Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

AUTOBIOESEJ U KONTROLI KVALITETA LIJEKOVA

SEID HUKOVIĆ, NEDŽAD MULABEGOVIĆ, ELVEDINA KAPIĆ, IRIS RAJMAN, BILJANA IVKOVIĆ i NEDIM HUKOVIĆ

Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinksog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.017

Apstrakt. Autobioesejom na izoliranim organima se naziva analiza djelovanja egzogeno dodatih lijekova uz istovremenu stimulaciju pripadajućih motornih nerava. Autobioesejom, posebno upotrebom izoliranih inerviranih organa, se mogu dobiti brzi, relevantni i pouzdani rezultati u kontroli kvaliteta lijekova. Pomenuti izolirani i inervirani organi će dati rezultate ako se upotrebljavaju kao instrument, ili ako se upotrebljavaju kao mjesto djelovanja lijeka, u ovom drugom slučaju u smislu da se registruje efekt lijeka. Pod uticajem istovremene stimulacije pripadajućih nerava i pod uticajem dodate supstance registruju se efekti koji se inače ne bi mogli registrovati niti uočiti. Pomoću autobioeseja sa izoliranim tkivima se može izbjeći vivisekcija, posebno ona koja se čini ponavljanjima, da se zadovolje određeni standardi. Isto tako, autobioesej može poslužiti radi ispitivanja neurotransmisija i kotransmisija, a oni su nezaobilazni u tumačenju kvaliteta djelovanja lijekova. Izolirani organi mogu biti modificirani na razne načine tako da budu što vrjedniji. Prethodna modifikacija može biti farmakološka, mehanička, in situ i in vitro. Opisane su takve modifikacije tako da liče ispitivanja in vitro onima in situ i in vivo. Preporučena je upotreba auotbioeseja u kontroli kvaliteta lijekova i njihovog djelovanja.

Ključne riječi: autobioesej, izolirani organi, kontrola kvaliteta.

UVOD

Autobioesej se u farmakološkoj analizi mnogo manje koristi nego što to zaslužuje s obzirom na njegovu vrijednost, relevantnost i efikasnost. Pod pojmom autobioeseja se podrazumijeva biološko ispitivanje lijekova kada se koristi biološko tkivo kao instrument i kao predmet djelovanja lijekova. Uz to se stimulišu vlastiti nervi pomenutog organa a dodaje se i ispitivana supstanca (R a n d and M i t c h e s o n, 1986).

Ukoliko se istovremeno stimulišu vanjski ili unutrašnji nervi i dodaje ispitivana supstanca, onda se radi o uzajamnom djelovanju — a) endogenog transmitora i b) egzogeno dodate ispitivane supstance.

Izradu ovog rada je sufinansirao SIZ nauke BiH iz sredstava DC XIV.

U tom slučaju dolazi do uzajamnog uticaja endogenih i egzogenih aktivnih supstanci. Ako se radi o izoliranim i inerviranim mišićnim organima, oni u tom slučaju postaju osjetljiviji i pogodniji za ispitivanje kvaliteta i kvantiteta djelovanja lijekova. Efekt dodate supstance se pojačava ili otkriva (Huković, 1980).

Opisani način djelovanja i ispitivanja djelovanja kada se istovremeno stimuliraju motorni nervi i izvana dodaju ispitivane supstance Rand i Mitchelson (1986) su nazvali autobioesej. To su tzv. model-sistemi izolirani i inervirani organi (IIO) pogodni za mnoge vrste bioeseja. Razlikuju se dvije vrste model-sistema; prva vrsta su oni organi koji se spontano kontrahiraju (na pr. srce), druga vrsta su oni organi koji ne pokazuju spontane reakcije, pa ih na reakciju nagone električne stimulacije pripadajućih motornih nerava.

Za razumijevanje djelovanja pomenutih bioloških struktura koje služe kao instrument ili kao objekt-predmet djelovanja pojedinih lijekova, treba razumjeti neurotransmisiju i kotransmisiju. Danas se govori o glavnom transmitoru i brojnim kotransmitorima kako u vegetativnim organima tako i organima inerviranim somatskim nervima (Burnstock, 1990). Pomenuti model-sistemi mogu biti pogodan model ne samo za ispitivanje kvantiteta i kvaliteta djelovanja lijekova nego također mogu biti pogodni i za ispitivanje nervne transmisije i kontransmisije.

Cilj ovog rada je opisati postupak za kvalitativno ispitivanje lijekova pomoću autobioeseja, koristeći se izoliranim inerviranim organima. Cilj je također ukazati da ovi organi mogu biti upotrijebljeni za ispitivanje nervne transmisije i kotransmisije.

MATERIJAL I METODE

Izolirani organi sa pripadajućim nervima su uzimani od eksperimentalnih životinja, od domaćih životinja iz klaonice i od ljudi. Od ljudi se uzimaju odbačeni dijelovi organa odbačenih za vrijeme operacija. Najpogodnije eksperimentalne životinje su mlađe životinje, 80% od maksimalne težine; obično su to životinje oba pola, jer se često uzimaju dijelovi organa iz genitourinarnog sistema.

Uzimaju se slijedeći organi sa pripadajućim vanjskim motornim nervima: mokraćni mjehur sa pelvičkim holinergičkim nervom, duktus deferens sa hipogastričkim adrenergičkim nervom, iris sa cilijarnim nervom, ezofagus sa vagusnim ezofagealnim nervom, želudac sa gastričkim vagusnim nervom, kolon sa dva nerva hipogastričkim adrenergičkim i pelvičkim holinergičkim nervom. Ovo su samo neki model-sistemi koji se najčešće upotrebljavaju mada postoje brojni model-sistemi iz raznih organskih sistema.

Ukoliko je pripadajući vanjski nerv nježan i prijeti opasnost da pukne, onda se uzima sa okolnim tkivom, npr. sa adventicijom ili, u slučaju preparacije želuca miša, uzima se gastrični ogranak vagusnog nerva sa ezofagusom, s tim da se mišićni dio ezofagusa presječe.

U tom slučaju se u prstenaste elektrode uvlači presječeni ezeofagus, ali uz intaktne nerve. Postoje organi koji su osjetljivi na manipulaciju i dulju hipoksiju (na pr. srce). Takvi organi se prethodno perfundiraju i ispiru sa otopinom u kojoj će se kasnije suspendirati ili perfundirati.

Nakon preparacije mišićnog organa i njegovog nerva — a detaljna tehnika preparacije je ranije opisana (H u k o v i ć, 1980) — organ se suspendira u posudu za izolirane organe. Posuda sadrži tačno određenu količinu zagrijane i aerirane otopine, obično 20 ml. Nervi se uvlače u elektrodu prije ili poslije suspenzije organa, što ovisi od tehničkih mogućnosti. Organ se priveže za transducere i, ukoliko je organ pokretan (na pr. duktus deferens), onda je bolji izotonički transducer, i obratno, ukoliko organ razvija silu (na pr. krvni sud), onda je bolji izometrijski transducer. Postoje tzv. auksotonički transduceri kojima se mjeri i sila i pokret.

Nakon suspenzije se izolirani organi neko vrijeme adaptiraju u posudi za izolirane organe, a onda počinje električna stimulacija motornog nerva. Stimulacija može ići preko vanjskog nerva ili preko unutrašnjeg nerva tzv. koaksijalna ili transmuralnom stimulacijom. Nekada je stimualcija miješana preko vanjskog i unutrašnjeg nerva ili ganglija. Stimulira se u početku da se ustanovi jednakomjerna kontrolna kontrakcija da bi se imala kontrolna vrijednost. Najbolje je naći kontrolnu visinu koja je Emax/2, tj. polovinu maksimalne kontrakcije, što se postiže mijenjajući jačinu električnog impulsa. Nakon nekoliko kontrolnih jednakomjernih kontrakcija, dodaje se ispitivana supstanca. Odgovor organa može biti povećanje ili smanjenje visine izazvanih kontrakcija, promjena bazalne linije, odnosno kombinacija pomenutih promjena. Posuda se zatim ispire i ponovo registruju kontrolne kontrakcije. Registruje se najmanje šest kontrolnih kontrakcija prije nego se dodaje ispitivana supstanca.

U kontroli kvaliteta i kvantiteta lijekova se obično radi tako da se dodaje ispitivana supstanca i uporedi sa standardom, odnosno sa rezultatom koji je ranije registrovan sa supstancama sličnog djelovanja. Iza toga se supstanca ispire, pa se prati koliko će brzo doći do kontrolnih vrijednosti. Nekada su potrebna višekratna ispiranja. Vrijednost se izražavaju u apsolutnim ili relativnim vrijednostima promjene visine izazvanih kontrakcija, odnosno tonusa. Promjene koje se registruju uzevši u obzir kontrolnu bazalnu liniju se nazivaju apsolutne, a promjene od nove bazalne linije se nazivaju relativne. Na pr., ako se radi o povećanju visine izazvanih kontrakcija i ako se mjeri od kontrolne bazalne linije, onda se govori o apsolutnoj visini kontrakcija. Ako se mjerenje vrši od nove bazalne linije, koja je povećana zbog uticaja ispitivane supstance, onda se visina izazvanih kontrakcija naziva relativna visina.

Supstance koje se ispituju na ovaj način, in vitro, koristeći kao model-sisteme izolirane i inervirane organe, su u pravilu hidrosolubilne. Ukoliko supstanca nije hidrosolubilna, onda se pokušava napraviti suspenzija. Ponekad je potreban poseban vehikulum. Ako se to dogodi, onda je potrebno provjeriti djelovanje vehikuluma. Ako ve-

hikulum ima djelovanje per se, potrebno je to djelovanje u prosuđivanju kvaliteta lijekova uzeti u obzir. Supstance koje se ispituju treba ostaviti neko vrijeme u posudi, ali to vrijeme mora biti toliko da se može vršiti komparativna analiza.

REZULTATI

Efekt električne stimulacije

Električna stimulacija pripadajućih motornih nerava će izazvati kontrakciju, relaksaciju ili, najčešće, kombinaciju. Prvo će uslijediti kontrakcija iza koje slijedi spora relaksacija. Mnogo se lakše registruju promjene koje su čista kontrakcija nego efekt koji je čista relaksacija. Zahtjev je da konstantan električni stimulus izaziva ravnomjerne promjene. Kontrakcije se mogu ponavljati više stotina puta ukoliko interval među kontrakcijama nije prekratak. Intervali mogu biti od 10 do 60 sekundi. Kontrakcije mogu biti izazvane pojedinačnim impulsima ili serijom impulsa, kada nastaju tetaničke kontrakcije. Kod nekih organa je potrebno produžiti interval na 120 sekundi, kao na pr. kod izoliranog želuca.

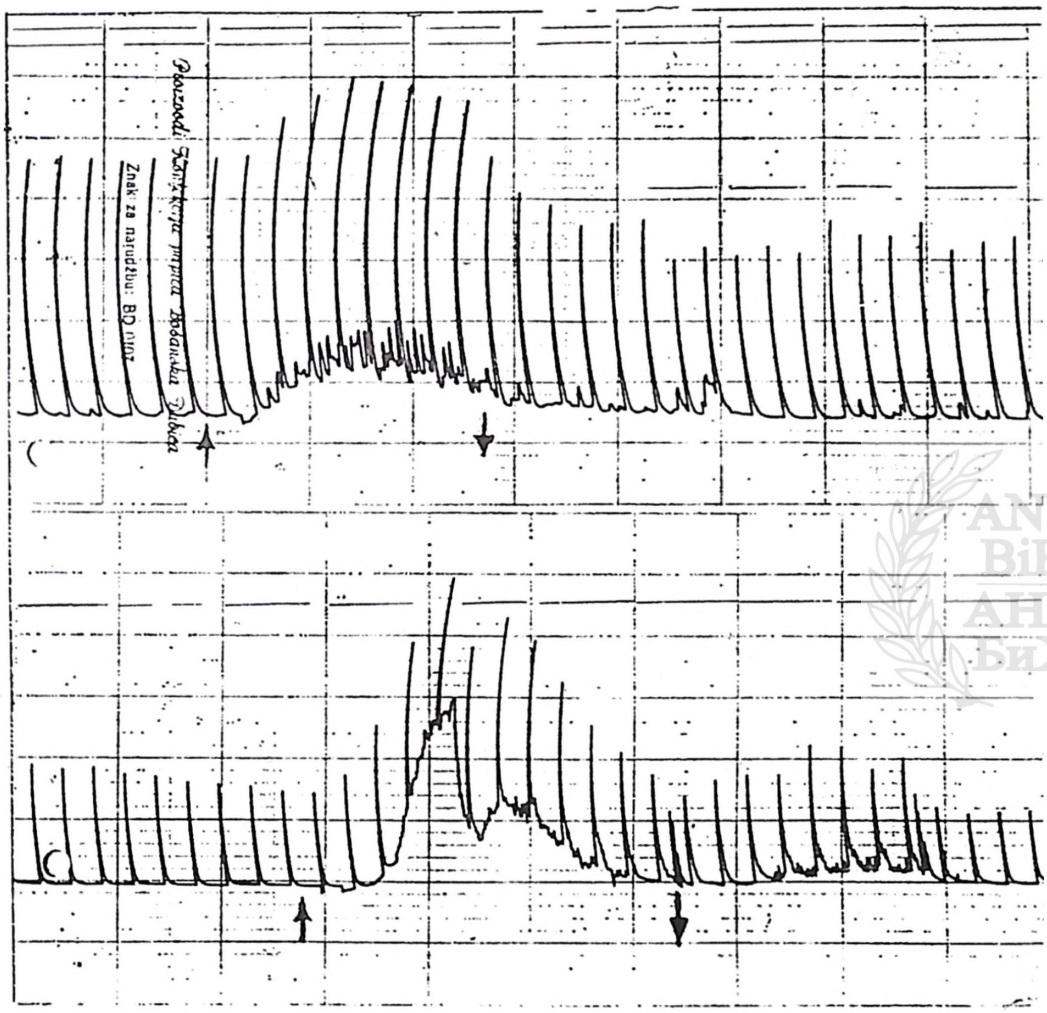
Električni impulsi su pojedinačni ili u seriji. Za organe kao što je ezofagus, m. tenzor timpani, dijafragma, odnosno ako se radi o poprečno-prugastim mišićima, impulsi su pojedinanči. Ako se radi o organima koji imaju glatke mišiće, onda je najpogodnija stimulacija sa električnim impulsima slijedećih karakteristika: 10—20 Hz, duljina impulsa manja od 1mSek, a jačina impulsa 10—20 mA. Trajanje serije impulsa je jedna sekunda, a intervala 60—120 sekundi.

Efekt ispitivane supstance

Efekt ispitivane uspstance može biti povećanje ili smanjenje izazvanih kontrakcija, povećanje ili smanjenje bazalne linije (tonusa). Mnogo je rjeđe da je efekt dodate supstance relaksacija, odnosno promjena pravca efekta stimulacije nerava. Takva inverzija efekta da u kontrolnim uslovima dolazi do kontrakcije, a nakon tretiranja dolazi do relaksacije se može vidjeti ako je životinja prethodno tretirana sa rezerpinom ili nekom drugom supstancom koja mijenja sistem glavnog transmitora. Događa se ometanje oslobađanja, stvaranja ili sličnih modifikacija transmitornog sistema. Rezultat djelovanja neke supstance je modifikacija apsolutne ili relativne visine kontrakcije. Promjena apsolutne visine kontrakcije se računa kao promjena od kontrolne bazalne linije, dok se promjena relativne visine računa od promijenjene bazalne linije (sl. 1).

Kao što se vidi na sl. 1, ispitivana supstanca u konkretnom slučaju latrotoksin, može povećati visinu kontrakcija i tonus. U ovom slučaju se radi o pojačanom oslobađanju transmitora. Transmitori nisu isti u oba primjera. U slučaju mokraćnog mjehura glavni transmitor je acetilholin, a u slučaju duktus deferensa glavni transmitor je noradrenalin. Promijenjen je tonus organa i visina kontrakcija. Vjerovatno

se oslobađa brzo tokom stimulacije transmitor iz nerva i tako izaziva promjene visine kontrakcije, ali se istovremeno oslobađa transmitor iz spremišta u tkivu i to sporije i dijelom bez veze sa stimulacijom. Pomenuti efekti se superponiraju, pa postoji povećanje kako apsolutne tako i relativne visine kontrakcija.



Slika 1. Kontrakcije izazvane stimulacijom vanjskih nerava. Gore mikcione kontrakcije, dole kontrakcije duktus deferensa. Kod znaka ↑ dodat je latrotoksin, a kod znaka ↓ posuda je isprana. Primijetiti povećanje tonusa i visine izazvanih kontrakcija

Efekt prethodno promijenjenog organa

Organi za ispitivanje u smislu autobioeseja mogu se uzimati od kontrolnih i od zdravih životinja, ili od životinja koje su prethodno tretirane, dakle još in situ. Prethodno tretiranje se može izvesti bilo da se kasnije povećavaju ili smanjuju izazvane reakcije. Organi koji

će kasnije služiti kao model-sistemi za ispitivanja mogu biti prethodno in vitro mijenjani farmakološki ili mehanički. Farmakološki se obično tretiraju radi odstranjivanja dijela inervacije, pa se otkriva sekundarna inervacija, odnosno kotransmisija. Mehanički se tretiraju na taj način da se okreću kao prst na rukavici, tako da ispitivana supstanca dolazi prvo na mukozu, iako prvo dolazi na serozu.

Organi in situ uz održani krvtook ili bez krvotoka

Pojedini organi mogu se preparitati tako da se stimuliraju njihovi motorni nervi, a da je očuvan krvotok, dakle i situ i in vivo. Tako se mogu registrovati efekti supstanci apliciranih direktno na organ ili u venoznu krv. Mogu se međutim preparirati organi koji se nalaze in situ, ali na mrtvoj životinji, gdje nema vlastite cirkulacije, pa se mora osigurati suspenzija, ispiranje i oksigenacija. U tom slučaju se od šupljine gdje se nalaze takvi organi napravi mjesto gdje se drži otopina kao u posudi za izolirane organe. Razumljivo da se u tom slučaju nervi uvlače u elektrodu, a oni su potopljeni isto kao i organ koji se kontrahuje.

DISKUSIJA

Autobioesej na izoliranim i inerviranim organima (IIO), kao i na modifikacijama takvih preparacija se relativno rijetko iskorištava u kontroli kvaliteta lijekova. Manje korištenje takvih IIO ima dva uzroka. Takvi organi mogu biti instrument na kome se ispituje, a mogu biti i predmet istraživanja, tj. da se vidi efekt ispitivane supstance. Prvi od uzroka što se IIO manje upotrebljavaju je postojanje elektronskih instrumenata i aparata velike osjetljivosti. Manjak, samo i jedne upotrebe aparata, jeste da se na IIO osim mjere mogu dobiti drugi efekti. Drugi uzrok leži u tome jer se misli da su model-sistemi apstrakcija u odnosu na djelovanje lijekova in vivo. Djelovanja in vivo su sasvim drugačija kvalitativno i kvantitativno.

Autobioesej na opisanim organima može biti alternativna metoda istraživanja viviseksiji (Lembeck, 1988; Holzer, 1988; Huković i Potkonjak, 1991). Danas se ispitivanje lijekova putem vivieskcije, posebno ona koja idu sa testiranjima i njihovim ponavljanjima, smatraju nepotrebnim, skupim i irelevantim. Model-sistemi mogu dobro zamijeniti neke vivisekcijske metode, a da se ne izgubi ništa od spoznaje o kvalitetu lijekova. Autobioesej sa IIO daje također mogućnosti za ispitivanje endogene transmisije i kotransmisije (Burnstock, 1990). Za objašnjenje mehanizma djelovanja u analizi kvaliteta lijeka je važno poznavati neurotransmisiju i neurokotransmisiju.

Autobioesej na IIO kao model-sistemima otvara mogućnost utvrđivanja koji, kada i koliko se neurotransmitora oslobađa nakon stimulacije nerava. Sve je više revijalnih publikacija o kotransmisiji. Neka se spomenu samo novije: Hokfelt i sar. (1986), Campbell (1987), Bartfai i sar. (1988), Furnes i sar. (1989), Kupfer-

mann (1990). Po svemu izgleda da je hipoteza o kotransmisiji prihvaćena i da je danas malo autora koji misle da se nakon stimulacije motornog nerva oslobađa samo jedna supstanca. Piše se o jednom glavnom neurotransmitoru i pomoćnim kotransmitorima. U tumačenju djelovanja lijekova i u njihovom ispitivanju kvaliteta nezaobilazni su neurotransmitori.

Danas su ustanovljeni slijedeći neurotransmitori potrebni za tumačenje djelovanja lijekova. To su: noradrenalin, acetilholin, adenozintrifosfat, serotonin, dopamin, enkefalin-dinorfin, vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP), supstanca P, gastrin (relizing) peptid (GRP), somatostatin, neurotenzin, vazopresinu sličan peptid (VP), holecistokinin-gastrin, neuropeptid Y-pankretaički neuropeptid (NPY), galanin (GAL), angiotenzin, ACTH i kalcitonin (gen-related) peptid (CGRP) (Burnstock, 1990). Svi pomenuti neurotransmitori mogu biti glavni ili kotransmitori. Svi oni mogu biti relevantni za vrednovanje kvaliteta lijeka na IIO. Međutim, model-sistemi opisani u ovom radu mogu biti vrlo koristan i produktivan instrument za proučavanje transmisije i kotransmisije, a ne samo za ispitivanje djelovanja lijekova.

Autobioesej u kontroli kvaliteta i kvantiteta djelovanja lijeka može poslužiti za brzu, efikasnu i jeftinu analizu djelovanja. Da se autobioesej usavrši, potrebno je ponoviti i standardizirati procedure i na taj način unaprijediti metodologiju istraživanja lijekova u dva pravca. Dodati savremenim elektronskim aparatima, koji dobro mjere kvantitativni i kvalitativni aspekt. To će biti moguće ako se uz njih uključe i opisani model-sistemi, naime biće moguće na autobioeseju vidjeti i registrovati i druga kvalitativna, prvenstveno nova djelovanja lijekova.

ZAKLJUČAK

Autobioesej u kontroli kvaliteta lijekova je upotreba biološkog materijala uz istovremenu reakciju izazvanih vlastitih neurotransmitora. U radu je opisan poseban materijal za autobioesej, a to su izolirani i inervirani organi koji kao model-sistemi mogu dobro poslužiti u analizi kvaliteta djelovanja lijekova. Autobioesej je primijenjen zbog toga jer se uz istovremenu električnu stimulaciju nerava dodaju ispitivane supstance, pa se superponiraju dva efekta, efekt endogenih i egzogenih supstanci.

Izolirani organi kojima se in vitro stimuliraju motorni nervi mogu znatno unaprijediti efikasnost, relevanciju i brzinu farmakološke analize kvaliteta i kvantiteta. Oni mogu biti upotrijebljeni i kao instrument i kao mjesto na kojem će se vidjeti djelovanje lijeka, što može biti od koristi za procjenu djelotvornosti nekog lijeka.

Autobioesej, upotrebom IIO će smanjiit teškoće i nemogućnosti vivisekcije, posebno onda kada je potrebna za ponavljanja i tesitranja, a što se radi da se zadovolje standardi. Osim za standardizaciju IIO koji služe za autobioesej, mogu su upotrijebiti za ispitivanje neurotransmisije i kotransmisije, jednog novog polja istraživanja.

Opisani su IIO koji se uzimaju od kontrolnih životinja, od životinja kod kojih se izazvana model-oboljenja. Isto tako su opisane farmakološke i mehaničke modifikacije, zatim upotreba organa in situ, koji su donekle slični upotrebi in vitro. Sve pomenute modifikacije znatno unapređuju farmakološku analizu u ispitivanju kvaliteta lijekova.

AUTOBIOASSAY IN THE QUALITY CONTROL OF DRUGS

Summary

Autobioassay can be used in analyses of drug effects in two ways. It can be used as an instrument or as a place of drug activity. In the first case it can replace a lacking apparatus and in the second case it can show the effect of drugs that could not otherwise be recorded. By autobioassay on isolated organs an analysis of exogeneously added drugs is meant with a simultaneous stimulation of pertaining motor nerves. By applying autobioassay with isolated tissues vivisection can be avoided, especially the one done by repetition, to satisfy certain standards. The described IIO can be used in analyses of neurotransmission and cotransmission. Autobioassay can be used in the quality control of drug effects.

LITERATURA

Bartfai, T., Iverfeldt, K. and Fisone, G.: *Regulation of the Release of Coexisting Neurotransmitters,* Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol, 28, 1988, 285—310.

Burnstock, G.: *Co-Transmission,* The Fifth Heymans Memorial Lecture s. 138—164, Heymans Fondation, Ghent, Belgium, 1990.

Campbell, G.: *Cotransmission,* Ann. rev. pharmacol. toxicol. 27, 1987, 51—70.

Furness, J. B., Morris, J. L., Gibbins, I. L. and Costa, M.: *Chemical Codings of Neuron and Neurochemical Transmission,* Ann. rev. pharmacol. toxicol. 29, 1989, 289—306.

Hokfelt, T., Fuxe, K. and Pernow, B.: *Coexistence of Neronal Messengers: A New Priciple in Chemical Transmission.* Progress in Brain Research. vol. 68, Elsevier, Amsterdam, 1986.

Holzer, P.: *Moeglichkeiten und Graenzen der Methodikisolierte Organe.* Abfalle fuer die Forschung. Organe aus dem Schlachthof. U Lembeck, F. Alternativen zum Tierversuch, 1988, s. 81—87.

Huković, S.: *Prednosti biološkog metoda istraživanja u farmakologiji,* ANUBiH, Posebna izdanja, 51, 1980, 7—11.

Huković, S.: *Izolirani i inervirani organi kao poseban metod u framakologiji,* ANUBiH, Posebna izdanja, 51, 1980, 11—31.

Huković, S. i Potkonjak, D.: *Kvalitet u istraživanju lijekova,* ANUBiH, Radovi, 1991.

Kupfermann, I.: *Functional Studies of Cotransmission,* Physiol. Rev. 1990.

Lembeck, F.: *Alternativen zum Tierversuch,* Thieme, 1988.

Rand, M. J. and Mitchelson, F.: *The Guts of the Matter: Contribution of Studies on Smooth Muscle to Discoveries in Pharmacology,* Discoveries in Pharmacology, 3, 1986, 19—61.