

Ryszard Korbut

NOWY SPOSÓB OZNACZANIA SUBSTANCJI BIOLOGICZNIE CZYNNYCH
W MIESZANINIE, PRZY UŻYCIU TECHNIKI KASKADOWEGO OMYWANIA
WYSOBNIONYCH NARZĄDÓW-DETEKTORÓW

Praca na stopień doktora
 nauk przyrodniczych

Promotor:

Prof.dr habil.
Ryszard Gryglewski

z Katedry Farmakologii
Akademii Medycznej
im. Mikołaja Kopernika
w Krakowie

Bibl. Medyczna CM UJ



1816104467

K r a k ó w 1975

Wielce Szanownemu Panu Profesorowi
Dr habil. Ryszardowi GRYGLEWSKIEMU
Promotorowi tej pracy,
składam najserdeczniejsze podziękowanie
za pomoc i cenne wskazówki przy jej
wykonaniu

S p i s t r e ś c i

I. WSTĘP	str.	1
II. ZWIĄZKI UŻYTE W BADANIACH	"	3
III. BIOLOGICZNE OZNACZANIE PROSTAGLANDYN W OBECNOŚCI WYSOKICH STĘŻEŃ AMIN KATECHOLOWYCH	"	4
a) Wprowadzenie	"	4
b) Opracowanie metody	"	4
c) Omówienie wyników	"	6
d) Praktyczne zastosowanie metody	"	7
e) Wnioski	"	8
IV. BIOLOGICZNE OZNACZANIE HISTAMINY W OBECNOŚCI PROSTAGLANDYN (PG), "SUBSTANCJI KURCZĄCEJ AORTĘ KRÓLIKA" (RCS), "SUBSTANCJI WOLNO DZIAŁAJĄCEJ" (SRS-A) ..	"	8
a) Wprowadzenie	"	8
b) Użycie kolumny XAD-2 w badaniach nad uwalnianiem autakoidów podczas wstrząsu anafilaktycznego	"	10
c) Omówienie wyników	"	12
d) Praktyczne zastosowanie metody	"	13
e) Wnioski	"	13
V. STRESZCZENIE	"	15
VI. WNIOSEK OGÓLNY	"	16
PIŚMIENNICTWO	"	17
DOKUMENTACJA	"	21

I. WSTĘP

Technika omywania wyosobnionych narządów-detektorów zawieszonych w kaskadzie (ryc. 1) (27) znalazła zastosowanie do biologicznego oznaczania wielu hormonów i autakoidów. W ten sposób oznaczane są: aminy katecholowe (28), prostaglandyny (7), angiotenzyna II (23, 24), bradykinina (6), histamina (5), 5-hydroksytryptamina (26), oksytocyna (29), wazopresyna (8), a także dwie substancje o stosunkowo mało poznanej budowie chemicznej i znaczeniu biologicznym t.j. "substancja kurcząca aortę królika" - RCS (14, 19, 21, 22) i "substancja wolno działająca" - SRS-A (2, 21). Obie te substancje pojawiają się m.in. obok histaminy i prostaglandyn w perfuzacji z płuc uczulonej świnki morskiej w czasie wstrząsu anafilaktycznego (20, 21, 22).

Biologiczne oznaczanie w roztworze tylko jednego hormonu jest stosunkowo łatwe. Jedynym czynnikiem ograniczającym dokładność takiego oznaczania jest indywidualna wrażliwość narządu-detektora w stosunku do hormonu. Natomiast oznaczenie hormonów lub autakoidów w mieszaninie jaka występuje na przykład w krążącej krwi (27) lub w perfuzatach z narządów (21) stwarza możliwość pojawienia się fałszywego odczytu wskutek interferencji działania różnych hormonów na ten sam detektorowy narząd. W związku z tym konieczne było opracowanie sposobów biologicznego różnicowania poszczególnych hormonów i autakoidów w mieszaninie.

I. WSTĘP

Technika omywania wyosobnionych narządów-detektorów zawieszonych w kaskadzie (ryc. 1) (27) znalazła zastosowanie do biologicznego oznaczania wielu hormonów i autakoidów. W ten sposób oznaczane są: aminy katecholowe (28), prostaglandyny (7), angiotenzyna II (23, 24), bradykinina (6), histamina (5), 5-hydroksytryptamina (26), oksytocyna (29), wazopresyna (8), a także dwie substancje o stosunkowo mało poznanej budowie chemicznej i znaczeniu biologicznym t.j.

"substancja kurcząca aortę królika" - RCS (14, 19, 21, 22) i "substancja wolno działająca" - SRS-A (2, 21). Obie te substancje pojawiają się m.in. obok histaminy i prostaglandyn w perfuzacji z płuc uczulonej świnki morskiej w czasie wstrząsu anafilaktycznego (20, 21, 22).

Biologiczne oznaczanie w roztworze tylko jednego hormonu jest stosunkowo łatwe. Jedynym czynnikiem ograniczającym dokładność takiego oznaczania jest indywidualna wrażliwość narządu-detektora w stosunku do hormonu. Natomiast oznaczenie hormonów lub autakoidów w mieszaninie jaka występuje na przykład w krążącej krwi (27) lub w perfuzatach z narządów (21) stwarza możliwość pojawienia się fałszywego odczytu wskutek interferencji działania różnych hormonów na ten sam detektorowy narząd. W związku z tym konieczne było opracowanie sposobów biologicznego różnicowania poszczególnych hormonów i autakoidów w mieszaninie.

Dotychczas stosowane trzy sposoby różnicowania zasadzają się na następujących zjawiskach:

1/ Swoista wrażliwość pojedynczego, izolowanego narządu w stosunku do wybranej substancji biologicznie czynnej.

Na przykład prostnica kurczęcia (CR) omywana kolejno dziesięcioma różnymi hormonami lub autakoidami w stężeniu 5 ng/ml kurczy się wyłącznie po podaniu prostaglandyn typu E (tabela 1).

2/ Porównanie odpowiedzi kilku, odpowiednio dobranych narządów-detektorów omywanych w kaskadzie. Na przykład noradrenalinę można odróżnić od adrenaliny na tej podstawie, iż adrenalina wywołuje rozkurcz paska żołądka szczura i prostnicy kurczęcia, natomiast noradrenalina wywołuje wyłącznie rozkurcz paska żołądka szczura, nie powodując rozkurczu prostnicy kurczęcia.

3/ Użycie zestawu farmakologicznych antagonistów, które omywając wraz z płynem perfuzyjnym narządy-detektory, czynią je niewrażliwymi w stosunku do agonistów. Tak na przykład pasek żołądka szczura można odczulić w stosunku do biologicznego działania acetylocholin, amin katecholowych, 5-hydroksytryptaminy, histaminy dodając do płynu omywającego narząd atropinę, fenoksybenzaminę, propranolol, delysol, mepyraminę (9). Dołączając do takiej mieszaniny indometacynę można ten narząd dodatkowo uczulić na skurczowe działanie prostaglandyn (4).

W tej pracy proponuje się nową, czwartą zasadę różnicowego oznaczania hormonów i autakoidów w mieszaninie przy użyciu techniki kaskadowej superfuzji narządów detektorów. Sposób ten polega na wprowadzeniu do kaskady Vane'a (27)

(ryc.1) kolumn absorbcyjnych, wybiórczo usuwających z miesza-
niny te biologicznie czynne substancje, które przeszkadzają
w oznaczaniu wybranego autakoidu. Zastosowanie tego rodzaju
modyfikacji umożliwia:

1. Biologiczne oznaczanie prostaglandyn E_1 , E_2 , F_2 alfa
w obecności wysokich stężeń amin katecholowych przy użyciu
kolumny z aktywowanym tlenkiem glinu.
2. Oznaczanie histaminy w obecności prostaglandyn, RCS i SRS-A
przy użyciu kolumny zawierającej syntetyczną żywicę XAD-2.
Proponowana zasada poszerza znacznie użyteczność techniki
Vane'a w badaniach farmakologicznych. Dzięki niej można było
wykryć m.in. regulacyjną rolę prostaglandyn w układzie naczy-
niowym (11) oraz zbadać wpływ leków na tworzenie się autakoidów
we wstrząsie anafilaktycznym (13). Oba przykłady zastosowania
nowej techniki zostaną również przedstawione.

II. ZWIĄZKI UŻYTE W BADANIACH

Prostaglandyny E_1 , E_2 , F_2 alfa (Upjohn Co.), DL/+/ dwu-
winian adrenaliny (Sigma), dwuwinian D/-/ noradrenaliny (Polfa),
dwuchlorowodorek histaminy (Polfa), chlorowodorek izoprenaliny
(Sigma), chlorowodorek propranololu (Polfa), chlorowodorek
fenoksybenzaminy (Smith, Kline and French), indometacyna
(Polfa), metysergid (Sandoz), siarczan atropiny (Polfa),
chlorowodorek fentolaminy (Ciba), fosforan polifloretyny (Leo
Helsingborg), syntetyczna żywica- amberlit XAD-2 (BDH Chemicals
Ltd), tlenek glinu do absorbcji (Ciech).

III. BIOLOGICZNE OZNACZANIE PROSTAGLANDYN W OBECNOŚCI WYSOKICH STĘŻEŃ AMIN KATECHOLOWYCH

a) Wprowadzenie

Do biologicznego oznaczania prostaglandyn i amin katecholowych w kaskadowej technice Vane'a najczęściej używa się jako narządów detektorów izolowanego paska żołądka szczura, prostnicy kurczęcia oraz okrężnicy szczura (7, 28). Prostaglandyny kurczą te narządy natomiast aminy katecholowe rozkurczają je. Dlatego oznaczenie prostaglandyn w obecności amin katecholowych jest kłopotliwe. Przy użyciu antagonistów receptorów alfa i beta-adrenergicznych (9) można wyrugować rozkurcz narządów-detektorów w stosunku do amin katecholowych o ile ich stężenie w omywającym płynie nie przekracza 300 ng/ml. Lecz nawet wówczas blokada adrenergiczna nie jest równomierna dla wszystkich narządów-detektorów (12), a ich wrażliwość w stosunku do skurczowego działania prostaglandyn jest zwykle upośledzona. Nowym rozwiązaniem tego problemu jest włączenie do układu kaskady narządów kolumny z aktywowanym tlenkiem glinu, która absorbuje z płynu omywającego narządy-detektory aminy katecholowe, nie zatrzymując znajdujących się w nim prostaglandyn E_1 , E_2 , F_2 alfa. Skuteczność tej metody potwierdzają prace badawcze w których ją zastosowano (10, 11, 13).

b) Opracowanie metody

Wprowadzenie kolumny Al_2O_3 do kaskady Vane'a

Do biologicznej identyfikacji prostaglandyn i amin katecholowych zastosowano kaskadową technikę Vane'a (27).

Do omywania narządów-detektorów użyto natlenionego płynu Tyrode'a (37°C), który zawierał fenoksybenzaminę (0.2 µg/ml),

propranolol (2 $\mu\text{g/ml}$) oraz indometacynę (2 $\mu\text{g/ml}$). Na wierzchołku kaskady umieszczono kolumnę ogrzewaną płaszczem wodnym (37°C) o średnicy 2 cm i długości 1.5 cm zawierającą aktywowany tlenek glinu (1). Przez kolumnę przesączało się Tyrode'a podany przy pomocy pompy perystaltycznej z prędkością 5 ml/min. Przesączały się płyn omywał umieszczone pod kolumną narządy-detektory, w kolejności pasek żołądka szczura (RSS) (26) reagujący skurczem na prostaglandyny E_1 , E_2 , F_2 alfa, okrężnicę szczura (RC) (16) kurczącą się pod wpływem prostaglandyny F_2 alfa i prostnicę kurczącą (CR) (18) o wybiórczej wrażliwości w stosunku do prostaglandyn E_1 i E_2 (ryc. 2). Prostaglandyny E_1 , E_2 , F_2 alfa w stężeniach 0.5 - 20 ng/ml/min podawano zarówno przez kolumnę jak i bezpośrednio na narządy detektory. Adrenalinę, noradrenalinę i izoprenalinę podawano przez kolumnę absorbcyjną w stężeniach 1, 10, 20, 50 $\mu\text{g/ml/min}$. Wszystkie badane substancje podawano w objętości 0.1 - 0.2 ml/min w czasie 3 minut. Reakcję narządów-detektorów rejestrowano przy pomocy izotonicznych przekazników typu Harvard połączonych z 6-kanałowym urządzeniem rejestrującym typu Watanabe.

Przygotowanie kolumny Al_2O_3

Aktywację tlenku glinu przeprowadzono w sposób opisany przez Anton'a i Sayre'a (1). W końcowym etapie aktywacji tlenek glinu przemywano wodą destylowaną do momentu aż odczyn supernatantu osiągnął wartość $\text{pH} = 6.0$. Następnie tlenek glinu suszono w temperaturze 200°C i wypełniano nim szklaną kolumnę. Każdorazowo przed umieszczeniem kolumny w kaskadzie przemywano ją dodatkowo płynem Tyrode'a (5 ml/min) przez 20 minut.

Wypływający po tym czasie płyn Tyrode'a miał odczyn $\text{pH} = 7.9$.

c) Omówienie wyników

Adrenalina, noradrenalina oraz izoprenalina w stężeniach 1, 10, 20, 50 $\mu\text{g/ml/min}$ wywołują rozkurcz narządów detektorów. Te aminy katecholowe rozkurczają narządy również wtedy gdy podaje się je w mieszaninie z prostaglandynami E_1 , E_2 , F_2 alfa (0.5 - 20 ng/ml). Natomiast jeżeli mieszanina amin katecholowych i prostaglandyn zostaje przepuszczona przez kolumnę Al_2O_3 umieszczoną na szczycie kaskady narządów, to efluent z kolumny jest całkowicie wolny od amin katecholowych, podczas gdy wszystkie prostaglandyny swobodnie przechodzą przez kolumnę. W tej sytuacji możliwe jest ilościowe oznaczenie PGE_1 i PGE_2 w granicznych stężeniach 0.5 - 1.0 ng/ml (rejestrowane jako skurcz RSS i CR) lub PGF_2 alfa w granicznym stężeniu 1.0 ng/ml (rejestrowanej jako skurcz RC) w obecności adrenaliny, noradrenaliny i izoprenaliny w stężeniach 1 - 50 $\mu\text{g/ml/min}$. W kilku eksperymentach zastosowano z powodzeniem opisaną metodę nawet wówczas gdy stężenie amin katecholowych przekraczało 50 $\mu\text{g/ml/min}$.

Optymalne pH absorpcji amin katecholowych przez aktywowany tlenek glinu, wyznaczone dla celów analizy spektrofluorymetrycznej wynosi 8.6 (1). Jednak każda wartość pH wyższa od 7.0 jest zadawalająca dla dobrej powtarzalności oznaczeń. W zasadowym pH płynu Tyrode'a przepływającego przez kolumnę absorpcja przebadanych stężeń katecholamin wynosi 100%.

Nie zauważono aby na skutek przesączania płynu Tyrode'a przez kolumnę Al_2O_3 zmieniała się w jakikolwiek sposób reaktywność narządów-detektorów na badane substancje. Mogłoby

to zapewne mieć miejsce gdyby w istotny sposób zmieniał się skład jonowy płynu Tyrode'a przepływającego przez kolumnę.

Kształt oraz wymiary kolumny umożliwiają stały i jednostajny wypływ płynu z kolumny przy prędkości podawania płynu 5 ml/min.

Jednorazowe napełnienie kolumny umożliwia całkowitą absorpcję amin katecholowych w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml/min}$ podanych w dziesięciu kolejnych 3 minutowych wlewkach.

d) Praktyczne zastosowanie metody

Powyższa metoda umożliwiła wykrycie prostaglandyno E_2 -podobnej substancji uwolnionej ze ścian kurczących się naczyń krwionośnych. Stosując wysokie stężenie noradrenaliny uzyskano supramaksymalny skurcz naczyń krwionośnych izolowanego ucha królika. Temu skurczowi naczyń towarzyszyło pojawienie się substancji PGE-podobnej w perfuzacie. Ten fakt opisaliśmy już wcześniej bez użycia kolumny Al_2O_3 (12). Jednak wówczas z trudnością dobieraliśmy takie stężenia noradrenaliny, które nie wywołując rozkurczu narządów-detektorów powodowały uwolnienie prostaglandyn z naczyń.

Obecnie opisana technika znosi ograniczenia dawkowania noradrenaliny co pozwala praktycznie w każdym preparacie naczyniowym uzyskać efekt uwalniania prostaglandyn w odpowiedzi na wazokonstrykcję, stosując odpowiednio wysokie stężenie noradrenaliny jak np. 500 ng/ml/min w eksperymencie przedstawionym na rycinie 2.

Opisaną modyfikację metodyczną techniki Vane'a zastosowano z powodzeniem także w pracach badawczych Grodzińskiej i wspł. (10, 11) oraz Gryglewskiego i wspł. (13) nad wyjaśnie-

niem roli prostaglandyn w układzie oddechowym i naczyniowym oraz nad wpływem niektórych sterydowych i niesterydowych leków przeciwzapalnych na uwalnianie prostaglandyn z łożyska naczyniowego krezki. We wszystkich tych pracach usunięcie amin katecholowych z perfuzatu przy pomocy kolumny Al_2O_3 było warunkiem wykrycia i identyfikacji prostaglandyn metodą Vane'a.

e) Wnioski

Zastosowanie kolumny wypełnionej Al_2O_3 w układzie kaskady Vane'a umożliwia biologiczne oznaczenie małych stężeń prostaglandyn w obecności wysokich stężeń amin katecholowych.

W związku z tym proponuje się dwa praktyczne zastosowania tej metody:

- a) Oznaczanie endogennych prostaglandyn uwolnionych z perfundowanych narządów przez aminy katecholowe (10, 11, 12, 13).
- b) Bezpośrednie oznaczanie prostaglandyn w mieszaninie inkubacyjnej syntetyzującej prostaglandyny w obecności wysokich stężeń amin katecholowych użytych jako kofaktory tej reakcji enzymatycznej (25).

IV. BIOLOGICZNE OZNACZANIE HISTAMINY W OBECNOŚCI

PROSTAGLANDYN (PG), "SUBSTANCJI KURCZĄCEJ AORTĘ KRÓLIKA" (RCS), "SUBSTANCJI WOLNO DZIAŁAJĄCEJ" (SRS-A)

a) Wprowadzenie

Stwierdzono przy użyciu techniki Vane'a, iż izolowane, perfundowane płuca uczulonej świnki morskiej uwalniają w czasie wstrząsu anafilaktycznego histaminę, prostaglandyny (PG), "substancję kurczącą aortę królika" (RCS) i "substancję wolno działającą" (SRS-A) (19, 20, 21, 22). Jednoczesne oznaczanie

ilościowe tych substancji metodą biologiczną w płynie perfuzyjnym wpływającym z płuc jest trudne wskutek działania różnych substancji na ten sam detektorowy narząd. Szczególnie kłopotliwe jest oznaczenie histaminy ponieważ najczęściej stosowany biologiczny detektor histaminy mianowicie jelito świnki morskiej (GPI) reaguje skurczem również na PG i SRS-A (21). Błąd oznaczenia histaminy w perfuzacji z płuc uczulonej świnki morskiej może być dość znaczny. Oznaczone przez nas (13) przy użyciu GPI maksymalne stężenie histaminy uwolnionej podczas wstrząsu anafilaktycznego z płuc uczulonej świnki morskiej było około 5 razy wyższe (0.7 - 2.0 $\mu\text{g/ml}$) od tego które oznaczyliśmy spektrofluorymetrycznie (0.17 - 0.38 $\mu\text{g/ml}$) metodą Hakanson'a i Rönnerberg'a (15).

Drugi stosowany detektor histaminy mianowicie pasek jelita kota (5), pomimo iż nie rejestruje obecności SRS-A i PG w perfuzacji, wykazuje wrażliwość w stosunku do bradykininy (5, 21), a także nie jest wykluczone, iż obecność RCS zmienia progową wrażliwość tego narządu na histaminę.

Praktycznie nie było dotychczas żadnej możliwości przeciwdziałania trudnościom biologicznego oznaczania histaminy przy użyciu jelita świnki morskiej w obecności PG, RCS, SRS-A. Nie znamy bowiem żadnych skutecznych farmakologicznych antagonistów PG, RCS i SRS-A, które mogłyby zablokować niepożądaną odpowiedź histaminowego detektora na te substancje. Dla zniesienia wrażliwości GPI na prostaglandyny próbowaliśmy zastosować fosforan polifloretyny (3) w stężeniach powyżej 50 $\mu\text{g/ml}$, ale tego rodzaju blokada nie była ani kompletna ani też wystarczająco selektywna.

Obecnie proponujemy nowy sposób biologicznego oznaczania histaminy w obecności PG, RCS i SRS-A, całkowicie eliminujący dotychczasowe trudności. Sposób ten polega na wprowadzeniu do kaskady Vaner'a absorbcyjnej kolumny z żywicą syntetyczną XAD-2. Kolumna ta absorbuje z płynu omywającego narządy-detektory PG (17), a jak wykazaliśmy również SRS-A oraz RCS, nie absorbując przy tym histaminy.

Opracowana modyfikacja umożliwiła nam zbadanie wpływu sterydowych i niesterydowych leków przeciwzapalnych na tworzenie się autakoidów we wstrząsie anafilaktycznym (13).

b) Użycie kolumny XAD-2 w badaniach nad uwalnianiem autakoidów podczas wstrząsu anafilaktycznego.

Przygotowanie kolumny z syntetyczną żywicą XAD-2

Syntetyczną żywicę amberlit XAD-2 przemywano trzykrotnie podwójnie destylowaną wodą, a następnie sedymentacyjnie wypełniano nią szklaną kolumnę o długości 5 cm i średnicy 2 cm zaopatrzoną w ogrzewany (37°C) płaszcz wodny. Przed użyciem wypełnionej kolumny przemywano ją wodą destylowaną w 100 mililitrowych porcjach a następnie płynem Krebsa podawanym z prędkością 2.5 ml/min przez 15 minut.

Absorbcja prostaglandyn i RCS

Zastosowano dwa identyczne banki narządów-detektorów pomiędzy którymi umieszczano kolumnę wypełnioną bądź amberlitem XAD-2 bądź w kontrolnych eksperymentach watą szklaną. Każdy z banków narządów składał się: z paska aorty królika (RbA) reagującego skurczem na RCS, z paska żołądka szczura (RSS) reagującego skurczem na PGE₂ oraz z jelita świnki morskiej (GPI)

które miało służyć do wykrywania histaminy. Ten układ narządów w kaskadzie stworzył warunki do studiowania właściwości absorbcyjnych kolumny XAD-2 w stosunku do prostaglandyn, RCS i histaminy. Na wierzchołku kaskady narządów w komorze ogrzewanej płaszczem wodnym (37°C) umieszczono izolowane płuca uczulonej świnki morskiej, które przez tętnicę płucną perfundowano natlenianym płynem Krebsa z prędkością 2.5 ml/min (21). Płyn wypływający z płuc omywał narządy-detektory umieszczone w kaskadzie. Wstrząs anafilaktyczny wywoływano wstrzyknięciem do tętnicy płucnej antygeny (albuminy jaja kurzego 10 mg) (21). Testowe dawki prostaglandyny E₂ i histaminy podawano we wlewkach (0.2 ml/min) bezpośrednio na narządy-detektory. Dla zwiększenia swoistej wrażliwości narządów na oznaczane substancje do płynu wypływającego z płuc podawano mieszaninę antagonistów (9) z wyjątkiem mepiraminy. Reakcję narządów-detektorów rejestrowano przy pomocy izotonicznych przekaźników typu Harvard połączonych z 6-kanałowym urządzeniem rejestrującym typu Watanabe.

Absorbcja prostaglandyn i SRS-A

Podobnie jak w poprzedniej serii doświadczeń źródłem autakoidów były perfundowane płuca uczulonej świnki morskiej w których wywoływano wstrząs uczuleniowy. Tym razem perfuzat z płuc omywał dwa paski tchawicy świnki morskiej (GPT) jako detektory SRS-A (21), pasek żołądka szczura (RSS) jako detektor prostaglandyny E₂, dwa jelita świnki morskiej (GPI) jako detektory histaminy. Narządy-detektory oraz kolumnę absorbcyjną XAD-2 umieszczono w kaskadzie w następującej kolejności: GPT, RSS, kolumna XAD-2, dwa GPI (jedno GPI zatrute mepiramina),

GPT. Ten układ narządów w kaskadzie stworzył warunki do biologicznego oznaczania SRS-A i PGE₂ powyżej kolumny XAD-2 oraz SRS-A, PGE₂ i histaminy pod kolumną, a tym samym uzyskano ocenę stopnia absorbcji SRS-A i PGE₂ przez kolumnę XAD-2. Szczegóły doświadczenia podano w opisie ryciny 4.

c) Omówienie wyników

GPI najczęściej stosowany biologiczny detektor histaminy kurczy się w obecności 5 ng/ml tego autakoidu. GPI kurczą także PGE₁ i PGE₂ w progowym stężeniu 10 - 20 ng/ml. W efluencie wpływającym z płuc świnki morskiej podczas wstrząsu anafilaktycznego obok histaminy RCS i SRS-A znajdują się prostaglandyny w stężeniu 43.1 ± 3.8 ng ekwiwalentów PGE₂/ml, n = 24 (13). To stężenie prostaglandyn uniemożliwia dokładne biologiczne oznaczanie histaminy przy użyciu GPI. Również obecność SRS-A (21) oraz RCS może zmieniać wrażliwość GPI w stosunku do histaminy. Dokładne oznaczenie histaminy w takich warunkach jest możliwe tylko przy użyciu kolumny absorbcyjnej XAD-2. Udowodniliśmy, że kolumna XAD-2 w 100% absorbuje przepływające przez nią PGE₁, PGE₂, PGF₂ alfa podane w stężeniu 10 - 150 ng/ml oraz RCS i SRS-A uwalniane z płuc świnki morskiej podczas wstrząsu uczuleniowego (ryc. 3, 4). PGE₂ podana przez kolumnę w stężeniu 1000 ng/ml jest jeszcze absorbowana w 95 - 99%. Kolumna XAD-2 nie absorbuje histaminy (10 - 3000 ng/ml) jak zresztą nie absorbuje również amin katecholowych (10 - 100 ng/ml). Tak więc GPI znajdujące się pod kolumną absorbcyjną rejestruje w perfuzacji z płuc w czasie wstrząsu anafilaktycznego wyłącznie histaminę. Oznaczone w ten sposób stężenie histaminy uwalnianej z płuc świnki morskiej w czasie wstrząsu wynosi

470 \pm 54 ng/ml, n = 10.

Podobnie jak w przypadku kolumny z aktywowanym tlenkiem glinu przesączenie płynu omywającego narządy-detektory przez kolumnę z amberlitem XAD-2 nie zmienia wrażliwości narządów na badane substancje, a kształt i wymiary kolumny umożliwiają stały i jednostajny przepływ płynu przy prędkości podawania płynu do 5 ml/min.

Jednorazowe napełnienie kolumny umożliwia całkowitą absorbcję pięciu kolejnych 3 minutowych wlewk PGE₂ w stężeniu 50 ng/ml. Możliwa jest również regeneracja kolumny (17).

d) Praktyczne zastosowanie metody

Opisana modyfikacja metodyczna techniki Vane'a zastosowana została przez nas w pracy badawczej nad wpływem sterydowych i niesterydowych leków przeciwzapalnych na uwalnianie autakoidów z izolowanych płuc uczulonej świnki morskiej podczas wstrząsu anafilaktycznego (13).

W pracy tej usunięcie z płynu omywającego narządy-detektory PGE₂, RCS, oraz SRS-A przy pomocy kolumny XAD-2 było warunkiem dokładnego oznaczenia ilości histaminy uwalnianej z płuc podczas wstrząsu, co umożliwiło przebadanie wpływu hydrokortyzonu i indometacyny na mechanizm uwalniania histaminy (13).

e) Wnioski

Modyfikacja techniki Vane'a, polegająca na wprowadzeniu do układu kaskady narządów-detektorów absorbcyjnej kolumny z amberlitem XAD-2, umożliwia dokładne biologiczne oznaczanie histaminy w obecności PGE₁, PGE₂, PGF₂ alfa, RCS i SRS-A. Poszerza to możliwości zastosowania techniki Vane'a w badaniach

farmakologicznych, w których oznaczaniu histaminy może towarzyszyć obecność tych substancji np: w płynach tkankowych, w homogenatach lub jak wykazano w perfuzatach z izolowanych narządów (13). Możliwe jest także zastosowanie kolumny XAD-2 w innych eksperymentach, gdy zachodzi konieczność wyeliminowania z roztworu występujących razem lub oddzielnie PGE_1 , PGE_2 , PGF_2 alfa, RCS, SRS-A.

V. STRESZCZENIE

Dotychczas stosowane biologiczne sposoby różnicowego oznaczania hormonów i autakoidów w mieszaninie były niedokładne jak na przykład w wypadku oznaczania prostaglandyn w obecności amin katecholowych i oznaczania histaminy w obecności prostaglandyn, RCS i SRS-A. Obecnie proponuje się nową zasadę różnicowego oznaczania autakoidów. Zasada ta polega na wprowadzeniu do kaskady Vane'a kolumn absorbcyjnych, wybiórczo usuwających z mieszaniny te biologicznie czynne substancje, które przeszkadzają w oznaczaniu wybranego autakoidu.

Opracowaną zasadę różnicowego oznaczania autakoidów zastosowano do biologicznego oznaczania PG wytwarzanych przez naczynia krwionośne pod wpływem wysokich stężeń amin katecholowych oraz do oznaczania histaminy w obecności PGE_2 , RCS i SRS-A uwalnianych z izolowanych płuc uczulonej świnki morskiej podczas wstrząsu uczuleniowego.

Dzięki opisanej kolumnowo-kaskadowej metodzie przeprowadzono podstawowe badania nad rolą PG wytwarzanych w układzie oddechowym (10), zróżnicowano wpływ sterydowych i niesterydowych leków przeciwzapalnych na uwalnianie mediatorów wstrząsu anafilaktycznego (13) oraz wyjaśniono przeciwregulacyjną rolę prostaglandyn w skurczu naczyń krwionośnych (11).

VI. WNIOSEK OGÓLNY

Wprowadzenie absorbcyjnych kolumn do kaskady Vane'a jest nową metodą różnicowego oznaczania hormonów i autakoidów w mieszaninie, poszerzającą możliwości badania ich podstawowych funkcji fizjologicznych.

PIŚMIENICTWO

1. Anton A.M., Sayre D.F. : A study of the factors affecting the aluminum oxidetrihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. J. Pharmacol. Exper. Ther. (1962), 138, 360.
2. Brocklehurst W.E. : The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. J. Physiol. (1960), 151, 416.
3. Eakins K.E., Karim S.M.M. : Polyphloretin phosphate-A selective antagonists for prostaglandins $F_{1\alpha}$ and $F_{2\alpha}$. Life Sci. (1970), 9, 1.
4. Eckenfels A., Vane J.R. : Prostaglandins, oxygen tension and smooth muscle tone. Br. J. Pharmacol. (1972), 45, 451.
5. Ferreira S.M., NG K.K., Vane J.R. : The continuous bioassay of the release and disappearance of histamine in the circulation. Br. J. Pharmacol. (1973), 49, 543.
6. Ferreira S.H., Vane J.R. : The detection and estimation of bradykinin in the circulating blood. Br. J. Pharmacol. (1967), 29, 367.
7. Ferreira S.H., Vane J.R. : Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. Nature, Lond. (1967), 216, 868.
8. Gilmore N.J., Vane J.R. : A sensitive and specific assay for vasopressin in the circulating blood. Br. J. Pharmacol. (1970), 38, 633.

9. Gilmore N.J., Vane J.R., Wyllie J.H. : Prostaglandins released by the spleen. *Nature* (1968), 218, 1135
10. Grodzińska L., Panczenko B., Gryglewski R.J. : Generation of prostaglandin E-like material by the guinea-pig trachea contracted by histamine. *J. Pharm. Pharmacol.* (1975), 27, 88.
11. Grodzińska L., Panczenko B., Gryglewski R.J. : Release of prostaglandin E-like material from perfused mesenteric blood vessels of rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* (1975), w druku.
12. Gryglewski R., Korbut R. : Prostaglandin feedback mechanism limits vasoconstrictor action of norepinephrine in perfused rabbit ear. *Experientia* (1975), 31, 89.
13. Gryglewski R.J., Panczenko B., Korbut R., Grodzińska L., Ocetkiewicz A. : Corticosteroids inhibit prostaglandin release from perfused mesenteric blood vessels of rabbit and from perfused lungs of sensitized guinea pig. *Prostaglandins* (1975), 10 (2), 343.
14. Gryglewski R., Vane J.R. : The generation from arachidonic acid of rabbit aorta contracting substance (RCS) by a microsomal enzyme preparation which also generates prostaglandins. *Br. J. Pharmacol.* (1972), 46, 449.
15. Hakanson R., Rönnerberg A.L. : Improved fluorometric assay of histamine : condensation with o-phthalaldehyde at -20°C . *Analytical Biochemistry* (1974), 60, 560.

16. Horton E.W. : Human urinary kinin excretion. Br. J. Pharmacol. (1959), 14, 125.
17. Keirse M.J.N.C., Turnbull A.C. : Extraction of prostaglandins from human blood. Prostaglandins (1973), 4, 607.
18. Mann M., West G.B. : The nature of hepatic and splenic sympathin. Br. J. Pharmacol. (1950), 5, 173.
19. Palmer M.A., Piper P.J., Vane J.R. : Release of rabbit aorta contracting substance(RCS) and prostaglandins induced by chemical or mechanical stimulation of guinea-pig lungs. Br. J. Pharmacol.(1973), 49, 226.
20. Piper P.J. : Release and metabolism of prostaglandins in lung tissue. Pol. J. Pharmacol. Pharm. (1974), 26, 61.
21. Piper P.J., Vane J.R. : Release of additional factors in anaphylaxis and its antagonism by anti-inflammatory drugs. Nature, Lond. (1969),223,29.
22. Piper P.J., Vane J.R. : The release of prostaglandins from lung and other tissues. Ann. N.Y.Acad.Sci. (1971), 180, 363.
23. Regoli D., Vane J.R. : A sensitive method for the assay of angiotensin. Br. J. Pharmacol. (1964), 23, 351.
24. Regoli D., Vane J.R. : The continuous estimation of angiotensin formed in the circulation of the dog. J.Physiol., Lond. (1966), 183, 513.

25. Takeguchi C., Kohno E., Sih C.J. : Mechanism of prostaglandin biosynthesis. I Characterisation and assay of bovine prostaglandin synthetase. *Biochemistry* (1971), 10, 2372.
26. Vane J.R. : A sensitive method for the assay of 5-hydroxytryptamine. *Br. J. Pharmacol.* (1957), 12, 344.
27. Vane J.R. : The use of isolated organs detecting active substances in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol.* (1964), 23, 360.
28. Vane J.R. : The estimation of catecholamines by biological assay. *Pharmac. Rev.* (1966), 18, 317.
29. Vane J.R., Williams K.I. : A sensitive method for the assay of oxytocin in the circulating blood. *Br. J. Pharmacol.* (1974), 52, 295.

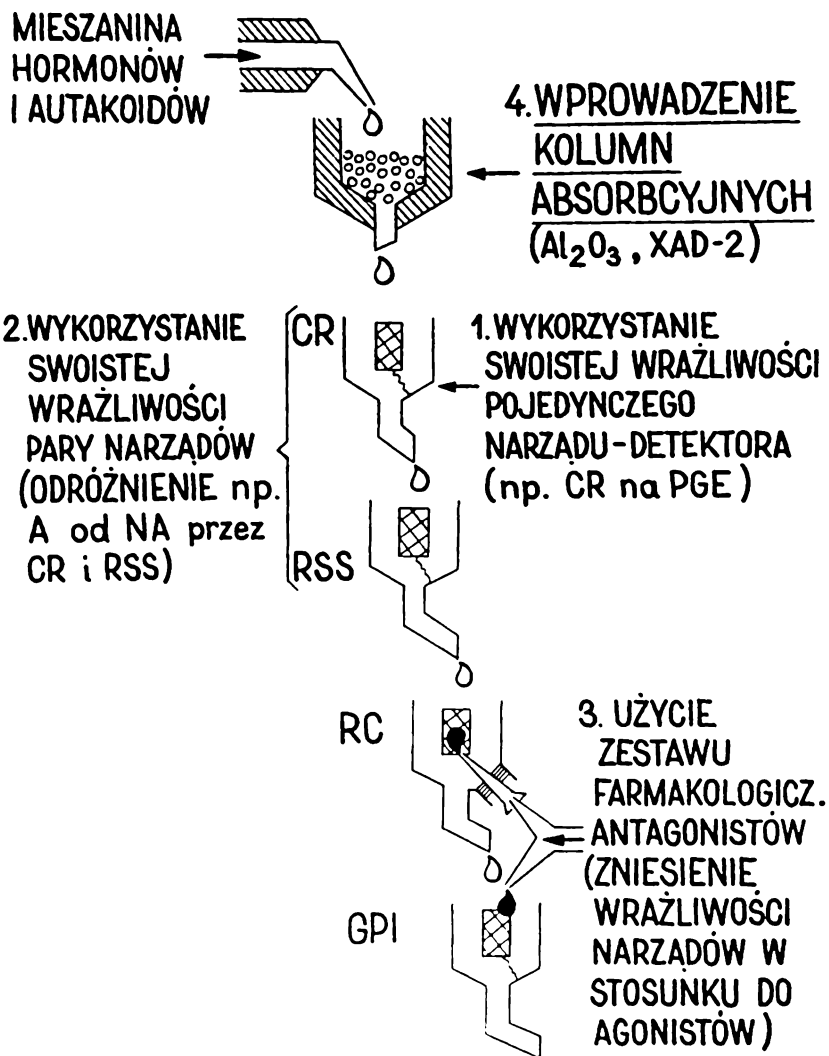
D O K U M E N T A C J A

NARZĄD- DETEKTOR	ADRENALINA	NORADRENALINA	PROSTAGLANDYNA		ACETYLOCHOLINA	HISTAMINA	5-HT	BRADYKININA	ANGIOTENZYNA II	OKSYTOCYNA	WAZOPRESYNA
			F ₁ F ₂	F _{2R}							
RSS						—				—	
CR		—				—	—	—	—	—	—
RC						—				—	—

Tabela 1.

Swoista wrażliwość paska żołądka szczura (RSS), prostaty kurcząt (CR) i okrężnicy szczura (RC) omywanych w kaskadzie natlenianym płynem Tyrode'a na dwanaście biologicznie aktywnych substancji w stężeniu 5 ng/ml/min, podawanych w 3 minutowej wlewie.

BIOLOGICZNE SPOSOBY RÓŻNICOWEGO
OZNACZANIA HORMONÓW I AUTAKOIDÓW
W MIESZANINIE :



Ryc. 1

Opis do ryc. 2

Narządy-detektory : prostnica kurczęcia (CR), pasek żołądka szczura (RSS), oraz okrężnica szczura (RC) były omywane w kaskadzie płynem Tyrode'a, którym perfundowano (2 ml/min) naczynia krwionośne izolowanego ucha królika. Do płynu opuszczającego naczynia dodawano mieszaninę zawierającą 2 µg/ml propranololu, 0.2 µg/ml fenoksybenzaminy oraz 2 µg/ml indometacyny w takiej objętości, iż ostateczna szybkość superfuzji narządów-detektorów wynosiła 5 ml/min.

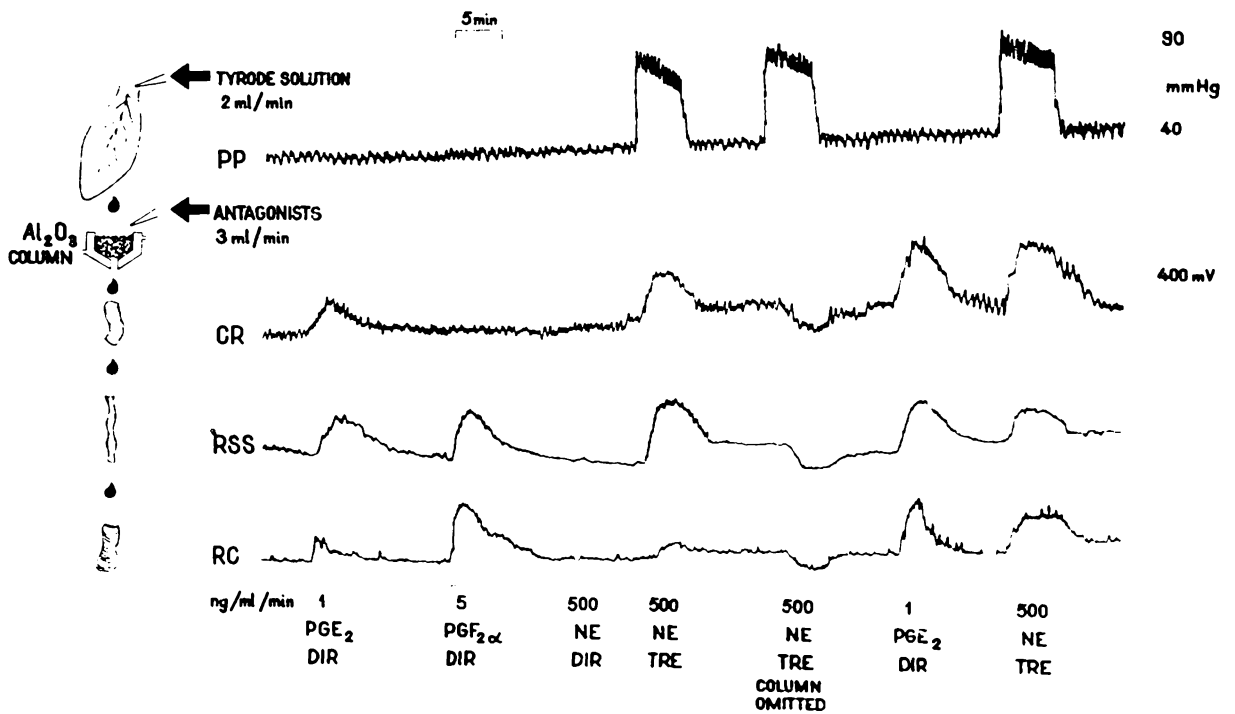
Zanim superfuzyjny płyn zetknął się z narządami-detektorami przepływał przez kolumnę z aktywowanym tlenkiem glinu.

W jednym tylko przypadku, podczas drugiej wlewki noradrenaliny do naczyń ucha, płyn skierowany był bezpośrednio na narządy z pominięciem kolumny Al_2O_3 (TRE).

Ciśnienie perfuzyjne (PP) rejestrowano używając czujnika ciśnieniowego typu Harvard. Wrażliwość narządów na prostaglandyny E_2 i F_2 alfa testowano wlewką tych prostaglandyn przez kolumnę do płynu opuszczającego naczynia (DIR). Czas zaznaczony 5 minut. Czułość zapisu podano w mV/cm.

Doświadczenie to ilustruje następujące zjawiska:

- a) selektywną drażliwość CR na PGE_2 oraz odróżnianie PF_2 alfa od PGE_2 przez parę narządów RSS i RC (DIR)
- b) całkowitą absorpcję NE przez kolumnę Al_2O_3 (DIR - bezpośrednia wlewka NE na narządy przez kolumnę)
- c) uwolnienie substancji prostaglandyno E-podobnej z perfundowanego ucha królika przez wlewkę noradrenaliny
- d) ostrą tolerancję PP na noradrenalinę. Zjawisko to związane jest prawdopodobnie z uwolnieniem substancji prostaglandyno E-podobnej przez NE, gdyż nie występuje po zahamowaniu aktywności syntetazy prostaglandynowej przez indometacynę (12).



Ryc. 2.

Uwalnianie substancji prostaglandyno E-podobnej z perfundowanego ucha królika przez wlewki noradrenaliny (NE 500 ng/ml/min w ciągu 5 minut).

Opis do ryc. 3

Izolowane płuca dwóch uczulonych świnek morskich (lungs I i lungs II) perfundowano z prędkością 2.5 ml/min płynem Krebsa. Płyn wypływający z płuc omywał kaskadowo narządy-detektory zestawione w dwóch identycznych zespołach, z których każdy składał się z paska aorty królika (RbA) detektora RCS, paska żołądka szczura (RSS) detektora PGE oraz jelita świnki morskiej (GPI) detektora histaminy. Kolumna z amberlitem XAD-2 umieszczona była w kaskadzie (ON) tylko w czasie perfuzji drugich płuc (lungs II). Podczas perfuzji pierwszych płuc (lungs I) kolumna była wypełniona szklaną watą (OFF). Dawki testowe PGE₂ i histaminy (H) podawano do płynu opuszczającego płuca, na wierzchołek kaskady. Antygen (OVA) – albuminę jaja kurzego (10 mg) podawano do tętnicy płucnej.

Podczas perfuzji pierwszych płuc (lungs I) można zaobserwować następujące zjawiska:

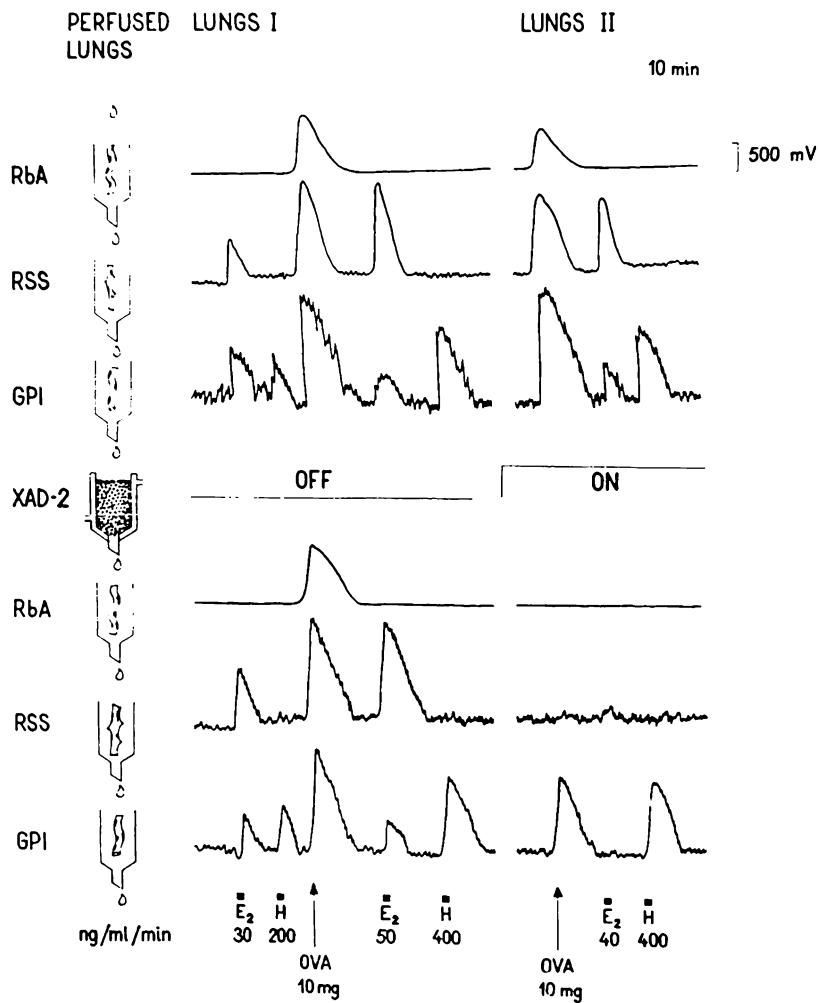
1/ Oba GPI są około 6 razy mniej wrażliwe na testowe dawki histaminy niż na PGE₂. Oba RbA nie kurczą się ani na histaminę ani na PGE₂. Oba RSS nie są wrażliwe na testowe dawki histaminy, reagują wyłącznie na PGE₂.

2/ Podanie antygenu (OVA) wywołuje wstrząs anafilaktyczny w czasie którego z płuc uwalniają się RCS rejestrowana jako skurcz obu RbA, substancja PGE-podobna rejestrowana skurczem obu RSS. Wysokość skurczu obu GPI podczas wstrząsu jest większa niż skurczowych odpowiedzi GPI wywołanych testową dawką 400 ng/ml histaminy. Podczas perfuzji drugich płuc (lungs II) drugi zespół narządów został oddzielony od zespołu pierwszego kolumną wypełnioną XAD-2.

Można zaobserwować następujące zjawiska :

1/ Kolumna absorbcyjna XAD-2 pochłania uwolnione w czasie wstrząsu RCS i substancję PGE-podobną, W ten sposób obecność tych substancji w płynie perfuzyjnym jest rejestrowana wyłącznie przez RbA i RSS umieszczone powyżej kolumny. Podczas wstrząsu skurcz GPI znajdującego się powyżej kolumny jest, podobnie jak w wypadku płuc I, znacznie wyższy niż skurcz wywołany testową dawką histaminy 400 ng/ml.

2/ GPI pod kolumną rejestruje w czasie wstrząsu rzeczywiste stężenie uwolnionej histaminy, które odpowiada 400 ng/ml testowej dawki tego autakoidu. Można wnosić, że skurcz GPI powyżej kolumny był wywołany nie tylko histaminą lecz również PG.



Ryc. 3.

Zastosowanie kolumny XAD-2 do biologicznego oznaczania histaminy w efluencie z płuc uczulonej świnki morskiej podczas wstrząsu anafilaktycznego. Dowód na pochłanianie przez kolumnę prostaglandyn i RCS.

Opis do ryc. 4

Izolowane płuca uczulonej świnki morskiej perfundowano płynem Krebsa z prędkością 2.5 ml/min. Efluent z płuc omywał umieszczone w kaskadzie narządy-detektory. Kolumna XAD-2 umieszczona była w kaskadzie tylko w pierwszej części eksperymentu. W drugiej części eksperymentu amberlit XAD-2 usunięto (column removed), a kolumnę wypełniono szklaną watą. Zastosowano następujące narządy-detektory : powyżej kolumny absorbcyjnej pasek tchawicy świnki morskiej (GPT) jako detektor SRS-A, pasek żołądka szczura (RSS) jako detektor PGE₂, natomiast pod kolumną dwa jelita świnek morskich (GPI) jako detektory histaminy, a ponadto jeszcze jeden GPT. W celu uzyskania wybiórczej wrażliwości narządów na badane substancje, do efluentu z płuc dodawano wlewkę mieszaniny farmakologicznych antagonistów (9). Na dwa ostatnie narządy (GPI, GPT) podawano wlewkę dodatkowej mepyraminy (uzasadnienie w dalszej części opisu). Testowe dawki PGE₂ i histaminy (H) podawano do efluentu zarówno poniżej kolumny (■) jak i na wierzchołek kaskady (▲).

Wstrząs anafilaktyczny wywoływano w płucach przez podanie do tętnicy płucnej antygenu (albumina jaja kurzego 5 mg) (OVA).

W pierwszej części eksperymentu z kolumną XAD-2 zachodzą następujące zjawiska:

1/ 25 ng/ml PGE₂ podanej pod kolumną absorbcyjną kurczy oba GPI.
Wniosek - oba GPI są wrażliwe na prostaglandyny.

2/ 50 ng/ml PGE₂ podanej na wierzchołek kaskady kurczy tylko RSS
Wniosek - PGE₂ w stężeniu 50 ng/ml jest absorbowana przez
amberlit XAD-2.

3/ 250 ng/ml histaminy podanej na wierzchołek kaskady kurczy tylko GPI znajdujące się bezpośrednio pod kolumną.

Wnioski: histamina nie jest absorbowana przez amberlit XAD-2, mepyramina podawana w mieszaninie antagonistów znosi wrażliwość na histaminę tylko tych narządów, które znajdują się powyżej kolumny, co oznacza że mepyramina jest absorbowana przez amberlit XAD-2. Dla zniesienia histaminowej wrażliwości narządów pod kolumną XAD-2 niezbędna jest dodatkowa wlewka mepyraminy.

4/ Podczas wstrząsu anafilaktycznego (OVA) uwalniająca się SRS-A rejestrowana jest tylko przez GPT umieszczony powyżej kolumny. Na obecność uwolnionej histaminy reaguje GPI nie zatrute dodatkową wlewką mepyraminy.

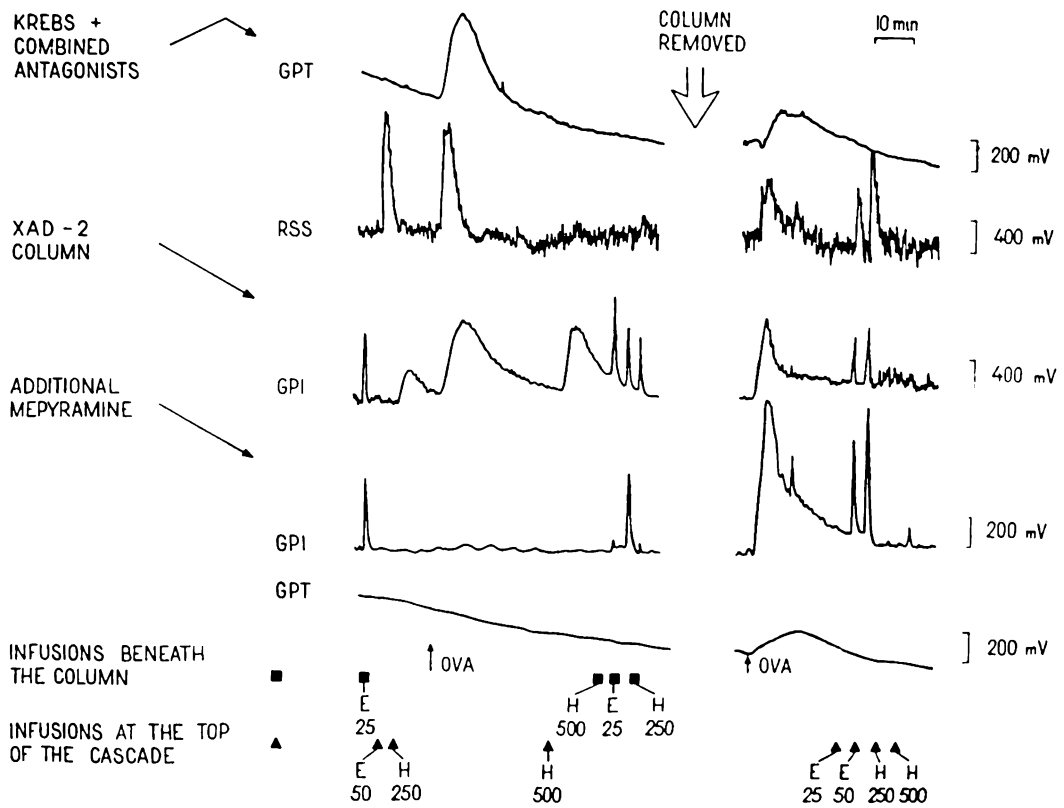
Wnioski: SRS-A jest absorbowana przez kolumnę XAD-2. Biologiczne oznaczenie uwolnionej histaminy przy użyciu GPI znajdującego się pod kolumną XAD-2 wyklucza interferencję działania PG i SRS-A na ten narząd.

W drugiej części eksperymentu, gdy z kolumny usunięto amberlit XAD-2 i napełniono ją szklaną watą (column removed) obserwuje się:

1/ Podczas wstrząsu anafilaktycznego obecność SRS-A rejestrują oba GPT.

2/ Testowe dawki PGE₂ kurczą oba GPI tak samo jak RSS. Oba GPI nie reagują na stężenie 250 i 500 ng/ml testowych dawek histaminy (mepyramina obecna w efluencie zatrzyma teraz wszystkie narządy-detektory).

Wnioski: skurcz obu GPI podczas wstrząsu anafilaktycznego spowodowany jest obecnością w perfuzacji substancji PGE-podobnej oraz SRS-A. Biologiczne oznaczenie uwolnionej histaminy przy użyciu GPI bez kolumny XAD-2 w kaskadzie jest niemożliwe. GPT jest właściwym narządem do oznaczania SRS-A.



Ryc. 4

Zastosowanie kolumny XAD-2 do biologicznego oznaczania histaminy w efluencie z płuc uczulonej świnki morskiej podczas wstrząsu anafilaktycznego. Dowód na pochłanianie przez kolumnę prostaglandyn i SRS-A.