

**Elżbieta Bloch-Bogusławska**

**Wpływ czasu zgonu na reaktywność tętnic ogonowych szczura wyzwalaną przez fenylefrynę (PHE) z równoczesnym zastosowaniem inhibitorów syntazy tlenku azotu (NOS), cyklazy guanylanowej (CG) i cyklooxygenazy (COX). Cz. II**

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

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

Badania na perfundowanych fenylefryną (PHE) tętnicach ogonowych szczura przeprowadzono w 4 grupach czasowych. W celu wyjaśnienia wpływu czasu zgonu na biochemiczne mechanizmy warunkujące funkcjonowanie receptorów metabotropowych zastosowano równocześnie inhibitory NO-syntazy (NOS), cyklazy guanylanowej (CG) i cyklooxygenazy (COX). Badania wykazały, że zastosowanie inhibitora syntazy NO wpływa na poprawę reaktywności tętnic p.m. co wskazuje na utrzymywanie się endogennej syntezy NO po śmierci. Również zastosowanie inhibitora cyklazy guanylanowej (CG) wpływa na poprawę reaktywności tętnic i wewnątrzkomórkowego stężenia jonów  $Ca^{2+}$ . Efektu wzrostu reaktywności tętnic nie obserwowano w badaniach z zastosowaniem inhibitora cyklooxygenazy (COX).

The investigations were conducted on PHE-perfused rat caudal arteries in four different time groups. Inhibitors of NO synthase, CG and COX were used simultaneously to explain the effect of the time of death on biochemical mechanisms controlling the functioning of metabotropic receptors. The authors demonstrated that using the NO synthase inhibitor improved post mortem arterial reactivity, what indicated maintained endogenous NO synthesis after death. The CG inhibitor also improved arterial reactivity and intracellular  $Ca^{++}$  ion concentration. No improvement was seen in arterial reactivity when COX was employed in the study.

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

## WSTĘP

Receptory metabotropowe tworzą dużą grupę receptorów o zróżnicowanej budowie i funkcji, których cechą wspólną jest sprzężenie z białkiem G. Główny podział farmakologiczny na receptory alfa i beta opiera się na charakterystyce działania agonistów oraz selektywnych antagonistów. Wyróżnia się dwa podtypy receptorów alfa (alfa-1 i alfa-2) i trzy receptorów beta (beta-1, beta-2, beta-3 [1, 2]). Głównymi efektami pobudzenia receptorów alfa-1 są: zwężenie naczyń, rozkurcz mięśni gładkich przewodu pokarmowego, wzmożone wydzielanie śliny, pobudzenie glikogenolizy w wątrobie. Pobudzenie receptorów alfa-2 powoduje: hamowanie uwalniania neuroprzekaźników, agregację płytek krwi, skurcz mięśni gładkich naczyń, hamowanie uwalniania insuliny [2, 3, 6]. Yan M. i wsp. [8] wykazali istnienie dwóch podtypów receptora alfa-1: alfa-1A i alfa-1B, wywołujących skurcz mięśni gładkich w wyniku działania różnych mechanizmów molekularnych. Pobudzenie alfa-1A powoduje skurcz tylko w obecności zewnątrzkomórkowego  $Ca^{2+}$ . Skurcze te były wywołane przez napływ do komórki  $Ca^{2+}$  poprzez tzw. zależne od potencjału kanały wapnio-

we typ L. Alfa-1B powoduje skurcz niezależnie od obecności  $Ca^{2+}$  w środowisku i akumulację fosforanów inozytoli. W dotychczasowych badaniach związanych z ustalaniem czasu zgonu w oparciu o analizę farmakometryczną reakcji alfa-adrenergicznych tętnic używano agonistów receptorów alfa-1 i alfa-2 – noradrenaliny NA [4, 5, 7] jak i selektywnych agonistów alfa-1 fenylefryny (PHE). Stwierdzono spadek reakcji maksymalnej tętnic wyzwalanej przez PHE średnio o około 40 % po 2 godziny p.m. i o około 60 % po 4 godziny p.m. w porównaniu z reakcją maksymalną tętnic preparowanych bezpośrednio po zgonie [5]. Śliwka K. i wsp. [7], w badaniach nad reaktywnością tętnic na NA wykazali wolniejszy spadek reakcji maksymalnej oraz dłuższy okres utrzymywania się reaktywności tętnicy. Po upływie 8 godzin p.m. reakcja maksymalna była średnio o 60 % niższa w stosunku do grupy kontrolnej 0 godzin p.m.

## CEL PRACY

W badaniach nad pośmiertną reaktywnością tętnic i jej znaczeniem dla ustalania czasu zgonu wykorzystywano wpływ agonistów alfa-1 i alfa-2 oraz agonistów selektywnych alfa-1-adrenoreceptorów. Ponieważ dotychczas nie analizowano reaktywności tętnic w oparciu o charakter przemian w poszczególnych strukturach receptora metabotropowego, pod kątem ich znaczenia dla określenia czasu śmierci, za celowe uznano przeprowadzenie badań nad reaktywnością tętnic wyzwalaną przez PHE z równoczesnym zastosowaniem inhibitorów NOS, CG i COX oraz określenie wpływu czasu zgonu na rozpręganie powiązań pomiędzy białkiem G, enzymami i kanałem dla  $Ca^{2+}$ .

Tabela I. Zestawienie parametrów  $EC_{50}$ ,  $pD_2$ ,  $E_{max}$ ,  $K_A$  i  $pK_A$  reaktywności tętnic wyzwalanych przez PHE 0, 2 i 4 godz. p.m.

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

PHE Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	$EC_{50}$ (SE)	$pD_2$	$E_{max}$	$K_A$ (SE)	$pK_A$
0 godz. p.m. 0 h p.m.	8	$6,9 \times 10^{-8}$ ( $\pm 0,9$ )	7,16	100	$1,71 \times 10^{-7}$ ( $\pm 1,16$ )	6,77
2 godz. p.m. 2 h p.m.	8	$1,9 \times 10^{-7}$ ( $\pm 0,4$ )	6,72	67	$1,98 \times 10^{-7}$ ( $\pm 1,26$ )	6,70
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$6,21 \times 10^{-6}$ ( $\pm 0,6$ )	5,20	39	$2,07 \times 10^{-7}$ ( $\pm 1,32$ )	6,68

## MATERIAŁ I METODA

Dokładna metodyka została przedstawiona w pracy pt. „Wpływ czasu zgonu na reaktywność tętnic ogonowych szczura wyzwalaną przez NA z równoczesnym zastosowaniem inhibitorów syntazy tlenu azotu (NOS), cykazy guanylanowej (CG) i cyklooxygenazy (COX). Cz. I”. W niniejszej pracy zamiast agonisty w postaci NA stosowano PHE.

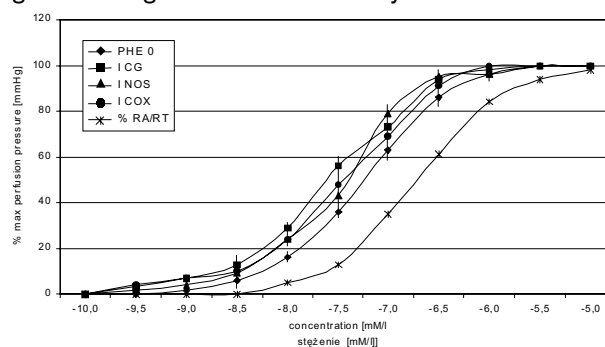
## WYNIKI BADANIA I OMÓWIENIE

1. Wpływ czasu zgonu na reakcje perfundowanej tętnicy ogonowej szczura na (PHE).

Krzywe stężenia – efekt dla PHE wyznaczone na tętnicach pobranych bezpośrednio są przesunięte w lewo względem krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy stężeniem PHE a frakcją zajętych receptorów  $R_A/R_1$  wyrażoną w procentach (ryc. 1).

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

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



Średnia wartość  $EC_{50}$  wyznaczona dla PHE na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie wynosi  $6,9 (\pm 0,9) \times 10^{-8}$  M/l a wartość  $K_A$   $1,71 (\pm 1,16) \times 10^{-7}$  M/l (tab. I).

Krzywe stężenie-efekt wyznaczone na tętnicach pobranych w 2 godz. p.m. ulegają przesunięciu w prawo (ryc. 2), z jednoczesnym obniżeniem  $E_{max}$  średnio do 67 % ( $\pm 9$ ). W tych samych warunkach średnia wartość  $EC_{50}$  dla PHE wzrasta do  $1,9 (\pm 0,4) \times 10^{-7}$  M/l. Mimo wzrostu  $EC_{50}$  średnia wartość stałej  $K_A$  nie ulega zmianie i wynosi  $1,98 (\pm 1,26) \times 10^{-7}$  M/l (tab. I).

Dalsze przesunięcie krzywej stężenie-efekt dla PHE w prawo uzyskano na tętnicach wyizolowanych po 4 godzinach p.m. (ryc. 3). W tych samych warunkach średnia wartość  $EC_{50}$  wynosiła  $6,21 (\pm 0,6) \times 10^{-6}$  M/l a wartość  $E_{max}$  wynosiła 39 % ( $\pm 12$ ). Stała  $K_A$  podobnie jak w poprzednich badaniach nie uległa istotnym statystycznie zmianom i wynosi  $2,07 (\pm 1,32) \times 10^{-7}$  M/l (tab. I).

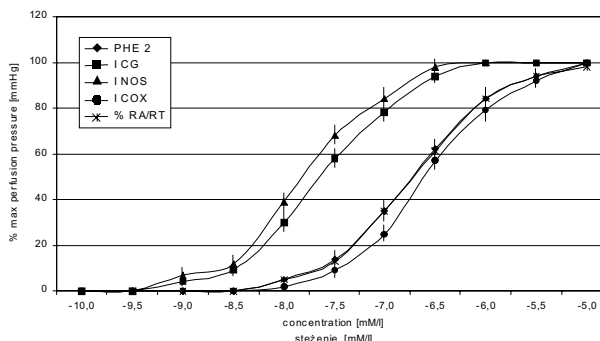
Wyznaczone dla PHE krzywe przedstawiające zależności  $R_A/R_T$  jako funkcję stężenia agonisty przedstawiają hiperbolę, która w miarę upływu czasu p.m. ulega spłaszczeniu. Wskazuje to na zmniejszenie się wraz z upływem czasu od zgonu puli aktywnych receptorów.

2. Wpływ inhibitora NO syntazy (INOS) na zmiany reakcji perfundowanej tętnicy ogonowej szczura na PHE.

Krzywe stężenie-efekt dla PHE z użyciem INOS wyznaczone na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie (ryc. 1), podobnie do krzywych dla PHE z użyciem INOS wyznaczonych na tętnicach perfundowanych w 2 godziny p.m. (ryc. 2), są przesunięte w lewo względem krzywych przedstawiających zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów  $R_A/R_T$  i krzywą stężenie-efekt dla PHE w tych przedziałach czasowych.

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

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



Krzywa stężenie-efekt dla PHE z użyciem INOS wyznaczona na tętnicach perfundowanych w 4 godziny p.m. ma przebieg zbliżony do krzywej przedstawiającej frakcję zajętych receptorów  $R_A/R_T$ , wyraźne jest natomiast przesunięcie krzywej PHE z użyciem INOS w lewo względem krzywej stężenie-efekt dla tętnic perfundowanych PHE w 4 godziny p.m. (ryc. 3).

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

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

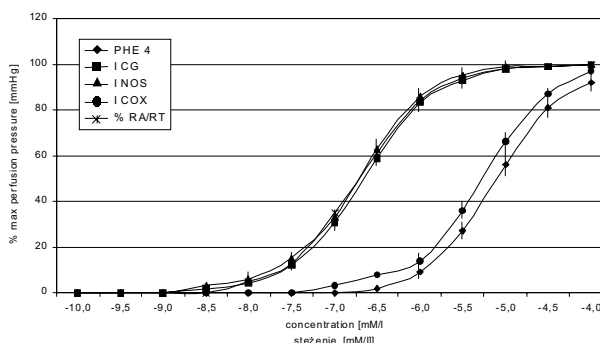


Tabela II. Zestawienie parametrów  $EC_{50}$ ,  $E_{max}$  i  $K_A$  reaktywności tętnic wyzwalanych przez PHE z INOS 0, 2 i 4 godz. p.m.  
Table II. Mean values of  $EC_{50}$ ,  $E_{max}$  and  $K_A$  parameters describing the reactivity of arteries subjected to PHE with INOS stimulation after 0, 2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

PHE z INOS PHE with INOS Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	$EC_{50}$ (SE)	$E_{max}$	$K_A$ (SE)
0 godz. p.m. 0 h p.m.	8	$6,9 \times 10^{-8} (\pm 0,8)$	100	$1,82 \times 10^{-7} (\pm 0,98)$
2 godz. p.m. 2 h p.m.	8	$2,2 \times 10^{-8} (\pm 1,1)$	100	$1,78 \times 10^{-7} (\pm 1,24)$
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$3,8 \times 10^{-6} (\pm 1,3)$	41	$2,41 \times 10^{-7} (\pm 1,41)$

Tabela III. Zestawienie parametrów  $EC_{50}$ ,  $E_{max}$  i  $K_A$  reaktywności tętnic wyzwalanych przez PHE z ICG 0, 2 i 4 godz. p.m.

Table III. Mean values of  $EC_{50}$ ,  $E_{max}$  and  $K_A$  parameters describing the reactivity of arteries subjected to PHE with ICGO stimulation after 0, 2 and 4 hours after death.

PHE z ICG PHE with ICG Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	$EC_{50}$ (SE)	$E_{max}$	$K_A$ (SE)
0 godz. p.m. 0 h p.m.	8	$6,9 \times 10^{-8}$ ( $\pm 0,61$ )	100	$1,71 \times 10^{-7}$ ( $\pm 0,97$ )
2 godz. p.m. 2 h p.m.	8	$2,1 \times 10^{-8}$ ( $\pm 0,53$ )	100	$1,71 \times 10^{-7}$ ( $\pm 0,97$ )
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$1,6 \times 10^{-6}$ ( $\pm 0,66$ )	52	$2,01 \times 10^{-7}$ ( $\pm 0,97$ )

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

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

PHE z ICOX PHE with ICOX Czas zgonu Time of death	Liczba przypadków Number of cases	$EC_{50}$ (SE)	$E_{max}$	$K_A$ (SE)
0 godz. p.m. 0 h p.m.	8	$6,9 \times 10^{-8}$ ( $\pm 1,7$ )	100	$1,82 \times 10^{-7}$ ( $\pm 1,07$ )
2 godz. p.m. 2 h p.m.	8	$2,8 \times 10^{-7}$ ( $\pm 0,9$ )	53	$1,94 \times 10^{-7}$ ( $\pm 1,17$ )
4 godz. p.m. 4 h p.m.	8	$5,1 \times 10^{-6}$ ( $\pm 0,6$ )	47	$2,11 \times 10^{-7}$ ( $\pm 0,31$ )

Wyznaczone wartości  $EC_{50}$  wynosiły dla tętnic perfundowanych PHE z użyciem INOS w 2 godz. p.m.  $2,2 (\pm 1,1) \times 10^{-8}$  M/l a w grupie 4 godz. p.m.  $3,8 (\pm 1,3) \times 10^{-6}$  M/l (tab. II).

3. Wpływ inhibitora cykazy guanylanowej (ICG) na zmiany reakcji perfundowanej tętnicy ogonowej szczura na PHE.

Krzywe stężenie-efekt dla PHE z użyciem ICG wyznaczone na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie (ryc. 1) podobnie do krzywych dla PHE z użyciem ICG wyznaczonych na tętnicach perfundowanych w 2 godziny p.m. (ryc. 2) są przesunięte w lewo względem krzywych przedstawiających zależności pomiędzy frakcją zajętych receptorów  $R_A/R_T$

i krzywą stężenie-efekt dla PHE w tych przedziałach czasowych. Krzywa stężenie-efekt dla PHE z użyciem ICG wyznaczona na tętnicach perfundowanych w 4 godziny p.m. jest przesunięta w prawo względem krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów  $R_A/R_T$  wyrażoną w procentach (ryc. 3). Średnie wartości  $EC_{50}$  wyznaczone dla PHE z użyciem ICG na tętnicach perfundowanych w 2 godz. p.m. wynosi  $2,1 (\pm 0,53) \times 10^{-8}$  M/l a w 4 godz. p.m.  $1,6 (\pm 0,66) \times 10^{-6}$  M/l (tab. III).

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

Krzywe stężenie-efekt dla PHE z użyciem ICOX wyznaczone na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie (ryc. 1) są przesunięte w stronę lewą względem krzywych przedstawiających zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów  $R_A/R_T$  oraz krzywą stężenie-efekt dla PHE w tym przedziale czasowym. W 2 godziny p.m. krzywa stężenie-efekt dla PHE z użyciem ICOX ulega przesunięciu w prawo w stosunku do krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów  $R_A/R_T$ , pozostaje jednak nadal po stronie lewej względem krzywej stężenie-efekt dla PHE w tej grupie czasowej (ryc. 2). Krzywa stężenie-efekt dla PHE z użyciem ICOX wyznaczona na tętnicach perfundowanych w 4 godz. p.m. jest przesunięta w lewo względem krzywej przedstawiającej zależność pomiędzy frakcją zajętych receptorów  $R_A/R_T$  wyrażoną w procentach (ryc. 3). Średnia wartość  $EC_{50}$  wyznaczona dla PHE z użyciem ICOX na tętnicach pobranych bezpośrednio po zgonie wynosiła  $6,9 (\pm 1,7) \times 10^{-8}$  M/l, w 2 godz. p.m. wzrosła do wartości  $2,8 (\pm 1,2) \times 10^{-7}$  M/l. Dalszy wzrost wartości  $EC_{50}$  stwierdzano w grupie 4 godz. p.m., wartość ta wynosiła  $5,1 (\pm 0,6) \times 10^{-6}$  M/l. Wartości stałej  $K_A$  nie wykazywały w zależności od czasu zgonu statystycznie istotnych różnic (tab. IV).

## DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wykazały, że w miarę upływu czasu od zgonu obniża się wartość reakcji maksymalnej tętnic wyzwalanej przez NA i PHE. Nie wykazano natomiast istotnych statystycznie różnic w zależności od rodzaju użytego agonisty. Uzyskane wyniki są zbieżne z obserwacjami Miścickiej-Śliwki [4, 5, 6] i Śliwki K. [7]. Z opracowań Miścickiej-Śliwki [5] wynika ponadto, że nie ma statystycznie istotnych różnic pomiędzy najczęściej spotykanymi w praktyce medyka sądowego rodzajami przyczyn zgonu. Zastosowanie natomiast inhibitorów NO syntazy, cykloooxygenazy i cyklazy guanylanowej pozwoliło na prześledzenie mechanizmów wpływających na reaktywność tętnic, w zależności od funkcjonowania struktur wewnątrzreceptorowych. Brak większych różnic położenia krzywych przedstawiających reakcję tętnicy, w postaci odsetka reakcji maksymalnej uzyskanej dla danej tętnicy, w funkcji stężenie PHE oraz różnic w wartościach dawek efektywnych na tyle istotnych, aby myśleć o nich jako o wskaźniku czasu śmierci, zaobserwowany przez Miścicką-Śliwkę [6], znajduje potwierdzenie w wynikach obecnych badań. Zastosowanie inhibitorów NOS, CG i COX w badaniach reaktywności tętnic wyzwalanych przez PHE nie wykazuje

istotnych różnic w stosunku do wyników badań nad pośmiertną reaktywnością tętnic wyzwalaną przez NA z użyciem tych samych inhibitorów (omówionych w części I).

## WNIOSKI

1. W miarę upływu czasu od zgonu dochodzi do obniżenia puli receptorów rezerwowych i reaktywności tętnic na fenylefrynę.
2. Wzrost reaktywności tętnic po zastosowaniu inhibitorów NOS i CG nie zależy od rodzaju użytego agonisty.
3. Brak poprawy pośmiertnej reaktywności tętnic po zastosowaniu inhibitora COX co wskazuje na małą przydatność tego rodzaju badania do ustalania czasu zgonu

## PIŚMIENNICTWO

1. Bylund D. B.: Nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 1994, 46, 121.
2. Bylund D. B.: Subtypes of alfa1 and alfa2 adrenergic receptors. *FASEB J.* 1992, 6, 832.
3. Mc Grath J. C., Wilson V.: Alfa-adrenoceptor subclassification by classical and response-related methods: some question, different answers. *Trends. Pharmacol. Sci.* 1988, 9, 162.
4. Miścicka-Śliwka D., Szadujkis-Szadurski L.: Analiza farmakometryczna pośmiertnych reakcji alfa-adrenergicznych tętnic. *Postępy Med. Sąd. i Krym.* 1995, 2, 71.
5. Miścicka-Śliwka D., Szadujkis-Szadurski L.: The study of post mortem changes in alfa-1-adrenoceptor function. *Adv. in Forensic Sci.* 1985, 2, 107.
6. Ruffolo R. R. Jr., Ichols A. J., Stadel J. M., Hieble J. P.: Structura and function of alfa-adrenoceptors. *Pharmacol. Rev.* 1991, 43, 475.
7. Śliwka K., Szadujkis-Szadurski L.: Badania doświadczalne nad reaktywnością tętnic w okresie interletalnym na adrenergiczne działanie noradrenaliny. *Ann. Acad. Gedan.* 1980, 10, 267.
8. Yan M. i wsp.: Alpha-1A and Alpha -1B-adrenoceptors are the major subtypes in human saphenous vein. *Live Sci.* 2001, 68, 1191.

Adres autora:

Dr med. Elżbieta Bloch-Bogusławska  
Katedra Medycyny Sądowej UMK w Toruniu  
Collegium Medicum w Bydgoszczy  
ul. M. Skłodowskiej-Curie 9  
85-094 Bydgoszcz