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

PERFORMANSA IZOLOVANOG HUMANOG URETERA KAO MODEL-SISTEMA ZA ISPITIVANJA NEUROTRANSMISIJE I NJENE MODULACIJE

SEID HUKOVIĆ, SRETEN BOŠKOVIĆ, IRIS RAJMAN, NEDIM HUKOVIĆ i ELVEDINA KAPIĆ
Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta, Sarajevo

UDC 615.017

Apstrakt. Prilikom transplantacije bubrega potrebno je nekad odsjeći komadić humanog uretera zdravog davaoca. Komadić od 1—2 cm se stavi u posudu za izolovane organe i transmuralno električki stimuliše. Registruju se kontrakcije i promjena tonusa, koje se ponavljaju više sati. Pošto se dobiju kontrolne kontracije, injiciraju se farmakološke supstance, potrebne za karakterizaciju preparacije. Acetilholin u većini slučajeva smanjuje tonus i visinu izazvane kontrakcije, dok noradrenalin povećava visinu izazvanih kontrakcija. Fizostigmin smanjuje visinu kontrakcija, a kod nekih preparacija dovodi do potpunog bloka efekta električne stimulacije. Atropin nema uticaja na visinu kontrakcija, dakle preparacija je atropin rezistentna. Morfin i aminofilin relaksiraju izolovani humani ureter i smanjuju visinu izazvanih kontrakcija. Serotonin, histamin i prostin mijenjaju efekat stimulacije. U tumačenju neuromišićne transmisije i njene modifikacije treba uzeti u obzir NANC nerve koji će izazvati relaksaciju. Mehanizam relaksirajućeg djelovanje acetilholina se tumači njegovim vezivanjem na presinaptičke muskarinske receptore, koji smanjuju oslobađanje neurotransmitora. Model-sistem izolovani humani ureter može poslužiti za ispitivanje djelovanja lijekova, i to ne samo onih koji djeluju na spastički ureter nego i drugih lijekova koji djeluju na glatkomišićne strukture genitourinarnog trakta. Isto tako može poslužiti za ispitivanja novih oblika neurotransmisije.

Ključne riječi: izolovani humani ureter, performanse, farmakološka analiza, elektrofiziologija uretera.

UVOD

Kao alternativa dosadašnjim ispitivanjima djelovanja raznih supstanci mogu se koristiti ispitivanja na izoliranim organima humanog porijekla (G r ü n z e l et al., 1988; L e m b e c k, 1988) ukoliko se ne kose sa odredbama Helsinške deklaracije iz 1975. godine. Organi humanog porijekla, ili dijelovi organa, mogu se uzeti za vrijeme operacija kao materijal koji inače hirurg odbacuje, te, umjesto da se baci, taj ma-

Ovaj rad je pomognut sredstvima Saveznog sekretarijata za razvoj, Beograd.

terijal se šalje u laboratorij za istraživanja in vitro. Ukoliko su to glatkomišićni organi, mogu se stimulirati preko vanjskih ili unutrašnjih nerava i tako poslužiti kao autoesej (Rand and Mitchel, 1986). U tom slučaju autoesej omogućava da se stimulirajući oslobađaju endogeni transmitori, a da se dodavanjem egzogenih aktivnih supstanci modifikuje ne samo električki izazvan efekat nego da se istovremeno registruje direktan efekt na glatki mišić. Na taj način se mogu dobiti informacije koje se istovremeno na drugi način ne dobivaju.

Humani ureter je vrlo rijetko zdravo tkivo koje se može dobiti od zdravog davaoca, a koje dobro funkcioniše u uslovima in vitro. Uz to, takva preparacija ima vlastitu endogenu inervaciju i glatki mišić koji dobro reaguje na električnu stimulaciju u izometrijskim uslovima registracije (Huković et al., 1990). Na takvim preparacijama su se mogle dobiti informacije o djelovanju lijekova i drugih supstanci (Hertle and Nawrath, 1985, 1989; Amann et al., 1988; Cole et al., 1988; Vereecken, 1986a, 1986b; Potenzoni et al., 1984; Bertaccini et al., 1983). Na izolovanim ureterima životinja su vršena razna ispitivanja djelovanja analgetika i kortikosteroida (Angelo-Khattar and Thulesius, 1985; 1987), te uticaj lokalnih anestetika (Bordyga and Magura, 1986).

Cilj ovog rada je da se opišu svojstva izolovanog humanog uretera koji će biti tako prepariran da se izazivaju povremene kontracije, i da se na njemu ispitaju efekti endogenih i egzogenih supstanci i njihovih kombinacija. Cilj je da se opišu i registruju fenomeni povećanja kontrakcija, tonus uretera, dakle modulacija normalne transmisije. Zadatak je da se poslije transplantacije bubrega dobiveni komadić uretera stavi u pogodne uslove in vitro i da se izvrši elektrofiziološka i farmakološka evaluacija novog model-sistema, te da se ustanove performance izolovanog humanog uretera.

METODE

Prilikom transplantacije je potrebno ureter davaoca skratiti da se bez previjanja implantira u mokraćni mjehur primaoca. Tom prilikom preostane komadić normalnog zdravog humanog uretera kojeg hirurg odstranjuje. Ovako odstranjen dio uretera se može poslati u laboratorij za ispitivanja kao izolovani organ humanog porijekla, a da se ne prekrši nikakva deontološka norma. Takav komadić uretera se dobiva iz Instituta za transplantaciju u Sarajevu, na čemu smo zahvalni. Duljina uretera koja se dobije je različita, a u posudu za izolirane organe se stavi komadić od 2—3 cm. Obično ureter dođe u laboratorij oko 14 sati, stavi se u Tyrodeovu otopinu i oksigenizira na sobnoj temperaturi do narednog početka radnog dana. Ukoliko organ dođe ranije, onda se montira u posudu za izolirane organe u Tyrodeovu otopinu na temp. od 32°C, oksigenizira i njima se počinje raditi sutradan na početku radnog dana. Organ se optereti silom od 2 g i bubrežnim krajem veže na izometrijski transducer. U međuvremenu se ispire posuda nekoliko puta. Elektroda je od platine i jedna se uvlači u lumen, a druga je u posudi

izvan organa. Parametri električnog stimulansa su 20 mA, 20 Hz, 1 m/sec., a ponavljaju se svakog minuta u trajanju od jedne sekunde.

Upotrijebljene supstance se injiciraju u volumenu od 0,2 ml Tyrodeove otopine. Supstance su bile: acetilholin hlorid, fizostigmin hlorid, noradrenalin hlorid, histamin hlorid, hydroksitriptamin kreatinin sulafat, prostin, morfin hlorid i aminofilin. Prvo se izazove desetak normalnih kontrakcija, iza čega se injicira ispitivana supstanca. Supstanca se ostavi u posudi za izolovane organe 6—10 minuta, a onda se posuda ispire i čeka povratak na kontrolne vrijednosti tonusa i kontrakcija. Analizira se promjena visine bazalnih linija i izazvanih kontrakcija, uspoređujući rezultate prije i poslije davanja ispitivanih supstanci. Mjere se promjene tonusa i visine izazvanih kontrakcija, te se na osnovu promjena izvode zaključci o performancama preparacije i djelovanja ispitivanih supstanci.

REZULTATI

Uticaj električne stimulacije

Električna stimulacija endogenih nerava humanog uretera izaziva kontrakcije izolovanog uretera. Konstantni električni stimulansi u konstantnim vremenskim intervalima (svake minute), će izazvati ravnomjerne kontrakcije, koje se mogu registrovati izometrijski ili izotonički. Ravnomjernije su izazvane kontrakcije registrovane izometrijski. Opadanje visine uzastopno izazvanih kontrakcija je manje od 2%. Nakon određenog vremena, nakon 100 do 150 uzastopnih kontrakcija, ovisno od preparacije, počinju da ispadaju pojedine kontrakcije, ili se počinju pojavljivati prevremene kontrakcije. Ovo je vjerovatno posljedica polarizacije elektroda. Promjena parametara električne stimulacije mijenja visinu izazvane kontrakcije, mada u uskim granicama, tako da izolovani ureter reagira približno po principu »sve ili ništa«. Ukoliko se skraćuje interval između dvije stimulacije, onda visina izazvanih kontrakcija mnogo brže opada nego kada se upotrebljava optimalna stimulacija: 20 Hz, 20 mA, 1 m/sek., svake minute u trajanju od jedne sekunde.

Uticaj holinergičkih supstanci, ostalih agonista i antagonista

Acetilholin u koncentraciji 10^{-5} mola/1 će smanjivati efekat stimulacije nerava, tj. smanjuje visinu izazvanih kontrakcija. Smanjenje ovisi od koncentracije acetilholina. U 1/10 eksperimenta acetilholin će povećati efekt stimulacije do određene koncentracije, iza čega će ponovo doći do smanjenja. Acetilholin neće nikada potpuno blokirati efekt stimulacije.

Fizostigmin, poznati parasimpatomimetik i inhibitor holinesteraze će, ovisno od koncentracije, smanjivati visinu izazvanih kontrakcija, pa će u pojedinim slučajevima dovesti do potpunog bloka efekta stimulacije.

Atropin u dozi od 10^{-5} do 10^{-4} mola/1 nema značajan uticaj na visinu izazvanih kontrakcija. Radi se o rezistenciji prema atropinu. Injiciranje većih koncentracija acetilholina kada je organ atropiniziran također bitno ne mijenja efekt stimulacije unutrašnjih motornih nerava.

Uticaj adrenergika, serotonina, histamina i prostaglandina

Noradrenalin u koncentraciji između 10^{-6} i 10^{-5} mola/1 povećava visinu izazvanih kontrakcija humanog izoliranog uretera. Nakon ispiranja efekt stimulacija se brzo vraća na početne vrijednosti. Odnos između doze i reakcije ustanovljen je tek u malim granicama. Pod uticajem noradrenalina je uglavnom povećana visina izometrijskih kontrakcija, dok tonus obično nije promijenjen.

Serotonin u koncentraciji 10^{-5} mola/1 povećava visinu izazvanih kontrakcija i tonus. Uticaj serotonina se može dobro registrovati i postoji odnos između doze i reakcije.

Histamin u koncentracijama od 10^{-6} do 10^{-5} mola/1 smanjuje visinu izazvani hkontrakcija i tonus izolovanog humanog uretera. Prostin (PGE_2) u koncentraciji 10^{-6} mola/1 sasvim lagano smanjuje visinu izazvanih kontrakcija.

Uticaj aminofilina i morfija

Aminofilin u koncentraciji 10^{-5} mola/1 znatno smanjuje visinu izazvanih kontrakcija i tonus izolovanog humanog uretera. Nakon ispiranja visina, kontrakcija se sporo vraća na kontrolne vrijednosti. Morfin hidrohlorid u koncentraciji 10^{-6} mola/1 također smanjuje visinu izazvanih kontrakcija.

DISKUSIJA

Dio izolovanog humanog uretera se može dobiti od zdravog davaoca tokom transplatacije bubrega. Obično se dobije komadić uretera veličine 3—5 cm ako je potrebno skratiti ureter prilikom ušivanja u mokraćni mjehur primaoca. Ureter se skraćuje ako je previše dug i prijeti opasnost od savijanja i posljedičnog začepljenja. Taj dio uretera se inače odbacuje nakon operacije. Zbog toga se upotreba izolovanog humanog uretera ne može smatrati bilo kakvim deontološko-etičkim prekršajem.

Reakcije izolovanog humanog uretera na električne stimulacije su očekivane. Radi se o kontrakciji glatkomišićnog organa pod uticajem stimulacije endogenih motornih nerava. Kontrakcije su snažne i mogu se ponavljati 100—200 puta, nakon čega će nastupiti zamor organa. Reakcije su po tipu »sve ili ništa«, što je slično reakciji pieloureteralne i srčane muskulature (Vereecken and Das, 1986). Ispiranje organa ili mali mehanički pomaci mogu izazvati kontrakciju, što znači da se lako mijenja polaritet na elektrodi, unutar organa ili na njegovoj površini.

Uticaj najvažnijih neurotransmitora u perifernom nervnom sistermu: acetilholina i naradrenalina je bio poseban i neočekivan. Očekivalo se da će acetilholin povećavati visinu izazvanih kontrakcija i tonus organa, ali se dogodilo suprotno. Acetilholin je u zavisnosti od koncentracije smanjivao efekt stimulacije nerava i smanjivao visinu izazvanih kontrakcija na polovinu vrijednosti kontrolnih kontrakcija. Acetilholin u prisustvu atropina nije bitno mijenjao visinu kontrakcija niti tonus organa. U humanom ureteru je nađena bogata holinergička, a siromašna andrenergička inervacija. Nađeni su isto tako peptidergički nervi sa neurtransmitorem VIP-om, za kojeg se pretpostavlja da je modulator (K u l e n d o r f f et al., 1987). Drugi endogeni aktivni peptidi (SP, CGRP, neurokinin A), koji su utvrđeni u ureteru, vjerovatno igraju ulogu u senzornim nervima nakon ureteralne opstrukcije (H u a et al., 1987).

Fizostigmin i atropin su imali obrnute efekte od onih koji su očekivani. Fizostigmin u nekim slučajevima dovodi do potpune blokade efekata stimulacije pripadajućeg nerva. U drugim slučajevima smanjuje efekt stimulacije, ali ga ne blokira potpuno. Atropin kod većine preparata nema efekta i samo kod nekih preparata lagano povećava tonus uz jedva vidljivo smanjivanje visine izazvanih kontrakcija; dakle radi se o atropin-rezistentnoj preparaciji slične mokraćnom mjehuru (T o m i a k et al., 1985, B r a d i n g and M o s t w i n, 1989).

Noradrenalin ne izaziva relaksaciju glatke muskulature, kako se očekivalo, nego na humanom izolovanom ureteru povećava efekt stimulacije. Ovaj rezultat je u saglasnosti sa rezultatima H e r t l e i N e w r a t h a (1985), koji pretpostavljaju da u humanom ureteru postoji neki treći tip adrenergičkih receptora. Slično noradrenalinu su djelovali histamin i serotonin, ali je ovaj posljednji djelovao nešto jače u istim ekvimolekularnim koncentracijama. Histamin predominantno djeluje preko H_1 receptora (B e r t a c c i n i et al., 1983). Aminofilin i morfijum smanjuju efekt stimulacije intrinsičkih nerava humanog uretera. PGE_2 u ovom eksperimentu blago smanjuje fazne kontrakcije inerviranog humanog uretera, mada se C o l e i S a s (1988) našli da PGE_2 i $PGF_2\alpha$ dramatično povećavaju tonične i fazičke kontrakcije. Razlika je vjerovatno u dozi.

Izolovani humani ureter se do sada nije mnogo upotrebljavao kao model-sistem za farmakološka ispitivanja na način kao što je opisan u ovom radu. Relativno rijetko su se na opisani način koristili dijelovi uretera dobijeni od eksperimentalnih životinja. Neki eksperimenti na ureteru životinja u uslovima in vitro su se sastojali od analize djelovanja lijekova na prstenove uretera. Praćena je relaksacija i spontana aktivnost. Na pomenutim prstenastim dijelovima uretera je ustanovljeno da dolazi do relaksacije i spontane aktivnosti ako se dodaju NSAID (nesteroidni antiinflamatorni lijekovi) ili ako se dodaju kortikosteroidi (A n g e l l o - K a t h a r et al., 1985, 1986). Na izolovanim ureterima manjih životinja su vršena elektrofiziološka istraživanja i ispitivanja djelovanja lokalnih anestetika (B o r d y g a and M a g u r a, 1986).

Potenzoni i sar. (1984) su na izolovanom inerviranom humanom ureteru ispitivali nove relaksatore glatke muskulature i pokazali da je novi muskulotropni spazmolitik Rociverin spazmolitik ureteralne glatke muskulature.

Za tumačenje djelovanja acetilholina u smislu inhibicije moguća su tri objašnjenja. Prvo, moguće je da se radi o mehaničkom prividno relaksantnom djelovanju, a u stvari se kontrahuju spiralne niti pa se dobije krajnji efekt kao da se radi o relaksaciji, a u pitanju je kontrakcija spiralnih niti. Ova mogućnost nije vjerovatna jer nema uvrtanja organa. Druga je mogućnost da acetilholin i noradrenalin nisu transmitori na ovom organu, nego da se radi o NANC nervima. Vjerovatno na ovom organu postoje receptori za acetilholin i noradrenalin, ali ima i drugih neurotransmitora i neuromodulatora, te je rezultanta djelovanja onakva kakva je prikazana u ovom radu. To znači da acetilholin smanjuje, a noradrenalin povećava efekt stimulacije. Treće i najvjerovatnije objašnjenje je da je ekstrinzički acetilholin, budući da se daje u nešto većim dozama da bi se registrovao njegov efekt, djelovao presinaptički i tako smanjio oslobađanje endogenog acetilholina. Prema Viziu i Somogyu (1989), neočekivano djelovanje acetilholina je posljedica negativne muskarinske »feed-back« modulacije. Danas se mehanizam djelovanja tumači i djelovanjem na kalcijumove kanale i fluks kalcijevih jona. Kalcijev agonist Bay K 8644 povećava amplitudu ritmičke kontrakcije humanog uretera (Hertle and Nawrath, 1989). Blokatori kalcijevih kanala smanjuju spontani aktivitet izolovanog humanog uretera (Anderson and Forman, 1986).

Izolovani humani ureter je pogodan model-sistem za ispitivanje djelovanja lijekova i to ne samo onih koji će djelovati na ureter nego i na drugu glatku muskulaturu genitourinarnog trakta. Humani ureter ima sigurno drugačiju intervaciju, druge transmitore nego glatka muskulatura koja je do sada ispitivana. Zato će ispitivanja humanog uretera dati podatke o funkciji neurotransmisije.

THE PERFORMANCES OF THE ELECTRICALLY STIMULATED ISOLATED HUMAN URETER AS MODEL-SYSTEM FOR THE INVESTIGATION OF NEUROMUSCULAR TRANSMISSION

Summary

The isolated human ureter obtaine of a healthy donor after the kidney transplantation were used as a model-system. It was used for the evaluation of the effect of various substances on the neuromuscular transmission. The piece of the isolated human ureter was long 2—3 cm and was set up in an isolated organ bath in Tyrode solution. In the ureter platinium electrode was introduced and another electrode was in the organ bath. The ureter was stimulated transmurally with the constant stimula in the constant one min. intervals.

Acetylcholine usually decresed the hight of the induced contractions. Physostigmine decreased contraction and in some ureter caused block of the effect of the electrical stimulations. Atropine had no effect on the height of the contractions, so the preparation could be considered as atropine resistant organ. Noradrenaline, histamine and serotonine increased the contractions. Aminophyline and morphine decreased the contractions.

It is possible that there are unknown neurotransmitters in human ureter that induced contractions and relaxation. Isolated human ureter electrically stimulated in vitro could be used as a model-system for the pharmacological and toxicological investigations.

LITERATURA

Amman, R., Skofitsch, G., and Lembeck, F. (1988): *Naunyn Schmiedebergs*, Archiv Pharmacol, 338, 407—410.

Anderson, K. E. and Forman, A. (1986): *Effects of calcium channel blockers on urinary tract smooth muscle.* Acta Pharmacol. Toxicol. 58, Suppl. 2, p. 193—200.

Angelo-Khattar, M., Joseph, L., Nilsson, T. and Thuselius, O. (1985): *The effect of indometacin and diclofenac sodium on ureteral contractions in vivo and in vitro.* Br. J. Pharmacol. Proc. Suppl. **85,** 325 P.

Angelo-Khattar, M. and Thukesius, O. (1987): *Effect of corticosteroids, on motility of isolated ovine uretral ring.* Br. J. Pharmacol. Proc, Suppl. **91,** 320 P.

Angelo-Khattar, M., Thulesius, O. and Cherian, T. (1989): *The effect of glucocorticosteroids on in vitro motility of the ureter of the ship.* Br. J. Pharmacol. **96,** 527—530.

Bertaccini, G., Zappia, L., Bezzi, E. and Potenzoni, D. (1983): *Histamine receptors, in the human ureter.* Pharm. Res. Commun. 15, 156—166.

Brading, A. F. and Martin, W. (1989): *Electrical and mechanical responses of guina-pig bladder muscle to nerve stimulation.* Br. J. Pharmacol., **98,** 1083—1091.

Burdidyga, T. V. and Magura, I. S. (1986): *The effects of local anaesthetics on the electrical and mechanical activity of guinepig ureter.* Br. J. Pharmacol., **88,** 523—530.

Cole, R. S., Fry, C. H. and Shuttelworth, K. E. (1988): *The actions of prostaglandins on isolated ureteric smooth muscle.* Br. J. Urol. 61, 19—26.

Günzel, P. (1988): *Risk of wrong conclusions due to sample selections.* Symposia: *Alternatives to animal experiments in risk assesment.* ed. and chairmen Günzel, P. 26—27 März, 1987, Berlin.

Hertle, L. and Nawrath, H. (1985): *In vitro studies on human primary obstructed magaureter.* J. Urol. **133,** P 884—887.

Hertle, L. and Nawrath, H. (1989): *Stimulation of voltage-dependent contractions by calcium channel activator Bay K 8644 in the human upper urinary tract in vitro.* J. Urol., **141,** 1014—1018.

Hua, X. Y., Theodorsson, E., Lundberg, J. M., Kinn, A. C. et al. (1987): *Co-localisation of tachykinins and calcitonin gene-related peptide in capsaicin-sensitive afferents in realtion to motility effects on the human ureter in vitro.* Neuroscience, **23,** 693—703.

Huković, S., Bošković, S., Mulabegović, N. and Potkonjak, D. (1990): *The isolated Human urter as a model-system in pharmacology.* Acta Physiol. Pharmacol. Iug. U štampi.

Kullendorf, C. M., Elmer, M. and Alm, P. (1987): *Urinary bladder inervatin in children.,* J. Pediatr. Surg., **22,** 240—242.

Lembeck, F. (1988): *Alternativen zum Tierversuch.* Georg. Thieme Stuttgart.

Potenzoni, D., Zappia, L., Sacchini, P. and Bezzi, E. (1984): *Effect of rociverine on the human ureter: in vivo and in vitro experimental study.* Pharmacol. Res. Commun. **16,** 765—774.

Rand, M. L. and Mitchelson, F. (1986): *The guts of the matter: Contribution of studies on smooth muscle to discoveries in pharmacology.* Discoveries in Pharmacolog. **3,** 19—61.

Tomiak, R. H., Barlow, R. B. and Smith, P. J. (1985): *Are the valid reason for using anti-muscarinic drugs in the menagement of renal colic.* Br. J. Urol., **57,** 498—499.

Vereecken, R. L. and Das, J. (1986): *Contractile behaviour of the human pyelo-uretral musculature. I. Contraction frequency force relationship.* Urol. Research., **14,** 25—30.

Vereecken, R. L. and Das, J. (1986): *Contractile behaviour of the human pyelo-ureteral muschulature. II. Repetitive electrical stimulavtion effect.* Urol--Res. 14, 31—35.

Vizi, E. S. and Somogy, G. T. (1989): *Prejunctional modulation of acetylcholine release from the sceletal neuromuscular junction link between positive (nicotinic) and negative (muscarinic) feeback modulation.* Br. J. Pharmacol. **97,** 65—70.

ANU BiH АНУ БиХ