

Zakład Farmakologii Doświadczalnej. Wydział Lekarski. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr med. Zdzisław Kleinrok

Zdzisław KLEINROK, Grażyna SZURSKA, Maria FIJAŁKOWSKA

Wpływ dwuetylodwutiokarbaminianu sodu na wyosobnione serce szczura oraz na zawartość w nim noradrenaliny i dopaminy

Влияние диэтилдитиокарбамата натрия на изолированное сердце крысы и на уровень в нем норадrenalина и допамина

Influence of Sodium Diethylthiocarbamate on the Action of Isolated Perfused Rat Heart and on the Level of Noradrenaline and Dopamine in it

Końcowym etapem biosyntezy noradrenaliny jest β -hydroksylacja dopaminy, katalizowana przez swoisty enzym β -hydroksylazę dopaminową (11). Czynność tego enzymu może ulec zahamowaniu pod wpływem szeregu związków, wśród których należy wymienić dwusulfiram, a zwłaszcza jego metabolit w ustroju, tj. dwuetylodwutiokarbaminian sodu (DDC). W wyniku tego w tkankach stwierdza się obniżenie poziomu noradrenaliny przy równoczesnym wzroście poziomu dopaminy, co zostało potwierdzone licznymi badaniami (4, 5, 7, 8, 9, 12, 15, 16). Niezależnie od tego w ostatnich latach pochodne kwasu tiokarbaminowego wzbudziły duże zainteresowanie, ze względu na ich owadobójcze działanie. Te dane z piśmiennictwa skłoniły nas do zbadania wpływu DDC na czynność wyosobnionego serca szczura oraz na poziom w nim obu wymienionych amin katecholowych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Doświadczenia przeprowadzono na 79 białych szczurach, szczepu Wistar, obojga płci, o ciężarze ciała wahającym się w granicach 160–220 g. Badania wpływu DDC na czynności wyosobnionego serca szczura przeprowadzono na 30 szczurach, posługując się zmodyfikowaną przez Wiegiersha usena (21) metodą Langendorffa (10). W lekkiej narkozie eterowej otwierano klatkę piersiową szczurów wzdłuż łuków żebrowych i odsłaniano serce oraz łuk aorty wraz z naczyniami od niego odchodzącymi. Następnie na wysokości ramienia zstępującego łuku aorty, przecinano go łącznie z odchodzącymi naczyniami i wyjmowano serce do małego naczynka wypełnionego płynem odżywczym Locka. W ten sposób wypreparowane serce nakładano na szklaną kaniulę i umieszczano w aparacie Langendorffa. Na koniuszek serca nakładano małą serfinkę, którą poprzez układ bloczków łączono nylonową nitką z pisakiem Starlinga, rejestrującym na okopconym walcu kimografu liczbę i amplitudę skurczów serca. Wielkość przepływu przez naczynia wieńcowe oznaczano za pomocą fotokomórkowego urządzenia, połączonego z elektromagnetycznym pisakiem, rejestru-

jącym liczbę wypływających kropli. Rozpuszczony w płynie odżywczym DDC stosowano we wzrastających dawkach (1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg, 100 µg i 1 mg) poprzez cienki poliwinylowy przewód, którego ujście znajdowało się we wnętrzu kaniuli tuż nad ujściem naczyń wieńcowych. Nasycony tlenem płyn odżywczy, o temperaturze 38°C stosowano pod stałym ciśnieniem 40 mm Hg. Obliczano częstość skurczów serca, ich amplitudę oraz wielkość przepływu przez naczynia wieńcowe w ciągu 60 sek. przed, oraz po zastosowaniu kolejnych dawek DDC.

Badania wpływu na poziom noradrenaliny i dopaminy w sercu szczurów przeprowadzono oznaczając poziom obu amin po 30 min. perfuzji płynem odżywczym zawierającym 0,05% DDC (18 oznaczeń), a uzyskane wyniki porównywano z wynikami uzyskanymi w sercach perfundowanych w ciągu tego samego okresu czasu wyłącznie płynem odżywczym (13 oznaczeń). Poza tym u 15 zwierząt poziom wymienionych amin w sercu oznaczano bezpośrednio po zabiciu. Oznaczenia wykonano posługując się spektrofluorymetryczną metodą Changa (6). Uzyskane wyniki zestawiono w postaci średnich w tabelach i opracowano statystycznie posługując się t testem Studenta, w modyfikacji Rydygiera (19, 20).

WYNIKI BADAŃ

Wpływ wzrastających dawek DDC na czynności wyosobnionego serca szczura przedstawia tab. 1, na której zestawiono średnie wartości uzyskane z 30 oznaczeń. Jak wynika z tabeli wzrastające dawki DDC, począwszy od 1 ng do 1 mg, zasadniczo nie wpływają na częstość skurczów, ich amplitudę oraz wielkość przepływu przez naczynia wieńcowe wyosobnionego serca szczura. Nieznaczące różnice nie-

Tab. 1. Wpływ wzrastających dawek DDC na czynności wyosobnionego serca szczura
The influence of increased doses of DDC on the isolated perfused rat heart

Liczba oznaczeń	Stosowano DDC w dawce wyrażonej w g	Liczba skurczów serca na minutę	Wielkość amplitudy skurczów	Wielkość przepływu przez naczynia wieńcowe
		w % wartości wyjściowych		
		X ± F	X ± F	X ± F
30	1×10^{-9}	95 ± 4,0	95 ± 21,1	100 ± 15,0
30	1×10^{-8}	102 ± 4,8	82 ± 9,8	100 ± 17,2
30	1×10^{-7}	97 ± 4,2	87 ± 20,0	96 ± 15,0
30	1×10^{-6}	97 ± 4,1	99 ± 13,0	77 ± 11,0
30	1×10^{-5}	98 ± 4,2	104 ± 15,0	97 ± 11,0
30	1×10^{-4}	95 ± 4,6	100 ± 12,0	84 ± 11,1
30	1×10^{-3}	99 ± 4,0	131 ± 13,0	96 ± 14,3

proporcjonalne do stosowanych dawek są statystycznie nieistotne. Stosowanie wyższych od 1 mg dawek DDC jest praktycznie niemożliwe ze względu na wyraźny zasadowy odczyn takich roztworów. Wymagałoby to zastosowania dużych objętości roztworów mniej stężonych, co w użytej metodzie jest niemożliwe. Przeprowadzone badania ze stosowaniem roztworów o analogicznym do stężonych roztworów

DDC pH wykazały, że odznaczają się one własnym działaniem, co praktycznie uniemożliwia interpretację wyników.

Wyniki oznaczeń poziomu noradrenaliny i dopaminy w sercu zestawiono w tab.2. Jak wynika z tabeli, półgodzinna perfuzja płynem odżywczym powoduje statystycznie wysoce istotne obniżenie poziomu obu badanych amin, z tym że poziom dopaminy spada do wartości nieoznaczalnych. Dodatek do płynu perfuzyjnego DDC w stężeniu 0,05% powoduje znacznie mniejsze obniżanie poziomu noradrenaliny,

Tab. 2. Wpływ 30 minutowej perfuzji 0,05% DDC na poziom noradrenaliny i dopaminy w wyosobnionym sercu szczura

Influence of 30 min. perfusion with 0.05% DDC on the level of noradrenaline and dopamine in the isolated rat heart

Grupa	Stosowano	Liczba oznaczeń	Poziom w g/g świeżej tkanki	
			Noradrenalina $X \pm F$	Dopamina $X \pm F$
1	bez perfuzji	15	$0,65 \pm 0,054$	$0,10 \pm 0,027$
2	perfuzja płynem odżywczym	13	$0,14 \pm 0,040$ $p^1 < 0,001$	wartości nieoznaczalne
3	perfuzja płynem odżywczym z dodatkiem 0,05% DDC	18	$0,35 \pm 0,042$ $p^1 < 0,001$ $p^2 < 0,05$	$0,17 \pm 0,031$

p^1 obliczono w stosunku do grupy 1,

p^2 obliczono w stosunku do grupy 2

które jednak w porównaniu z grupą kontrolną, tj. niepoddaną perfuzji jest wysoce statystycznie istotne. Również statystycznie istotną różnicę poziomu noradrenaliny stwierdzono porównując wyniki uzyskane w obu grupach serc perfundowanych, z tym, że — jak już zaznaczono — dodatek do płynu perfuzyjnego DDC powoduje znacznie mniejsze ubytki tej aminy w sercu. Natomiast poziom dopaminy w sercach perfundowanych płynem odżywczym z dodatkiem DDC jest wyraźnie podwyższony, zarówno w stosunku do wartości uzyskanych w sercach perfundowanych 30 min. samym płynem odżywczym (różnice statystycznie istotne), jak i w stosunku do wyników grupy kontrolnej (różnice na granicy statystycznej istotności).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Działanie różnych leków na biologiczne czynności narządów czy komórek odbywać się może na drodze pośredniej lub bezpośredniej DDC, zgodnie z dotychczasowymi danymi, wywiera przede wszystkim działanie pośrednie, bowiem dopiero po zablokowaniu β — hydroksylazy dopaminowej uwidacznia się wpływ

podwyższonego poziomu dopaminy, względnie obniżonego poziomu noradrenaliny. Przy podaniu systemowym DDC, jego działanie uwidacznia się już po kilkunastu minutach (12). Natomiast jednorazowe zastosowanie DDC na wyosobnione serce powoduje, że jego kontakt z izolowanym narządem jest bardzo krótki i w tym czasie nie może ujawnić się jego działanie. Z tego względu w naszej pracy nie stwierdzono praktycznie żadnego farmakologicznego działania DDC na wyosobnione serce mimo stosowania go w dawkach znacznie wyższych niż w badaniach na zwierzętach *in toto*. W badaniach na narządach izolowanych uzyskuje się pewne uproszczenia modelu doświadczalnego pozwalające na określenie wpływu badanego leku na czynności pojedynczego narządu, z drugiej jednakże strony należy pamiętać, że tego typu doświadczenia wprowadzają sztuczne нефizjologiczne warunki, chociażby ze względu na użycie płynu odżywczego, nie zawierającego tych wszystkich biologicznie czynnych składników, jakie występują w krążącej krwi. Wśród tych składników krwi należy między innymi wymienić aminy katecholowe, które są z niej wychwytywane do magazynów tkankowych, a stąd wydalone w miarę potrzeby, pod wpływem bodźców chemicznych lub impulsów nerwowych płynących do zakończeń adrenergicznych. Tego naturalnego źródła noradrenaliny nie ma w przypadku zastosowania metody Langendorffa. Stwierdzone w naszej pracy obniżenie poziomu endogennych amin katecholowych można również tłumaczyć nie tylko brakiem dowozu noradrenaliny do magazynów tkankowych, ale jej szybszym rozpadem, jest ona bowiem związkiem bardzo nietrwałym i w konkretnych warunkach doświadczenia może łatwo ulegać rozpadowi. Potwierdzeniem tego rozumowania mogą być badania Burgena i Iversena (3), którzy stwierdzili, że 10 min. perfuzja płynem odżywczym z dodatkiem 5 mg/ml noradrenaliny powoduje 4—5 krotny wzrost poziomu noradrenaliny i adrenaliny w sercu. Natomiast dalsza perfuzja już bez dodatku noradrenaliny powoduje bardzo szybkie wypłukanie amin katecholowych i po 20 min. poziom ich osiąga wartości zbliżone do wyjściowych. Kopin i wsp. (13, 14) stosując znakowaną noradrenalinę stwierdzili, że już po kilkunastu minutach dochodzi do wypłukania tej aminy z wyosobnionego serca. Temu obniżeniu poziomu noradrenaliny towarzyszy zmniejszona aktywność adenylocyklazy i innych enzymów, co zostało potwierdzone w licznych badaniach (1, 2, 20), a co z kolei może również wywierać wpływ na biosyntezę amin katecholowych. Dodatek do płynu perfuzyjnego 0,05% DDC w znacznym stopniu zapobiega tej utracie noradrenaliny, a w przypadku dopaminy powoduje nawet wzrost jej poziomu. Wynika z tego, że długotrwałe stosowanie DDC powoduje zablokowanie β -hydroksylazy dopaminowej, czego dowodem jest wzrost poziomu dopaminy, a z drugiej strony hamuje uwalnianie obu amin z magazynów tkankowych. Przyczyną tego zmniejszonego pod wpływem DDC uwolnienia amin katecholowych może być zahamowanie ich rozpadu, poprzez blokowanie oksydazy monoaminowej, bowiem — jak wykazały badania Edingtona (9) — DDC wywiera działanie blokujące MAO. Nie jest wykluczone również, że pod wpływem DDC dochodzi do zmniejszenia aktywności innych enzymów biorących udział w aktywnym transporcie amin kate-

cholowych, względnie w ogóle w procesach przemiany materii, co znalazło potwierdzenie w badaniach innych pochodnych kwasu tiokarbaminowego (17, 18). Może wreszcie DDC wpływać na szybsze niż w grupach kontrolnych wchłanianie zwrotne amin katecholowych, nie pozwalające na ich wypłukanie przez płyn perfuzyjny, czego wynikiem jest ich wyższy poziom w badanym narządzie. Rozstrzygnięcie tego zagadnienia jest przedmiotem dalszych badań.

Wnioski

1. Dwuetylodwutiokarbaminian sodu stosowany we wzrastających dawkach od 1 ng do 1 mg nie wpływa na częstość i amplitudę skurczów oraz przepływ przez naczynia wieńcowe wyosobnionego serca szczura.

2. Półgodzinna perfuzja wyosobnionego serca szczura płynem odżywczym powoduje 4—5 krotne obniżenie poziomu noradrenaliny i dopaminy w tym narządzie.

3. Półgodzinna perfuzja wyosobnionego serca szczura płynem odżywczym z dodatkiem 0,05% dwuetylodwutiokarbaminianu sodu powoduje zmniejszenie ubytku noradrenaliny oraz nieznaczny wzrost poziomu dopaminy.

PIŚMIENNICTWO

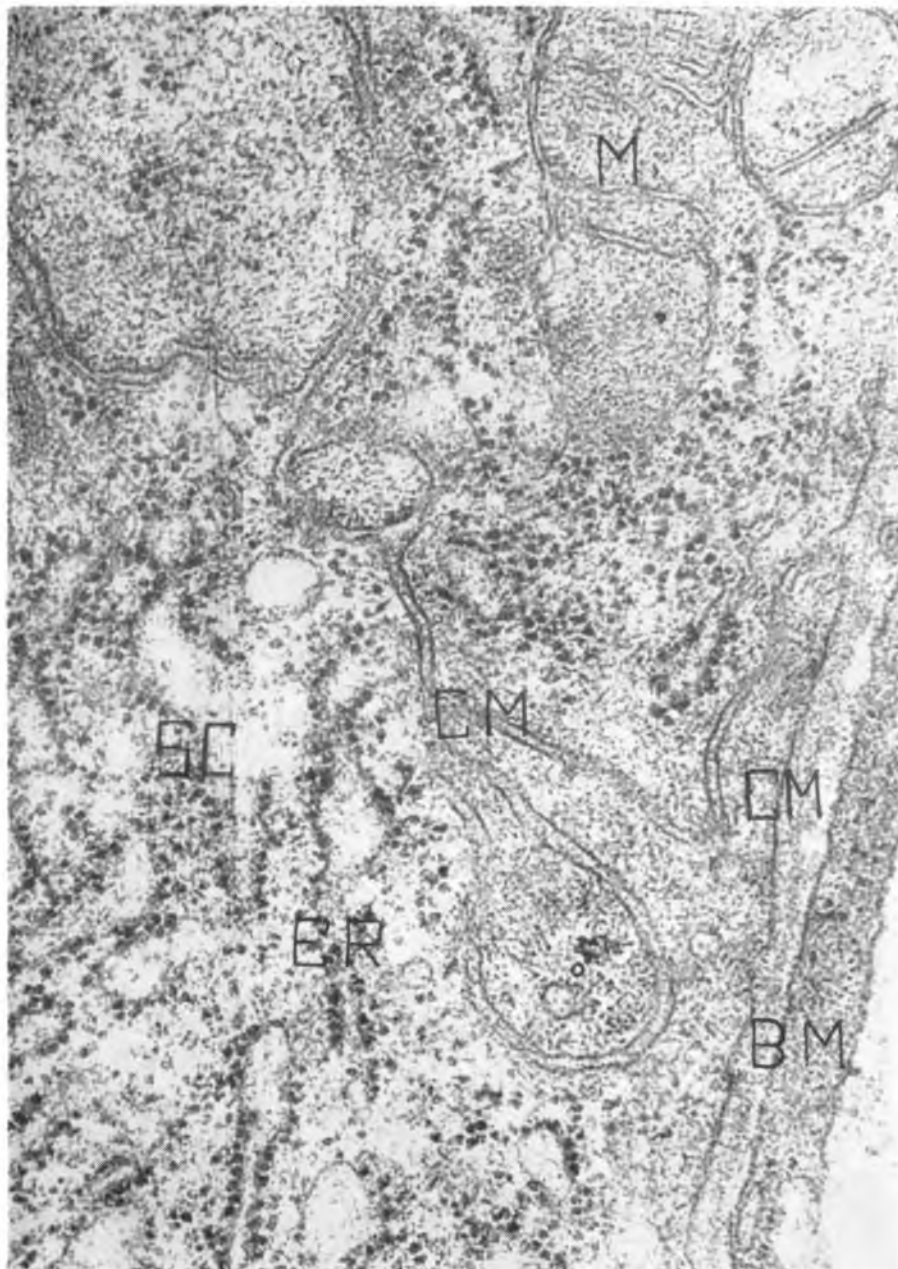
1. Ali H. J., Ellis S., Antonio A., Hangaarg N. : *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **145**, 142—150, 1964.
2. Blukoo-Alloey J. A., Vincent N. H., Ellis S. : *J. Pharmacol. exp. Ther.* **170**, 27—36, 1969.
3. Burgen A. S. V., Iversen L. L. : *Brit. J. Pharmacol.* **25**, 34—49, 1965.
4. Carlsson A., Fuxe K., Hökfelt T. : *J. Pharm. Pharmacol.* **19**, 481—483, 1966.
5. Carlsson A., Linqvist M., Fuxe K., Hökfelt T. : *J. Pharm. Pharmacol.* **18**, 60—62, 1966.
6. Chang C. C. : *Int. J. Neuropharmacol.* **3**, 643—649, 1964.
7. Collins G. G. S., West G. B. : *J. Pharm. Pharmacol.*, **17**, 526—527, 1965.
8. Collins G. G. S., West G. B. : *Brit. J. Pharmacol.* **32**, 402—409, 1968.
9. Edington N. : *J. Pharm. Pharmacol.* **20**, 577—578, 1968.
10. Jeske J. : *Farmakologiczne metody badania leków*, PZWL, Warszawa 1955.
11. Kaufman S., Friedman S. : *Pharmac. Rev.* **17**, 71—73, 1965.
12. Kleinrok Z., Żebrowska I., Wielosz M. : *Int. J. Neuropharmac.* **9**, 451—456, 1970.
13. Kopin J. J., Herting G., Gordon E. K. : *J. Biol. Chem.* **236**, 2109—2110, 1961.
14. Kopin J. J., Herting G., Gordon E. K. : *J. Pharmacol. exp. Ther.* **138**, 34—40, 1962.
15. Lippman W., Lloyd K. : *Bioch. Pharmacol.* **18**, 2507—2516, 1969.
16. Littleton J.M. : *J. Pharm. Pharmacol.* **19**, 414—415, 1967.
17. Proklina-Kaminskaja T. Ł. : *Farmakologia i Toksikologia*, **4**, 144—146, 1968.
18. Proklina-Kaminskaja T. Ł. : *Farmakologia i Toksikologia*, **4**, 153—155, 1968.
19. Rydygier J. : *Pol. Tyg. Lek.* **25**, 739—747, 1947.
20. Rydygier J. : *Pol. Tyg. Lek.* **25**, 775—781, 1947.
21. Wieggershausen B. : *Acta Biol. Med. Germ.* **9**, 517—520, 1962.

РЕЗЮМЕ

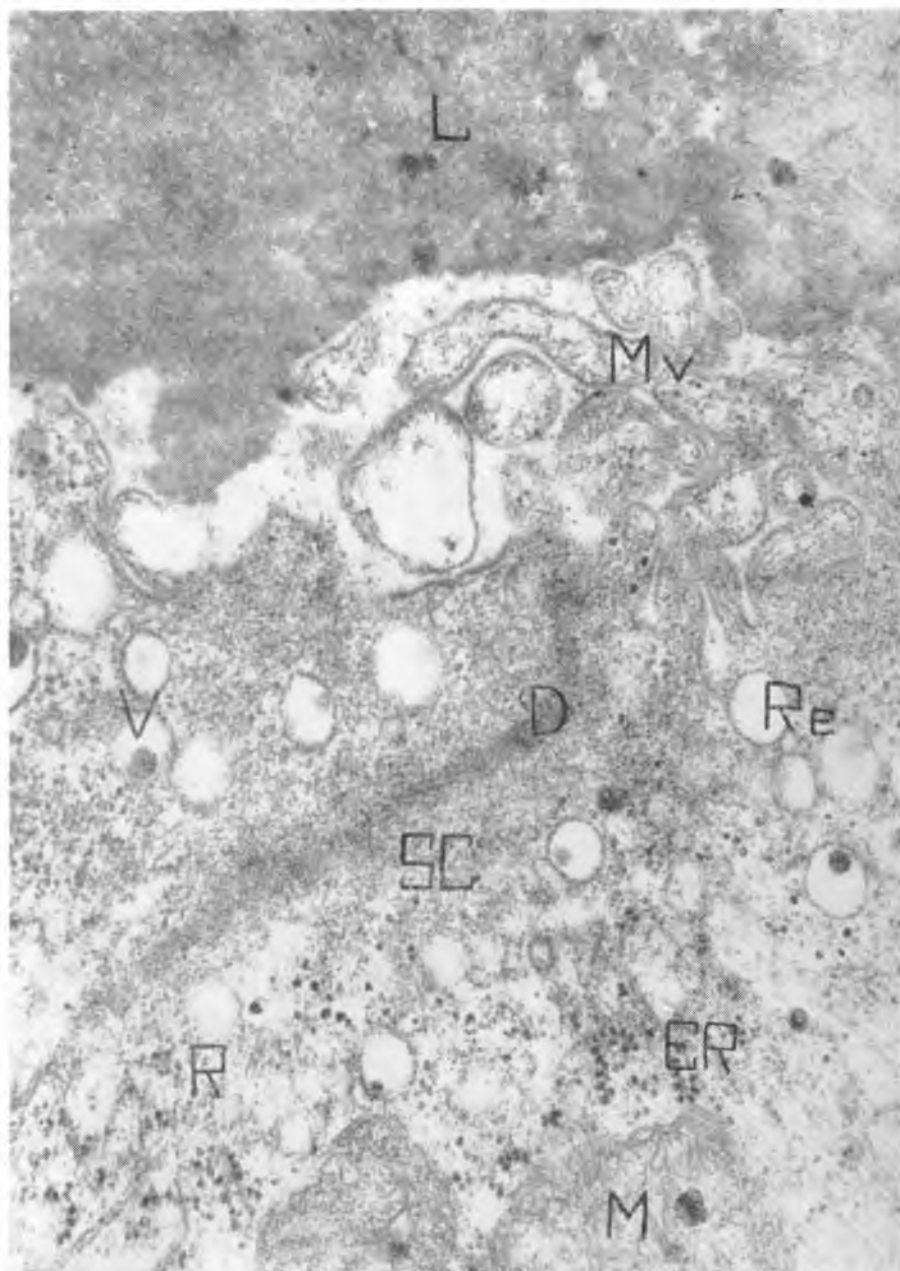
Исследовали влияние разных доз диэтилдитиокарбамата натрия (DDC) на деятельность изолированного по методу Лангендорфа сердца крысы, а также влияние получасовой перфузии питательным раствором с добавлением 0,05% DDC на уровень норадреналина и допамина в этом органе. Не обнаружено отклонений в частоте сердечных сокращений, их амплитуде, а также в перфузии коронарных сосудов после применения DDC в дозах от 1 *ng* до 1 *mg*. Получасовая перфузия изолированного сердца крысы понижает уровень норадреналина и допамина в сердце в 4—5 раз. Добавление в питательный раствор 0,05% DDC понижает уровень норадреналина на 50% и незначительно увеличивает уровень допамина.

SUMMARY

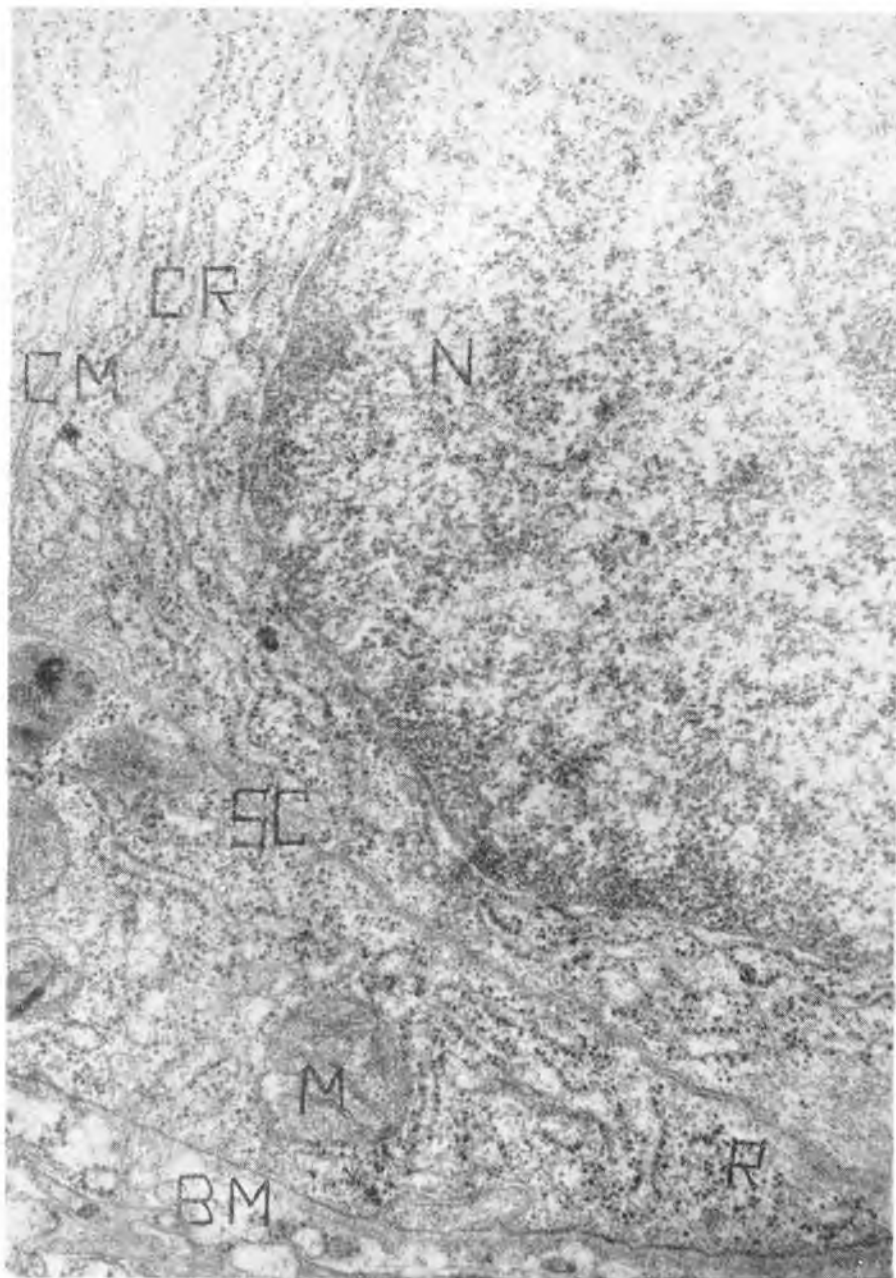
The influence of increased doses of sodium diethyldithiocarbamate (DDC) on the action of isolated rat heart perfused by the method of Langendorff was investigated. The level of noradrenaline and dopamine in the rat heart after 30 min. perfusion by nutritional solution with 0.05% DDC was also examined. After the administration of DDC in single doses from 1 *ng* — 1 *mg*, there were not observed any changes in the frequency of heart beats, their amplitude and the overflow of perfusion fluid through the coronary vessels. The half-hour perfusion of the isolated rat heart brought about a 4—5-fold decrease in the level of noradrenaline and dopamine in the heart. An addition of 0.05% DDC to the perfusing solution caused a 50% decrease in the noradrenaline level and a slight increase in the level of dopamine.



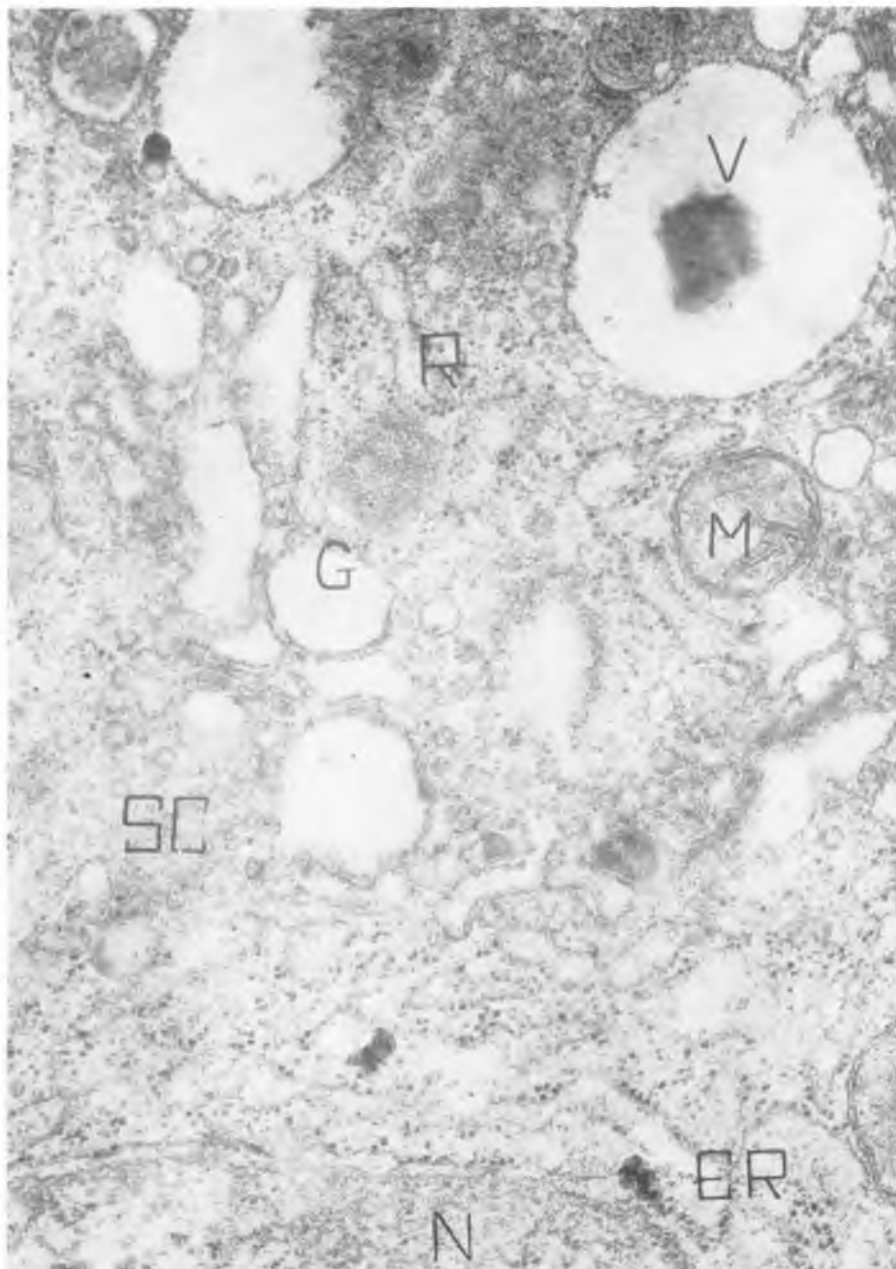
Ryc.!



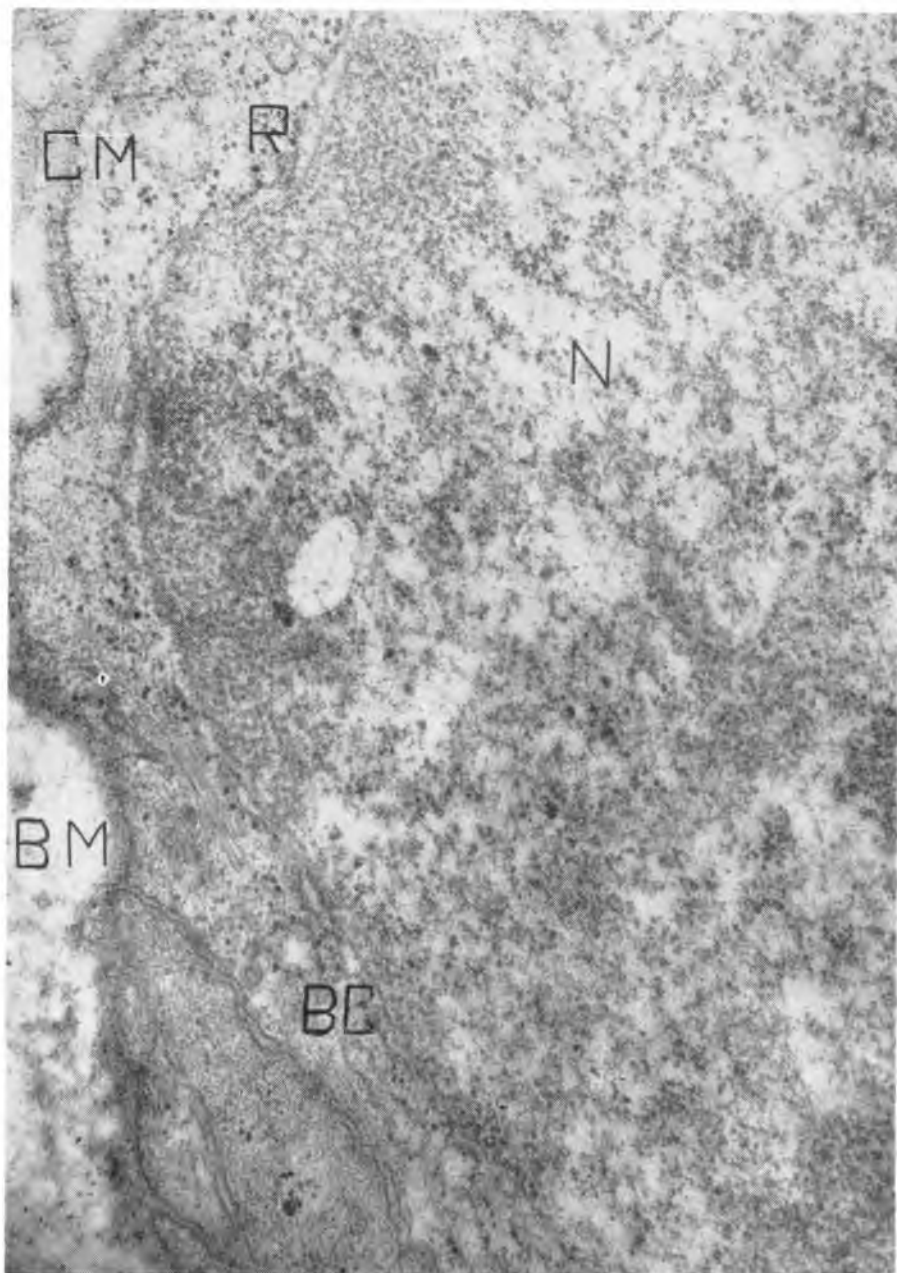
Ryc. 2



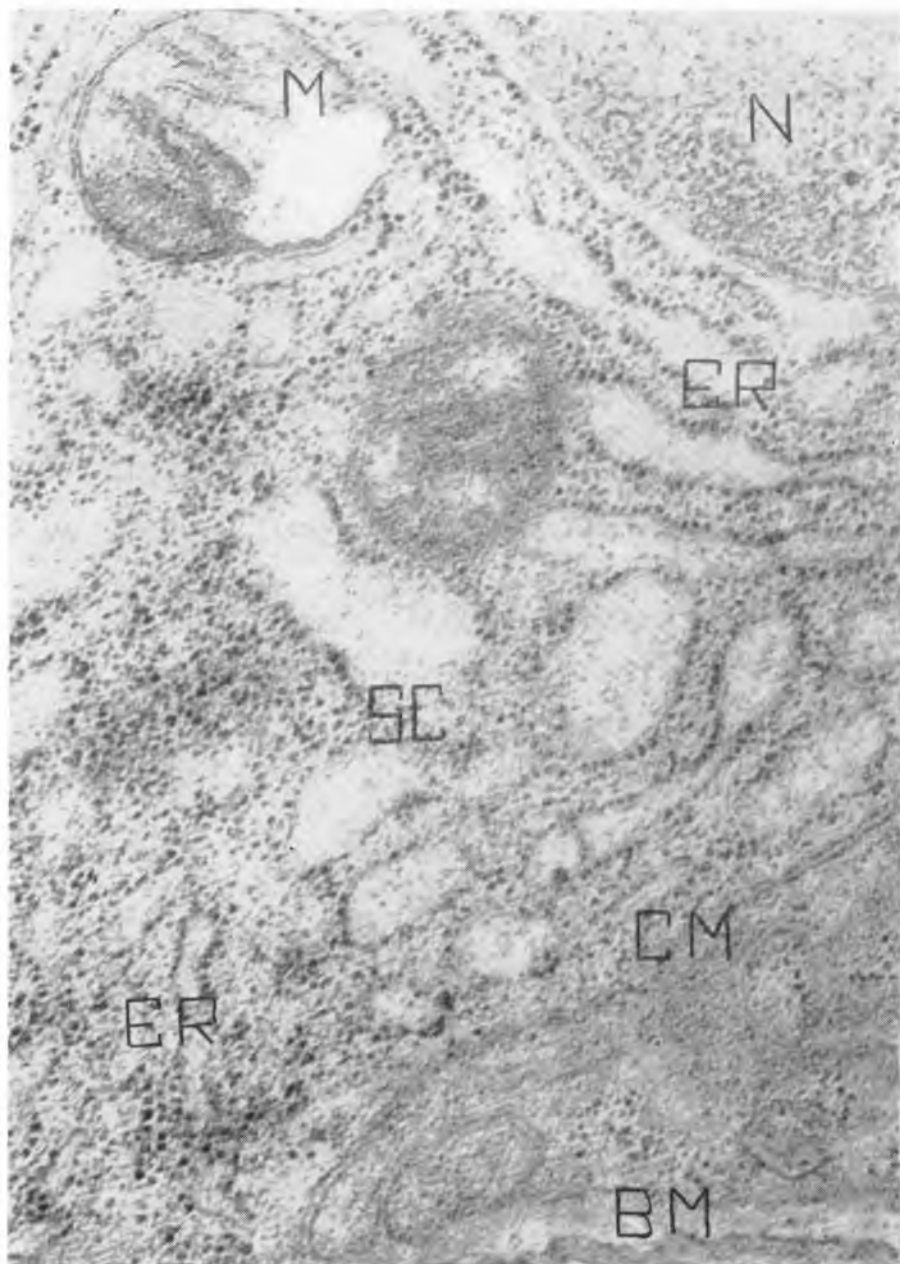
Ryc. 3



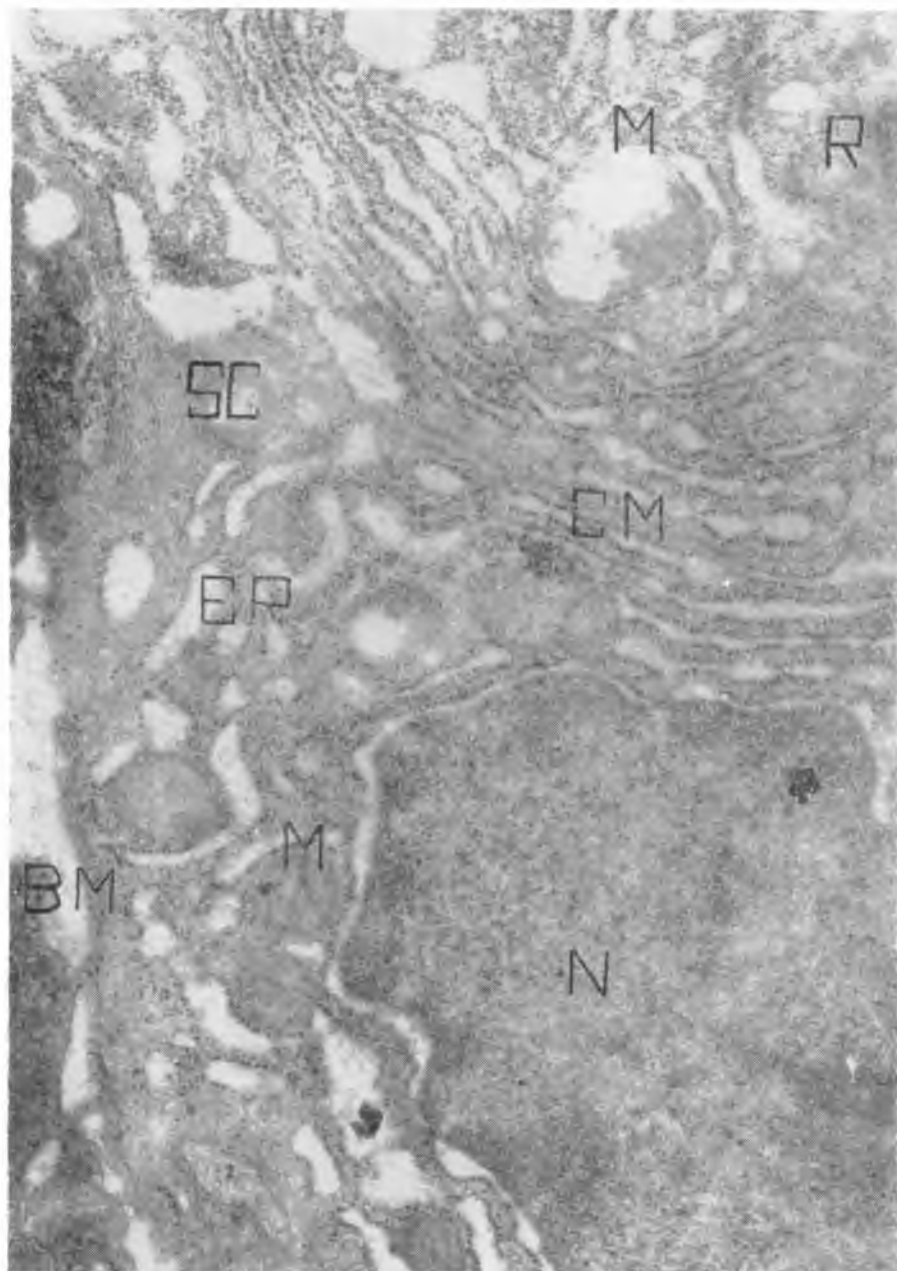
Ryc. 4



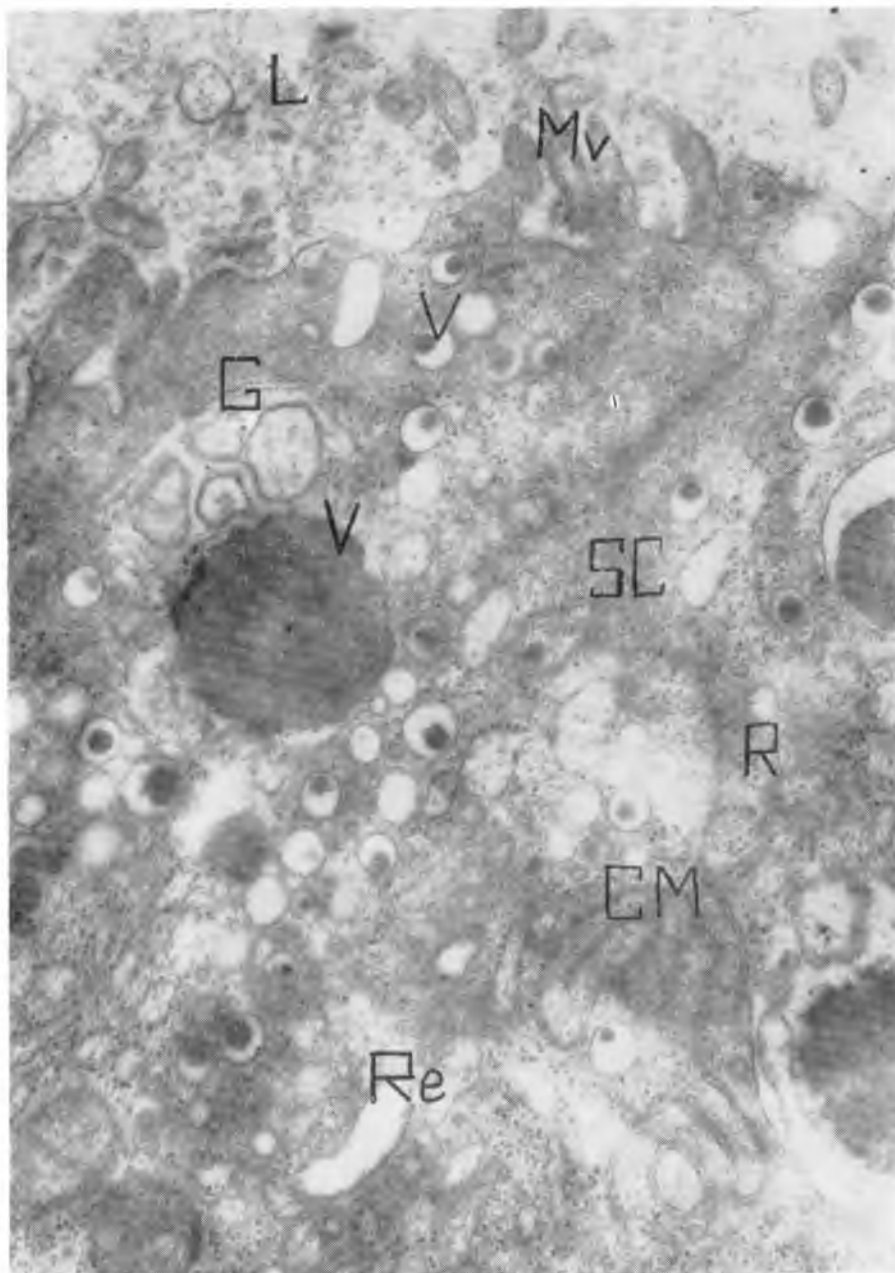
Ryc. 5



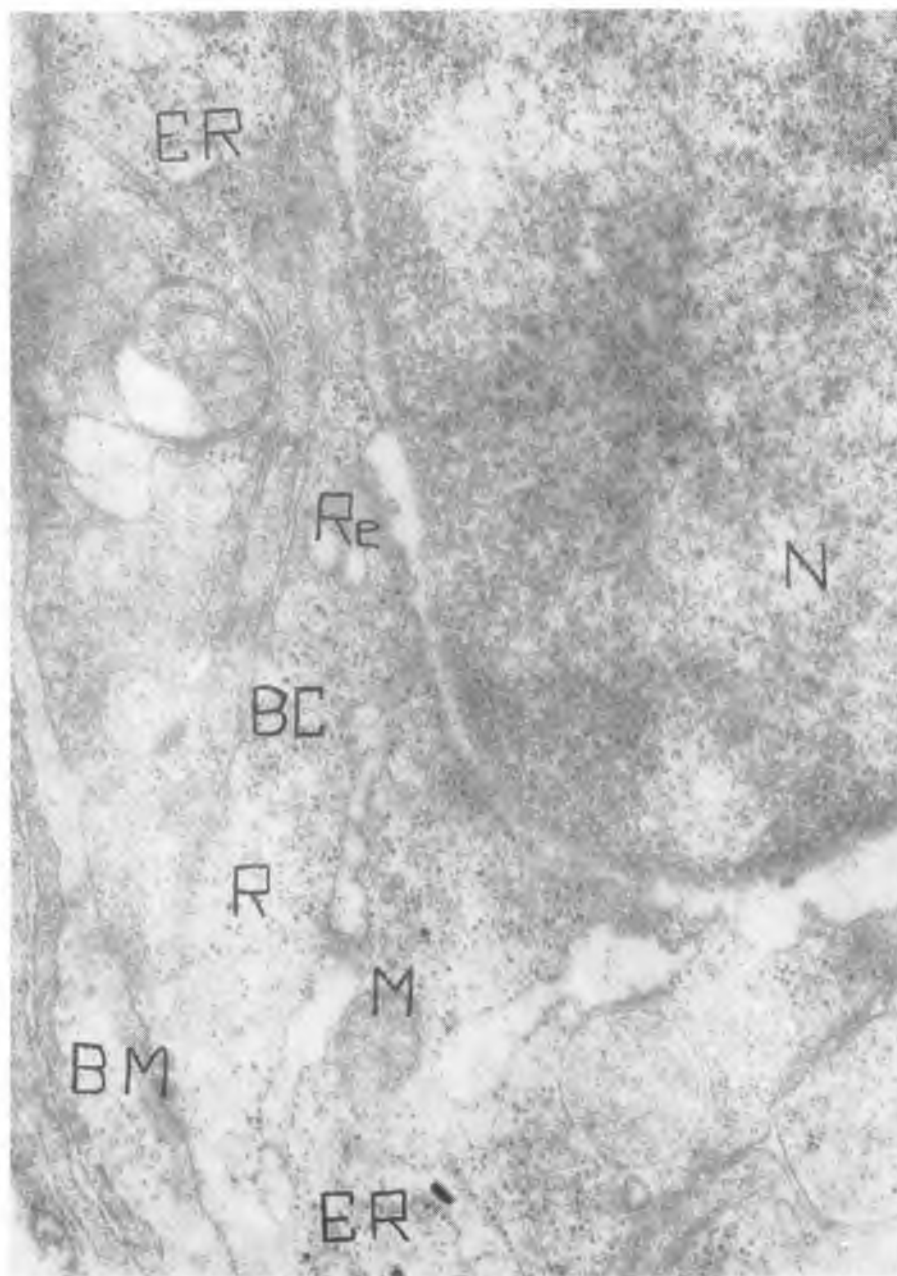
Ryc. 6



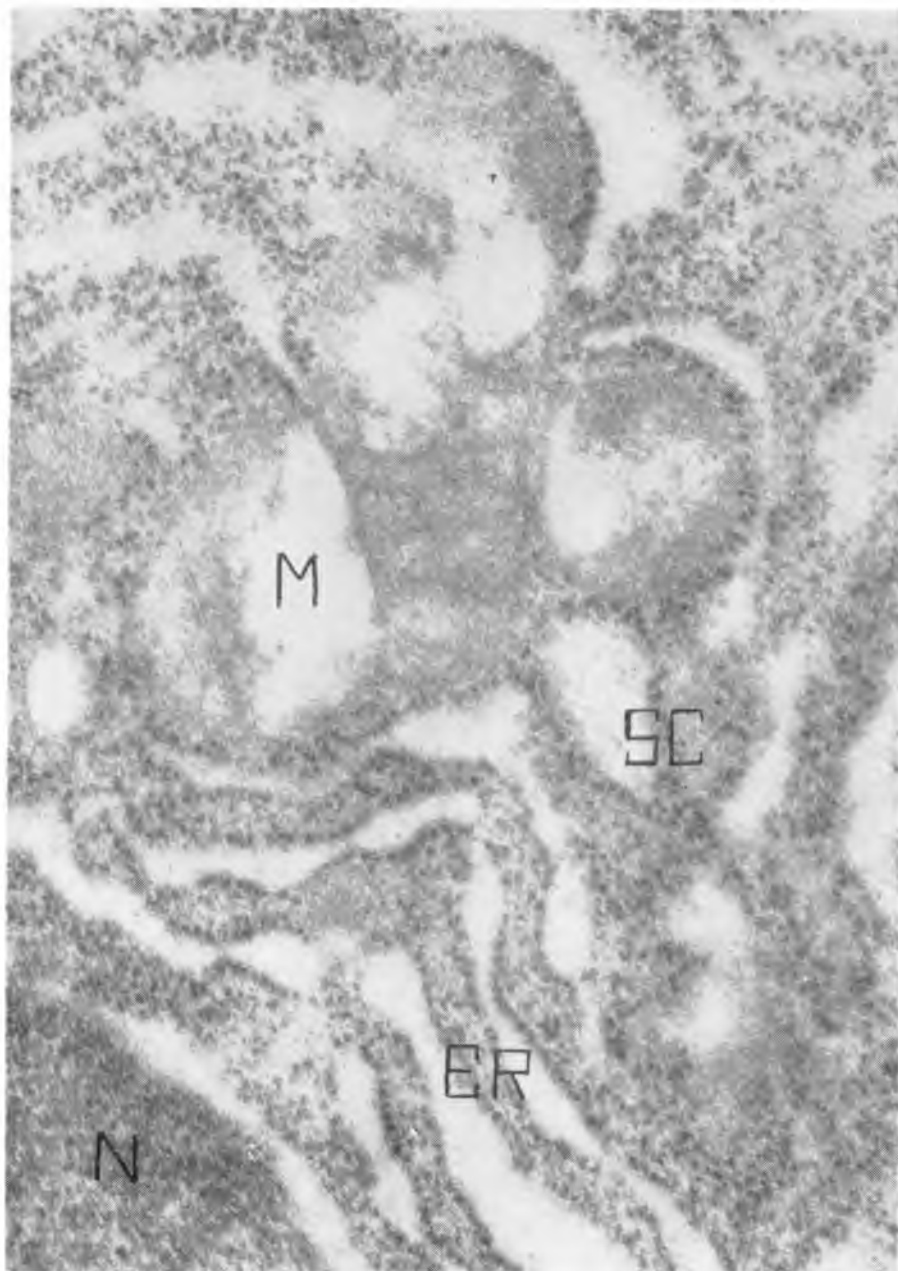
Ryc. 7



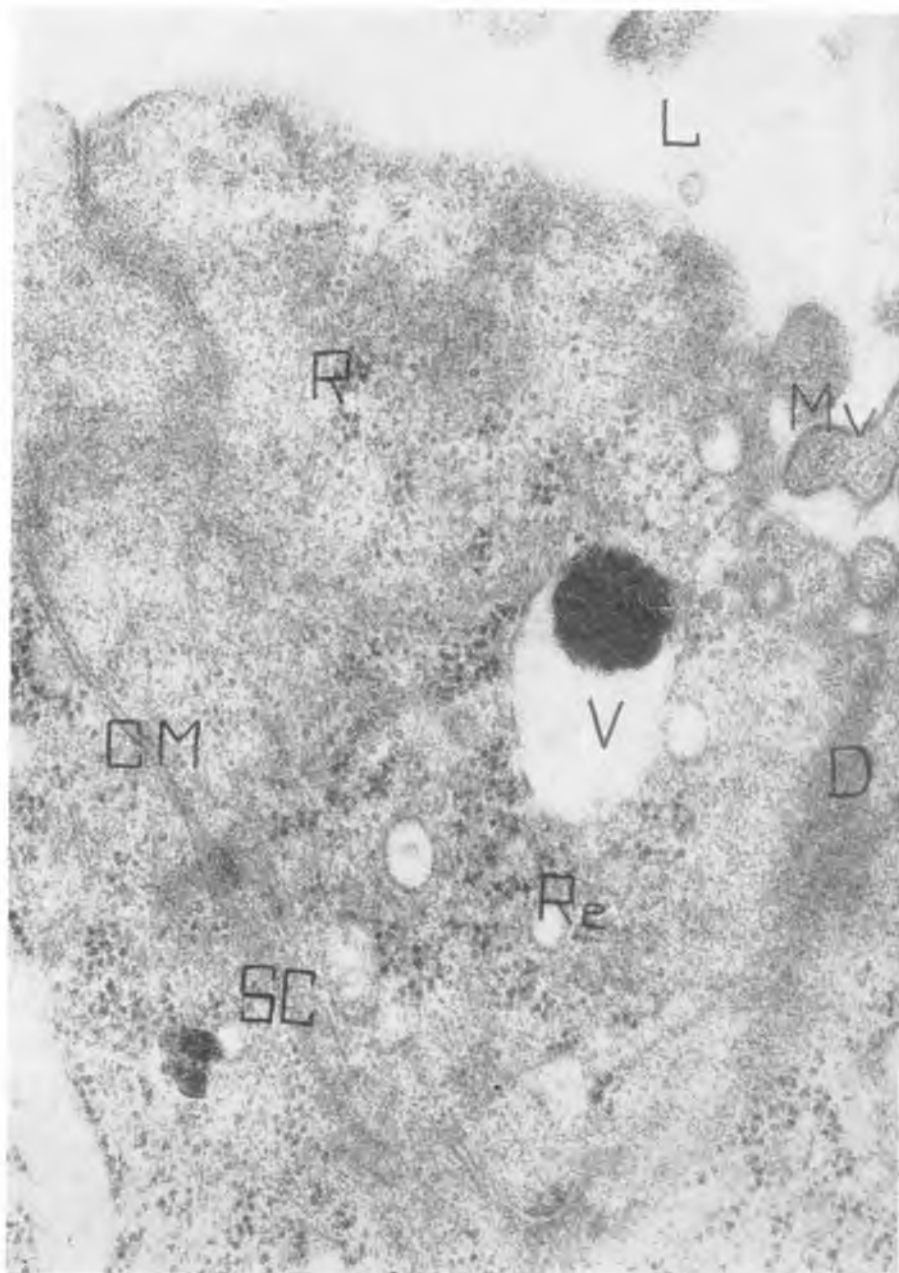
Ryc. 8



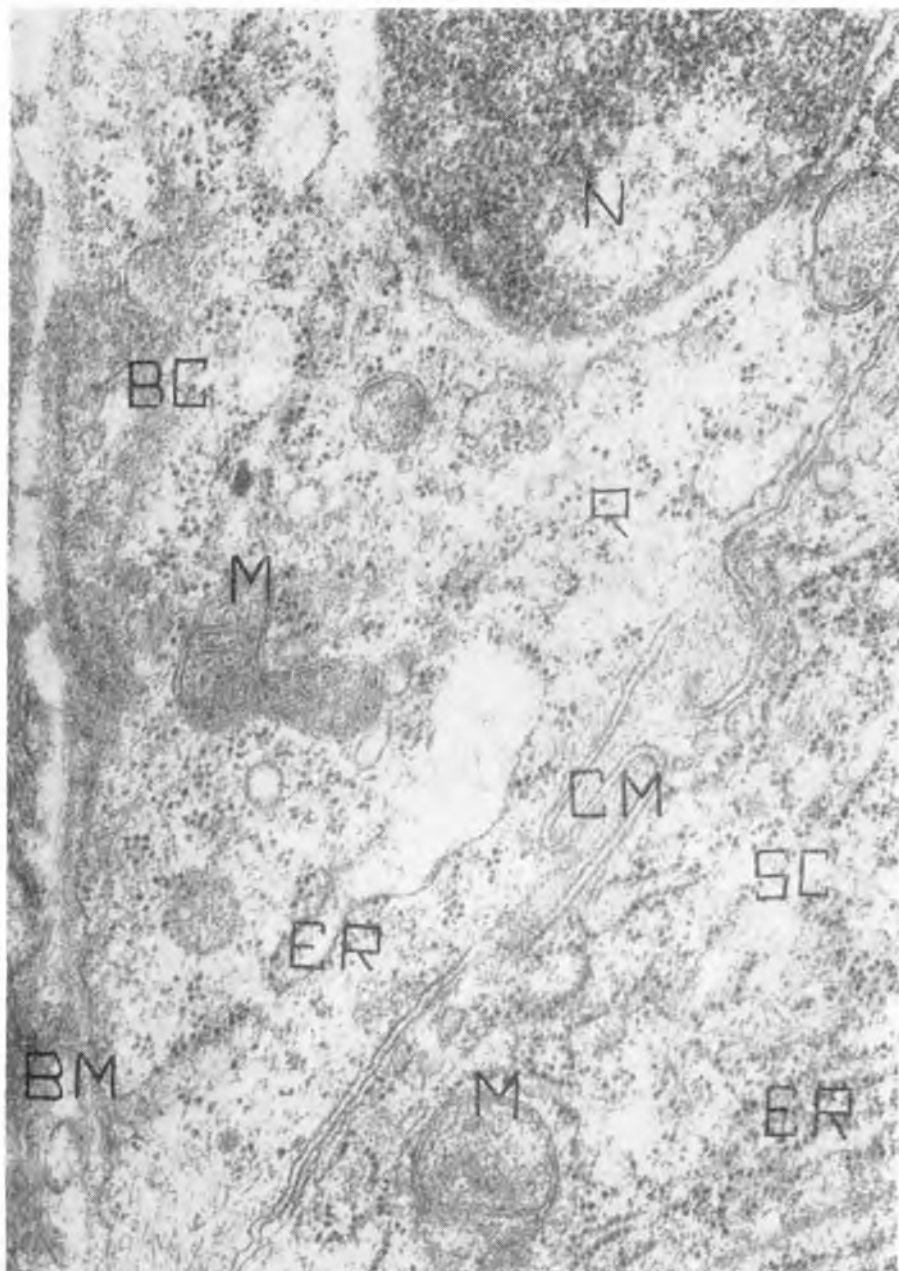
Ryc. 9



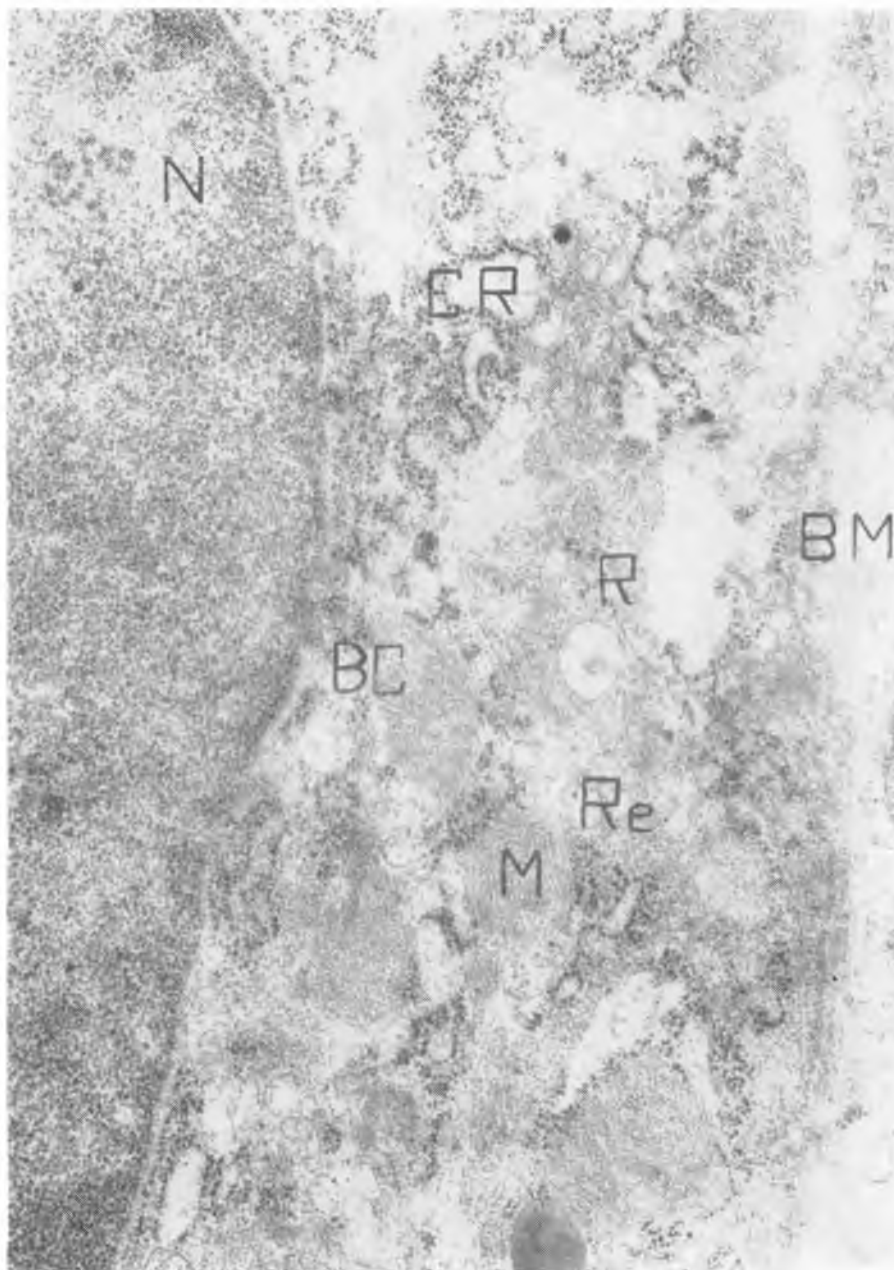
Ryc. 10



Ryc. 11



Ryc. 12



Ryc. 13

