwa pochodzi od zdolności wiązania i hydrolizowania guanozynotrójfosforanu (GTP) [8]. Następnym etapem układu przekazu i przetwarzania informacji są enzymy aktywowane przez białka G i produkujące substancje o charakterze przekaźników wtórnych. Należą do nich enzymy: cyklaza adenylanowa (AC), cyklaza guanylanowa (CG), fosfolipaza C (PLC) i fosfolipaza A₂ (PLA₂) [6, 1]. Powstały w wyniku aktywacji PLC inozytolotrójfosforan (IP₃) ulega kolejnym defosforylacjom do inozytolu. Funkcja IP₃ jako przekaźnik wtórny polega na wiązaniu się z białkami kanału wapniowego związanego z gładką siateczką endoplazmatyczną, powodując jej aktywację i uwolnienie do cytoplazmy zgromadzonych wewnątrz niej jonów Ca²⁺ [2, 3]. Aktywacja PLC prowadzi również do powstania dwuacyloglicerolu (DAG) odpowiedzialnego za aktywację kinazy C [23]. Enzymem odpowiedzialnym za rozkład DAG i fosfolipidów błony komórkowej, prowadzącym do powstania kwasu arachidonowego, jest PLA₂. Kwas arachidonowy pod wpływem enzymów cyklooksigenazy (COX) i lipooksigenazy ulega przemianom do prostaglandyn (PG) i leukotrienów (LT). Prostaglandyny aktywują cyklazy nukleotydowe. Aktywność tę można zahamować stosując m.in. inhibitory COX [7]. AC katalizuje przemianę ATP w cAMP. Rola cAMP jako

wtórnego przekaźnika polega na aktywacji kinazy A. Natomiast produktem aktywacji CG jest cGMP, który ma zdolność aktywacji kinazy C.

Receptory metabotropowe za pośrednictwem białka G są sprzężone z kanałami dla jonów Ca²⁺ (ROC) w błonie komórkowej. Reakcją skurczu mięśniówki gładkiej poprzedza wzrost stężenia wolnego Ca²⁺ w cytoplazmie [3]. Wzrost ten może być spowodowany napływem Ca²⁺ z puli zewnątrzkomórkowej poprzez specyficzne kanały błony komórkowej. Proces napływu Ca²⁺ jest kontrolowany przez receptory błony komórkowej. Drugim czynnikiem kontrolującym kanały dla Ca²⁺ jest różnica potencjałów błony komórkowej. Niezależnie od płynów zewnątrzkomórkowych źródłem Ca²⁺ może być retikulum. W uwalnianiu Ca²⁺ z retikulum pośredniczą receptory IP₃ [16, 20].

W kontrolowaniu czynności mięśni gładkich w naczyniach ważną rolę pełni śródbłonek, którego komórki uwalniają różne substancje wazoaktywne w tym prostacyklinę (PC), tlenek azotu (NO) i endotelinę [10, 30]. NO powstaje z L-argininy przy współudziale syntetazy tlenku azotu (NOS) [31]. W badaniach farmakologicznych nad układem naczyniowym odkryto, że NO jest głównym aktywnym biologicznie składnikiem endotelialnego czynnika rozkurczowego (EDRF) i endogennym aktywatorem rozpuszczalnej cyklazy guanylanowej [30]. Produkcja NO wzrasta pod wpływem czynników zwiększających stężenie wewnątrzkomórkowych Ca²⁺. Wapń uwalniany za pośrednictwem IP₃ może wspomagać aktywność NOS a kinaza C, aktywowana przez dwuacyloglicerol (DAG) może blokować NOS [24].

Do przekaźników pochodzących z fosfolipidów błony komórkowej zaliczamy prostanoidy wchodzące w skład grupy eikozanoidów [19]. Tempo syntezy tych mediatorów zależy od uwalniania kwasu arachidonowego. COX działa na kwas arachidonowy w wyniku czego powstają cykliczne nadtlenki (PGG₂, PGH₂), które mogą przekształcić się m.in. w PGI₂ powodujące rozkurcz naczyń [7].

CEL PRACY

W badaniach dotychczasowych nad pośmiertną reaktywnością tętnic i jej znaczeniem dla ustalania czasu zgonu wykorzystywano wpływ agonistów alfa-1 i alfa-2 oraz agonistów selektywnych alfa-1-adrenoreceptorów z uwzględnieniem m.in. przyczyny zgonu i warunków przechowywania. Nie analizowano natomiast zmiany reaktywności tętnic w oparciu o charakter przemian zachodzących w miarę upływu czasu od zgonu na poszczególnych strukturach receptora metabotropowego pod

kątem ich znaczenia dla określenia czasu śmierci. Za celowe uznano więc przeprowadzenie badań nad reaktywnością tętnic wyzwalaną przez NA z równoczesnym zastosowaniem inhibitorów NOS, CG i COX oraz określenie wpływu czasu zgonu na rozpręganie powiązań pomiędzy białkiem G, enzymami i kanałem dla Ca^{2+} .

MATERIAŁ I METODA

Badania po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej, prowadzono na perfundowanych tętnicach ogonowych samców szczura rasy Wistar wagi 220-300 g pochodzących z jednej hodowli o liczebności grup $n=8$. Szczury usypiano uretanem wstrzykiwanym dostrzewnowo w dawce 120 mg/kg. Po wypreparowaniu i oczyszczeniu tętnicy o długości 3-3,5 cm z otaczających tkanek, od strony proksymalnej wprowadzono kaniulę a odcinek dystalny podwiązano wykonując jednocześnie drobne nacięcie w ścianie tętnicy umożliwiające przepływ płynu perfuzyjnego. Po obciążeniu dystalnego końca wypreparowanej tętnicy ciężarkiem 500 mg preparat umieszczono następnie w pozycji pionowej w termostatowym naczyniu do narządów izolowanych o pojemności 20 ml, wypełnionym płynem Krebsa o temperaturze $37^{\circ}C$. Do płynu Krebsa zarówno inkubacyjnego jak i perfuzyjnego dodawano propranolol w stężeniu 10^{-6} M/l w celu wyeliminowania beta-adrenergicznych reakcji, a presynaptyczny wychwyty amin katecholowych blokowano stosując kokainę w stężeniu 10^{-6} M/l. Utlenianiu NA zapobiegano podając płyn EGTA. Kaniulę wprowadzoną od strony proksymalnej badanej tętnicy łączyło z pompą perystaltyczną. Przepływ płynu perfuzyjnego zapewniono pompą perystaltyczną stopniowo zwiększając przepływ, aż do uzyskania optymalnego przepływu równego 1 ml/min. Okres stabilizacji tętnicy przy takim przepływie wynosiło około 1-1,5 godz., a ciśnienie płynu perfuzyjnego wynosiło średnio 40 mmHg. W celu obiektywnej obserwacji i rejestracji reakcji tętnicy kaniulę wprowadzoną od strony proksymalnej łączyło z przetwornikiem (Universal Transducer Cell Modell UC-2 firmy Gould-Statham) z dodatkowym oprzyrządowaniem służącym do pomiaru ciśnienia perfuzyjnego (Pressure accessory – Model UGP4) z wymiennymi membranami (Diaphragm Model UGP 4-20). Po okresie stabilizacji tętnicy, celem oznaczenia reakcji tętnicy na bodziec farmakologiczny, podawano zewnątrznaczyniowo wzrastające dawki NA wg metody van Rosuma począwszy od stężenia 1×10^{-10} M/l. Kolejne dawki agonisty podawano, po stwierdzeniu, że poprzednia dawka wywołała maksymalny

skurcz, co wyrażało się poziomym zapisem reakcji skurczowej tętnicy. Stężenie podawanego środka przy ostatnich dawkach wywołujących maksymalny skurcz wynosiło 3×10^{-3} M/l. Po przeprowadzeniu badania tętnicę płukano i ponownie stabilizowano do uzyskania wyjściowych wartości ciśnienia płynu perfuzyjnego. Następnie tętnice inkubowano przez 4 minuty w płynie Krebsa zawierającym dibenaminę w stężeniu 10^{-8} M/l, po czym płyn Krebsa kilkakrotnie wymieniano w celu usunięcia dibenaminy i ponownie sprawdzano reakcję tętnicy na wzrastające dawki agonisty.

Obliczenia wartości dawek efektywnych przeprowadzono przyjmując za 100 % średnią maksymalną wartość ciśnienia uzyskanego w grupie kontrolnej badanych bezpośrednio po zgonie. W ten sposób oceniano procentowy spadek reakcji maksymalnej w miarę upływu czasu po zgonie w porównaniu z grupą kontrolną (0 godz. p.m.) Wyznaczenia wartości EC_{50} dokonano w oparciu o uzyskane krzywe zależności efektu od stężenia agonisty. Wartość EC_{50} określano w zakresie reakcji 20-80 % wykreślając prostą regresji. Stałą dysocjacji K_A dla agonisty wyznaczano zgodnie z metodą Furchgotta, polegającą na analizie reakcji przed i po częściowej inaktywacji receptorów. W doświadczeniach korzystano też z odczynników NMMA-Sigma-inhibitor NO-syntazy, Indomethacin morpholinylamide – inhibitor COX i ODQ – inhibitor CG.

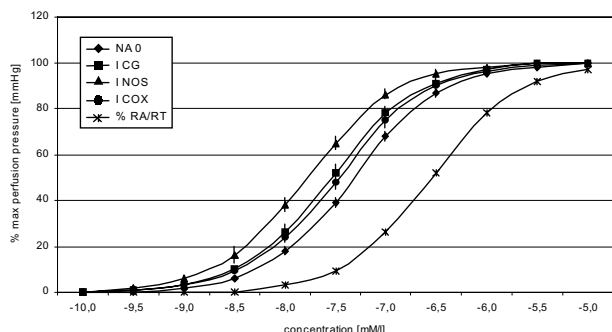
WYNIKI BADAŃ I OMÓWIENIE

1. Wpływ czasu zgonu na reakcję perfundowanej tętnicy ogonowej szczura na NA – agonistę receptorów alfa-1 i alfa-2 – adrenergicznych.

NA w zakresie stężeń od 3 nM – $3\mu M$ w badaniach wykonanych na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie powoduje zależny od stężenia wzrost ciśnienia perfuzyjnego. Wyznaczone w tych warunkach dla NA krzywe stężenie-efekt są przesunięte w lewo względem krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów R_A/R_T a stężeniem NA (ryc. 1). Opisane położenie krzywych potwierdza, że NA jest pełnym agonistą, a w tętnicach ogonowych szczura pobranych bezpośrednio po zgonie, istnieje pula receptorów rezerwowych. Wyznaczona dla NA średnia wartość EC_{50} wynosi $4,6 (\pm 0,7) \times 10^{-8}$ M/l, a stała dysocjacji K_A $2,47 (\pm 0,67) \times 10^{-7}$ M/l (tab. I). W identyczny sposób wyznaczone krzywe stężenie-efekt dla NA na tętnicach pobranych w 2 godz. p.m. ulegają przesunięciu w prawo (ryc. 2) z jednoczesnym obniżeniem reakcji maksymalnej (E_{max}) średnio do 58 % (± 11). Wyznaczona w tych warunkach średnia war-

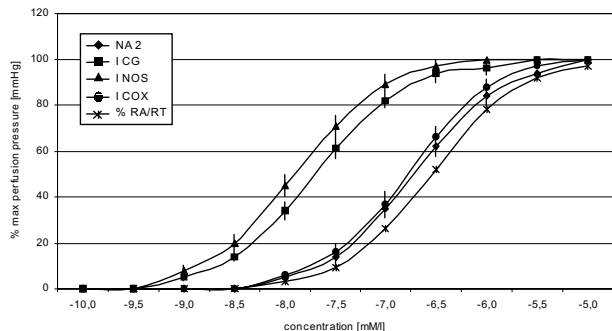
Ryc. 1. Reaktywność tętnicy wyzwalana przez NA 0 godz. p.m.

Fig. 1. NA-regulated arterial reactivity 0 hours after death.



Ryc. 2. Reaktywność tętnicy wyzwalana przez NA 2 godz. p.m.

Fig. 2. NA-regulated arterial reactivity 2 hours after death.

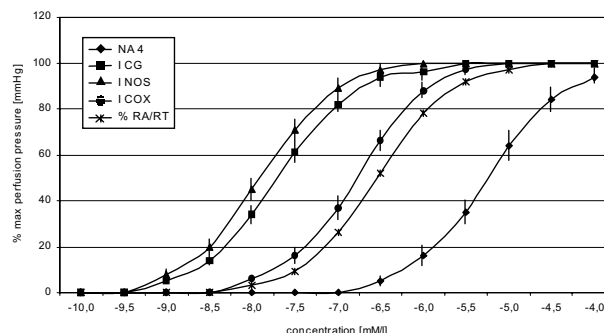


tość EC_{50} wzrasta do $1,8 (\pm 0,5) \times 10^{-7}$ M/l, a stała dysocjacji K_A wynosi średnio $2,77 (\pm 0,76) \times 10^{-7}$ M/l i nie różni się istotnie statystycznie od wartości kontrolnej (0 godz. p.m.) (tab. I). Krzywe stężenie-efekt dla NA wyznaczone na tętnicach pobranych w 4 godz. p.m. ulegają dalszemu przesunięciu w prawo z jed-

noczesnym dalszym obniżeniem reakcji maksymalnej E_{max} do 38 % (± 12) (ryc. 3).

Ryc. 3. Reaktywność tętnicy wyzwalana przez NA 4 godz. p.m.

Fig. 3. NA-regulated arterial reactivity 4 hours after death.



Wyznaczona średnia wartość EC_{50} dla NA wzrasta do wartości $5,6 (\pm 0,4) \times 10^{-6}$ M/l. Wartość K_A wynosi średnio $2,94 (\pm 0,64)$ i nie różni się w sposób istotny statystycznie od wartości K_A wyznaczonej w grupie kontrolnej. Krzywa przedstawiająca zależność R_A/R_T jako funkcję stężenia NA wyznaczona dla tętnic badanych bezpośrednio po zgonie przedstawia hiperbolę, która w miarę upływu czasu p.m. ulega spłaszczeniu. Tego typu zmiany w kształcie krzywych stężenie-efekt i krzywych przedstawiających zależność R_A/R_T jako funkcję stężenia NA, przy niezmiętej wartości K_A wskazują na zmniejszanie się wraz z upływem czasu p.m. puli aktywnych receptorów w tkankach. W wyniku tego procesu do wywołania 50 % E_{max} wyzwalanej przez NA na tętnicach perfundowanych bezpośrednio po zgonie musi nastąpić zajęcie 16 % ogólnej puli receptorów. Po 2 godzinach p.m. i 4 godz. p.m. dla wywo-

Tabela I. Zestawienie parametrów EC_{50} , pD_2 , E_{max} , K_A i pK_A reaktywności tętnic wyzwalanych przez NA 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 NA stimulation after 0, 2 and 4 hours after death.

NA Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	EC_{50} (SE)	pD_2	E_{max}	K_A (SE)	pK_A
0 godz. p.m. 0 h p.m.	8	$4,6 \times 10^{-8} (\pm 0,7)$	7,34	100	$2,47 \times 10^{-7} (\pm 0,66)$	6,60
2 godz. p.m. 2 h p.m.	8	$1,8 \times 10^{-7} (\pm 0,5)$	6,74	58	$2,77 \times 10^{-7} (\pm 0,76)$	6,55
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$5,6 \times 10^{-6} (\pm 0,4)$	5,25	32	$2,94 \times 10^{-7} (\pm 0,64)$	6,53

łania tej samej reakcji musi być zajętych odpowiednio 39 % i 85 % puli receptorów.

2. Wpływ inhibitora NOS (INOS) na zmiany reakcji perfundowanej tętnicy ogonowej szczura na NA.

Krzywe stężenie-efekt dla NA z użyciem INOS wyznaczone na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie (ryc. 1) podobnie do krzywych dla NA z użyciem INOS wyznaczonych na tętnicach perfundowanych w 2 godz. p.m. (ryc. 2) są przesunięte w lewo względem krzywych przedstawiających zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów wyrażoną w % (R_A/R_T) i krzywą stężenie-efekt dla NA w tych przedziałach czasowych. Opisane położenie krzywych potwierdza, że w tętnicach ogonowych szczura pobranych w 2 godziny p.m. istnieje pula receptorów rezerwowych. Średnia wartość EC_{50} wyznaczona dla NA z użyciem INOS na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie wynosiła $4,6 \times 10^{-8}$ ($\pm 0,7$) M/l a dla tętnic pobranych 2 godz. p.m. wyznaczona wartość EC_{50} wynosiła $1,2 \times 10^{-8}$ ($\pm 1,3$) M/l (tab. II). Przesunięcie krzywej stężenie-efekt dla NA z użyciem INOS w prawo, względem krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów wyrażoną w % (R_A/R_T) uzyskano na tętnicach badanych 4 godz. p.m. (ryc. 3). Wyznaczone krzywe stężenie-efekt dla NA z użyciem INOS dla tętnic pobranych w 4 godz. p.m. pozostaje nadal po stronie lewej względem krzywej stężenie-efekt dla NA. Średnia wartość EC_{50} wyznaczona dla NA z użyciem INOS na tętnicach pobranych w 4 godz. p.m. wynosiła $4,4 \times 10^{-6}$ ($\pm 2,2$) M/l (tab. II).

3. Wpływ inhibitora cykloazy guanylanowej (ICG) na zmiany reaktywności tętnicy ogonowej szczura na NA.

Krzywą stężenie-efekt dla NA z użyciem ICG wyznaczone na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie (ryc. 1), podobnie do krzywych dla NA z użyciem ICG wyznaczonych na tętnicach pobranych w 2 godz. p.m. (ryc. 2) są przesunięte w lewo względem krzywych przedstawiających zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów (R_A/R_T) a krzywą stężenie-efekt dla NA w tych przedziałach czasowych. Przesunięcie krzywej stężenie-efekt dla NA w prawo względem krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów wyrażoną w % (R_A/R_T) uzyskano na tętnicach perfundowanych w 4 godz. p.m. Wyznaczona krzywa stężenie-efekt dla NA z użyciem ICG dla tętnic pobranych 4 godz. p.m. pozostaje nadal po stronie lewej względem krzywej stężenie-efekt dla NA (ryc. 3). Wyznaczone w tych przedziałach czasowych wartości EC_{50} wynosiły odpowiednio dla NA ICG na tętnicach perfundowanych w 2 godz. p.m. $1,9 \times 10^{-8}$ ($\pm 0,64$) M/l i w 4 godz. p.m. $3,7 \times 10^{-6}$ ($\pm 0,56$) M/l (tab. III).

4. Wpływ inhibitora cyklooksygenazy (ICOX) na zmiany reakcji perfundowanej tętnicy ogonowej szczura na NA.

Krzywą stężenie-efekt dla NA z użyciem ICOX wyznaczona na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie (ryc. 1) podobnie do krzywych dla NA z użyciem ICOX wyznaczonych na tętnicach pobranych w 2 godz. p.m. (ryc. 2) są przesunięte w lewo względem krzywych przedstawiających zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów (R_A/R_T) i krzywą stężenie-efekt dla NA w tych przedziałach czasowych. Przesunięcie krzywej stężenie-efekt dla NA z użyciem ICOX w prawo uzyskano na tętnicach

Tabela II. Zestawienie parametrów EC_{50} , E_{max} i K_A reaktywności tętnic wyzwalanych przez NA z INOS 0, 2 i 4 godz. p.m.

Table II. Mean values of EC_{50} , pD_2 , E_{max} , K_A and pK_A parameters describing the reactivity of arteries subjected to NA with INOS stimulation after 0, 2 and 4 hours after death.

NA z INOS NA with INOS Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	EC_{50} (SE)	E_{max}	K_A (SE)
0 godz. p.m. 0 h p.m.	8	$4,6 \times 10^{-8}$ ($\pm 0,7$)	100	$2,58 \times 10^{-7}$ ($\pm 0,91$)
2 godz. p.m. 2 h p.m.	8	$1,2 \times 10^{-8}$ ($\pm 1,3$)	100	$1,89 \times 10^{-7}$ ($\pm ,33$)
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$4,4 \times 10^{-6}$ ($\pm 2,2$)	53	$2,04 \times 10^{-07}$ ($\pm 1,51$)

Tabela III. Zestawienie parametrów EC_{50} , E_{max} i K_A reaktywności tętnic wyzwalanych przez NA z ICG 0, 2 i 4 godz. p.m.
Table III. Mean values of EC_{50} , pD_2 , E_{max} , K_A and pK_A parameters describing the reactivity of arteries subjected to NA with ICG stimulation after 0, 2 and 4 hours after death.

NA z ICG NA with ICG Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	EC_{50} (SE)	E_{max}	K_A (SE)
0 godz. p.m. 0 h p.m.	8	$4,6 \times 10^{-8}$ ($\pm 0,72$)	100	$2,58 \times 10^{-7}$ ($\pm 0,97$)
2 godz. p.m. 2 h p.m.	8	$1,9 \times 10^{-8}$ ($\pm 0,64$)	100	$1,69 \times 10^{-7}$ ($\pm 0,97$)
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$3,7 \times 10^{-6}$ ($\pm 0,56$)	42	$3,14 \times 10^{-07}$ ($\pm 0,97$)

Tabela IV. Zestawienie parametrów EC_{50} , E_{max} i K_A reaktywności tętnic wyzwalanych przez NA z ICOX 0, 2 i 4 godz. p.m.

Table IV. Mean values of EC_{50} , pD_2 , E_{max} and K_A parameters describing the reactivity of arteries subjected to NA with ICOX stimulation after 0, 2 and 4 hours after death.

NA z ICOX NA with ICOX Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	EC_{50} (SE)	E_{max}	K_A (SE)
0 godz. p.m. 0 h p.m.	8	$4,6 \times 10^{-8}$ ($\pm 1,3$)	100	$2,58 \times 10^{-7}$ ($\pm 1,17$)
2 godz. p.m. 2 h p.m.	8	$1,7 \times 10^{-7}$ ($\pm 0,9$)	53	$1,89 \times 10^{-7}$ ($\pm 0,97$)
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$3,1 \times 10^{-5}$ ($\pm 0,6$)	48	$2,81 \times 10^{-7}$ ($\pm 0,27$)

perfundowanych 4 godz. p.m. (ryc. 3). Średnia wartość EC_{50} obliczona w grupie 2 godzin p.m. wynosiła $1,7 \times 10^{-7}$ ($\pm 0,9$) M/l a w grupie 4 godz. p.m. $3,1 \times 10^{-5}$ ($\pm 0,6$) M/l (tab. IV).

DYSKUSJA

Przeprowadzone w oparciu o teorię receptorową badania wykazały, że reaktywność tętnicy na NA obniża się w miarę upływu czasu po zgonie. Ilościowa interpretacja badanych reakcji interletalnych wyrażająca się w miarę upływu czasu po zgonie przesunięciem w prawo krzywych stężenie-efekt wraz z redukcją ciśnienia maksymalnego, wzrostem wartości dawek efektywnych oraz wzrostem wartości stałej dysocjacji może być wykorzystana do usta-

lania czasu zgonu. Wpływ redukcji puli aktywnych receptorów na zmniejszanie reakcji naczyniowych w aspekcie czasu zgonu wykazali też Miścicka-Śliwka oraz Śliwka i Szadurski [26, 27, 28]. Przeprowadzone badania potwierdziły spostrzeżenia Clementi i wsp. [10] co do regulacyjnej funkcji tlenu azotu na homeostazę wapnia w komórkach. Wprawdzie moje badania nie różnicowały źródeł pochodzenia NO ale wyniki badań z zastosowaniem inhibitora syntazy NO wskazują, że synteza NO jest fizjologicznie czynna p.m. i endogennie produkowany NO pełni znamioną rolę w modulacji stężenia Ca^{2+} . Badania własne [5] z zastosowaniem INOS wskazywały na istotny wpływ NO na obniżenie reaktywności preparatów tętnic, wyzwalanych przez argoninio-wazopresynę w płynie EGTA-Krebsa zawierającym Ca^{2+} , w miarę upływu czasu po zgonie.

Zniesienie możliwości syntezy NO pozwoliło na utrzymanie reaktywności tętnicy w 8 godzin p.m. na poziomie około 43 % wartości ciśnienia perfuzyjnego uzyskanego w grupie 0 godzin p.m. Znajduje to potwierdzenie również w wynikach badań reaktywności tętnic wyzwalanych przez NA. Po zastosowaniu INOS stwierdzono większą reaktywność tętnicy 4 godz. p.m. w stosunku do krzywej kontrolnej 0 godz. p.m. Na rolę NO jako jednego z czynników obniżających reaktywność tętnic poprzez zablokowanie jego syntezy bądź anion ponadtlenkowych wskazywali też w badaniach Sieber i wsp. [25, 13]. Dodatkowym wskaźnikiem powiązania obniżenia reaktywności tętnic p.m. jest fakt, że zahamowanie syntezy cGMP w podobny sposób poprawia reaktywność tętnic [9]. Obniżenie poziomu cGMP niweluje również hamujący wpływ NO na czynność naczyń. NO powoduje rozkurcz mięśni gładkich właśnie poprzez zwiększenie syntezy cGMP [10, 30]. Brak poprawy reaktywności tętnic po zastosowaniu inhibitora COX wynikać może ze zróżnicowanego charakteru działania prostanoidów [7, 15]. Zahamowanie cyklooksygenazy (COX-1 i COX-2) indometacyną pozwala wykluczyć udział PG w pośmiertnym procesie hamowania reakcji wyzwalanych za pośrednictwem receptorów metabotropowych.

WNIOSKI

1. Wzrost reaktywności tętnic po zastosowaniu inhibitora NO-syntazy wskazuje na rolę NO w pośmiertnym hamowaniu reakcji skurczowej tętnic.
2. Zastosowanie inhibitora CG wskazuje, że pośmiertne obniżenie reakcji skurczowej tętnic zależy również od syntezy cGMP.
3. W miarę upływu czasu od zgonu dochodzi do obniżenia puli receptorów rezerwowych i reaktywności tętnic na noradrenalinę.
4. Zahamowanie cyklooksygenaz nie wpływa na poprawę reaktywności tętnic co wskazuje, że w pośmiertnym obniżeniu reaktywności tętnic dominującą rolę odgrywa NO a nie PG.

PIŚMIENNICTWO

1. Balsinde J., Dennis E. A.: Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A2 enzymes present in P388D₁ macrophages. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 6758.
2. Berridge M. J.: Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993, 361, 315.
3. Berridge M. J.: Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol* 1997, 499, 291.
4. Bloch E.: Rozprawa doktorska, Bydgoszcz 1990.
5. Bloch-Bogusławska E.: Wpływ czasu zgonu, jonów Ca i NO na reaktywność tętnic ogonowych szczura wyzwalanych przez AVP. *Arch. Med. Sąd. i Krym.* 2003, 53, 193.
6. Bunemann M., Hosey M. M.: G-protein coupled receptor kinases as modulators of G-protein signalling. *J. Physiol* 1999, 517, 5.
7. Chun-Yang X., i wsp.: Roles of Prostaglandin J₂ and Thromboxane A₂ in cardiac ischemia – reperfusion injury. *Circulation* 2001, 104, 2210.
8. Clapham D. E., Neer E.: G-protein β subunits. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol*, 1997, 37, 167.
9. Clementi E., Vecchio J. i wsp.: Nitric oxide modulates agonist – evoked Ca²⁺ release and influx responses in PC 12 – 64 cells. *Europ. J of Pharmacol* 1995, 289, 113.
10. Furchgott R. F., Vanhoutte P. M.: Endothelium – derived relaxing and contracting factors. *FA-SEB J.* 1989, 3, 2007.
11. Furchgott R. F.: The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors): An evaluation from the standpoint of receptor theory. *Handbook of Experimental Pharmacology Springer Verlag, New York*, 1972, 33.
12. Goss T.: Ustalanie czasu zgonu w aspekcie biochemicznym. *Arch. Med. Sąd. i Krym.* 1993, 43, 249.
13. Gryglewski R. J., Palmer R. M., Moncada S.: Superoxide anion is involved in breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 1986, 320, 454.
14. Henssge C., Knight B., Krompecher T., Maeda B., Nokes L., in: Knight B. (Ed), *The Estimation of the Time Since Death in Early Postmortem Period*, Edward Arnold, Great Britain, 1995.
15. Kleuss C. i wsp.: Selectivity in signal transduction determined by gamma subunits of heterotrimeric G-proteins. *Science* 1993, 259, 832.
16. Lee H. C.: NAADP: An emerging calcium signaling molecular. *J. Membr. Biol.* 2000, 173, 1.
17. Medgett J. 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. Pharmac.* 1984, 83, 889.
18. Miścicka-Śliwka D.: The study of post-mortem changes in alfa-1-adrenoreceptor function. *Adv. For. Sci.* 1995, 4, 107.
19. Montovani A., Bussolino F., Introna M.: Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 1997, 5, 231.

20. Neubig R. R.: Membrane organization on G-proteins mechanism. *FASEB J.* 1994, 8, 6413.
21. Raszeja S., Śliwka K.: Ustalanie „czasu śmierci” w świetle piśmiennictwa rodzimego. *Arch. Med. Sąd. i Krym.*, 1986, 36, 91.
22. Raszeja S.: Stopień trafności oceny czasu śmierci na podstawie wczesnych jej znamion. *Mat. Konf. Nauk. Wydajność metod a opiniowanie*, Kraków, 1977.
23. Rhee S. G.: Regulation of phosphoinositide – specific phospholipase C. *Ann Rev. Biochem.* 2001, 70, 28.
24. Sessa W. C.: The Nitric Oxide Synthase Family of Proteins. *J. Vasc. Res.* 1994, 31, 131.
25. Sieber C. C., Groszmann R. J.: Nitric oxide meditates hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1992, 103, 235.
26. Szadujkis-Szadurski L., Miścicka-Śliwka D., Petruszewicz J., Pączkowska B.: Farmakologiczna klasyfikacja postynaptycznych receptorów alfa-adrenergicznych w mięśniówce gładkiej perfundowanej tętnicy ogonowej szczura. *Ann. Acad. Med. Bydgoszcz.* 1986, 267.
27. Śliwka K., Szadujkis-Szadurski L.: Badania doświadczalne nad reaktywnością tętnic w okresie interletalnym na adrenergiczne działanie noradrenaliny. *Ann. Acad. Gedan.* 1980, 10, 267.
28. Śliwka K.: Ocena pośmiertnej pobudliwości elektrycznej mięśnia szkieletowego szczurów i jej znaczenie dla określenia czasu śmierci. *Rozprawa habilitacyjna*, Gdańsk, 1984.
29. Śliwka K., Bloch E.: Wykorzystanie pośmiertnej pobudliwości preparatu nerwowo-mięśniowego dla ustalania czasu zgonu. *Post. Med. Sąd. i Krym.* 1988, 1, 313.
30. Vane H. R. i wsp.: Regulatory functions of the vascular endothelium. *New Eng. J of Med.* 1990, 323, 27.
31. Wickman K. D., Clapham D. E.: G-protein regulation of ion channels. *Current Opinion in Neurobiology* 1995, 5, 278.

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