

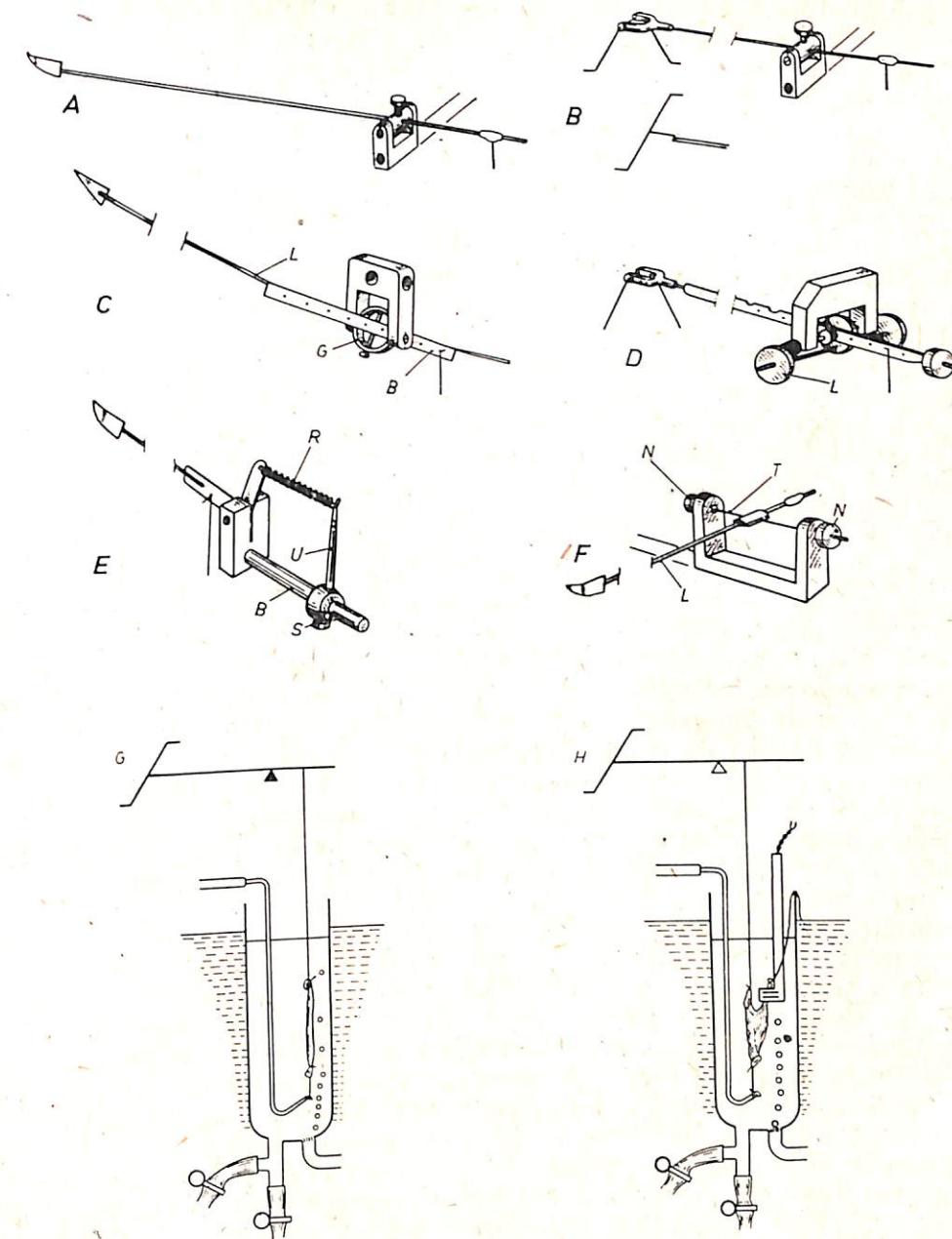
6. NARZĄDY IZOLOWANE

- 6.1. Wstęp
- 6.2. Serce
- 6.3. Przedionki
- 6.3.1. Przedionki królika
- 6.3.2. Przedionki świnie morskiej
- 6.4. Tętnica
- 6.4.1. Tętnica główna królika
- 6.4.2. Tętnica krezkowa przednia drobiu
- 6.5. Dno żołądka
- 6.6. Jelito
- 6.6.1. Jelito cienkie świnie morskiej
- 6.6.2. Preparat Finklemana
- 6.6.3. Jelito czece królika
- 6.6.4. Taśma okreńnicy
- 6.6.5. Jelito grube szczura
- 6.7. Macica
- 6.7.1. Macica szczura
- 6.7.2. Macica świnie morskiej
- 6.8. Powrózek nasienny
- 6.8.1. Powrózek nasienny myszy
- 6.8.2. Powrózek nasienny świnie morskiej (preparat Hukoviča)
- 6.8.3. Powrózek nasienny szczura
- 6.9. Tchawica
- 6.10. Przepona
- 6.11. Oznaczanie pA_X według Schilda

6.1. WSTĘP

Przy ocenie działania leku, pomimo wielkiego rozwoju metod biochemicznych, chromatograficznych, immunoradiograficznych często posługujemy się metodą narzędziów izolowanych. Niektóre metody, np. oznaczanie acetylocholiny w homogenizatach tkanki mózgowej, superfuzja kaskadowa umożliwiająca oznaczanie autakoidów, przede wszystkim opierają się na technice narzędziów izolowanych. Metody te mają równocześnie wiele wad, ponieważ powtarzalność wyników zależy od wielu czynników, jak jednorodności genetycznej materiału zwierzęcego, wieku, masy, płci i warunków, w jakich zwierzę laboratoryjne się znajduje. Nie bez wpływu są czynniki klimatyczne i chronobiologiczne.

Dla uzyskania wyników powtarzalnych istotny jest właściwy sposób zabijania zwierząt przeznaczonych do tych doświadczeń. Królika lub świnę morską zabijamy przez uderzenie w tył głowy i wykrwawienie z przeciętych tętnic wspólnych. Szczurów możemy zabić w ten sam sposób lub przez dyslokację rdzenia kregowego. W omawianym cyklu doświadczeń nie zabijamy zwierząt przez uśpienie, ponieważ środek znieszczulający ogólnie zmienia reaktywność narzędziów badanych. Przy oznaczaniu histaminy w wyciągach biologicznych, np. w płynie perfuzyjnym, dodajemy atropinę (2×10^{-6} – 10^{-7} mol/l tzn. 1,4–0,7 µg/ml) do płynu Tyrode'a ze względu na możliwą obecność acetylocholiny. Przy oznaczaniu wartości acetylocholiny dodajemy do płynu Tyrode'a $2,5 \times 10^{-6}$ mol/l maleinianu mepiraminy, tzn. 1 µg/ml rozpoczynając podawanie od 0,2 ml roztworu na ląznię objętości 10 ml dla zapobieżenia prawdopodobnemu działaniu histaminy i serotonininy. Dodawanie tych antagonistów jest zbędne jeżeli posługujemy się roztworami chemicznymi czystej acetylocholiny lub histaminy. Nie ma antagonisty serotonininy, który znosiłby wszystkie farmakologiczne skutki jej działania. Zalecamy jednakże przygotowanie roztworu dietyloloamidu kwasu 2-bromolizergowego w płynie Krebsa zamiast płynu Krebsa. W tym celu sporządzamy roztwór dietyloloamidu



Ryc. 6.1. A — pisak boczny, najprostsza postać pisaka, wykreśla linię krzywą podczas skurczu preparatu. B — pisak czołowy, zawiasowe umocowanie zakończenia pisaka i zapis czołowy preparatu. C — pisak obrotowo-pierścieniowy powodujący wykreślenie linii prostej podczas skurzu preparatu. D — pisak aksotoniczny kurczynia obrotowego, tarcie pomiędzy pisakiem i papierem jest stałe. E — pisak sprężynujący. Nitka łącząca preparat z pisakiem zaczepiona jest po tej samej stronie osi obrotu co zakończenie pisaka. Zakończenie to porusza się w stronę przeciwną niż sprężyna naciągająca R, której napięcie jest regulowane przez zwolnienie nakrętki S i przesunięcie pionowego zaczepu U wzdłuż prętu B. F — pisak torsyjny. Pisak L jest umocowany do nici nylonowej T lub do cienkiej struny metalowej, której napięcie jest regulowane za pomocą nakrętki N. G — naczynie do badań narzędziów izolowanych z elektrodom (preparat Finklemana). H — naczynie do badań narzędziów izolowanych bez drażnienia elektrycznego (macica).

kwasu 2-bromolizergowego o stężeniu 10^{-5} mol/l, tzn. 4 µg/ml i rozcieńczamy 2 ml tego roztworu w 200 ml płynu Krebsa. Pamiętać należy, że w badaniach nad lekami pobudzającymi receptor β -adrenergiczny (salbutamol) określa się dawki kumulujące leków przez dodawanie dawek wzrostających w postępie geometrycznym bez zmiany płynu odzywczego. Każde stężenie powinno zapewnić maksymalne działanie.

Istnieje możliwość znalezienia narządu zbudowanego z mięśni gładkich, który jest szczególnie wrażliwy na działanie określonego hormonu, a nie jest wrażliwy na inne substancje wewnętrzustrojowe. Jelito szczura jest bardzo wrażliwe na działanie kurczące angiotensyny, ale jest mało wrażliwe na serotoninę i bradykininę. Jelito kota jest szczególnie wrażliwe na bradykininę, natomiast jelito kurczęcia na rozkurczające działanie adrenaliny. Swoistość badania biologicznego zwiększa się przez zastosowanie związków antagonistycznych. Szczegółowe informacje dotyczące superfuzji kaskadowej znajdzie czytelnik w opracowaniu Gryglewskiego [9].

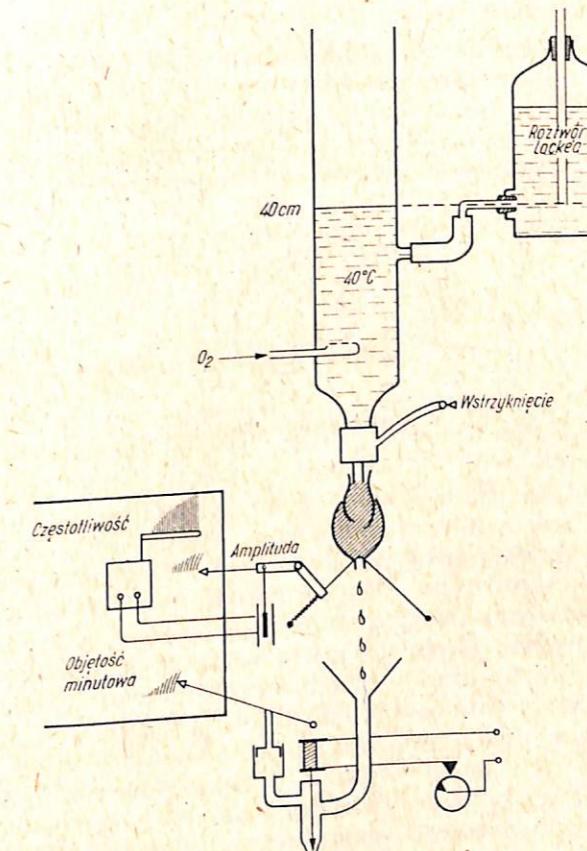
Doświadczenia opisane w tym rozdziale polegają na rejestracji zmian długości preparatu lub jego napięcia mięśniowego (*tonus*). Najprostsze i najłatwiejsze do uzyskania zapisu są pisaki przedstawione na ryc. 6.1. Długość pisaka zazwyczaj jest tak dobrana, aby zapewnić powiększenie 5–7-krotne. Obciążenie pisaka waha się w granicach 0,5 g–1,0 g. Zakończenie pisaka zakreśla linię na papierze okopconym umocowanym do walca kimografu. Papier ten musi być przyklejony do walca, np. przezroczystą taśmą samoklejącą. Bezpośrednio po zakończeniu doświadczenia papier okopcony należy utrwalić roztworem alkoholowym szelaku. W tym celu 20 g rozdrobnionego szelaku rozpuszczamy w 1 l spirytusu denaturowanego, dodajemy 10 ml acetolu mieszając od czasu do czasu. Po 24 h roztwór ten nadaje się do utrwalenia. Jeżeli skurcze preparatu są zbyt powolne to na statywie, do którego zamocowany jest pisak, można zamocować wibrator. W tym celu stosujemy pompkę przeponową jednowyłową „Skalar 1–2”, która równocześnie zapewnia odpowiednie napowietrzanie łaźni.

Jeżeli skurcze są zbyt szybkie, np. skurcze mięśni szkieletowych lub skurcze mięśnia sercowego, to stosujemy lekki pisak sprężynujący (E) lub (F). Do rejestracji skurczów jelita stosujemy zazwyczaj pisak boczny (A). Pisak czołowy (B) zakreśla linię prostą, a nie zakrzywioną, lecz nie zapewnia stałego stosunku pomiędzy wartością linearnego skrócenia preparatu i długością linii wykreślonej, również obciążenie pisaka nie jest stałe. Obciążenie pisaka auksotonicznego (D) zwiększa się, gdy zwiększa się skurcze narządu. Rejestracja za pomocą pisaków izotonicznych, których obciążenie jest stałe niezależnie od wielkości skurcza, często zapewnia gorsze wyniki niż rejestracja za pomocą przetworników elektrycznych, ponieważ tylko urządzenia elektryczne rejestrują skurcze izometryczne, tzn. rejestrują zwiększenie napięcia (*tonus*) wówczas, gdy długość preparatu izolowanego pozostaje bez zmian.

6.2. SERCE

Izolowane serce królika (metoda Langendorffa). Przygotowujemy kilka litrów roztworu Locke'a. Nalewamy 2 l tego roztworu do butli ciśnieniowej i podgrzewamy łaźnię wodną do temp. 39°C. Nalewamy wodę do płaszcza wodnego pośrednio otaczającego izolowane serce i podgrzewamy do temp. 39°C. Ustawiamy aparaturę i przygotowujemy kaniulę, która później wprowadzimy do tętnicy głównej. Królika ogłuszamy i wprowa-

dzamy dren polietylenowy do żyły udowej. Do tętnicy szyjnej wspólnej wprowadzamy kaniulę pozbawioną odprowadzeń bocznych. Wykrwawiamy zwierzę, a zebrane krew pozbawiamy włóknika w wyniku ruchów wirowych bagietki szklanej lub małego mieszadłka. Równocześnie z butli ciśnieniowej odlewamy 1,5 l ciepłego roztworu izotonicznego chlorku sodowego i wstrzykujemy litr lub więcej do żyły udowej. Zabieg ten umożliwia dokładniejsze wykrwawienie. Zbieramy ostrożnie wypływającą krew, usuwamy skrzepy, sączymy przez płótno lub bawełnę i umieszcujemy w butli ciśnieniowej, która zawiera pozostałe 0,5 l ciepłego roztworu izotonicznego chlorku sodowego. Uzupełniamy podstawowy roztwór do objętości 2,0–2,5 l. Ciśnienie płynu perfuzyjnego określamy doświadczalnie, tzn. dobieramy ciśnienie, które powoduje zamknięcie zastawek tętnicy głównej. Uwidacznia się to przepływem płynu perfuzyjnego przez naczynia wieńcowe i wypływem przez żyłę prozną dolną. Zazwyczaj stosujemy stałe ciśnienie perfuzyjne równe 1960 — 3920 Pa, tzn. odpowiadające ciśnieniu hydrostatycznemu 20–40 cm słupa wody. Po wykrwawieniu zwierzęcia szybko otwieramy klatkę piersiową wzdłuż linii śródowej i ostrożnie oddzielamy serce i płuca. Zwracamy uwagę, aby nie uszkodzić naczyń i mięśnia sercowego, nie poprzecinać przedsonków. Pozostawiamy około 2,5 cm odcinek tętnicy głównej (aorty). Podwiązujemy wszystkie duże odgałęzienia tętnicy głównej i naciągamy ją na kaniulę. Kaniuli nie wsuwamy zbyt głęboko, aby nie uszkodzić zastawki półksięgowej (zastawki aorty) ani naczyń wieńcowych. Po przewiązaniu kaniuli wy-



Ryc. 6.2. Schemat do doświadczenia na izolowanym sercu królika.

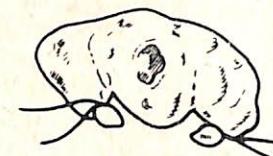
puszczamy powietrze z drenów perfuzyjnych przez otwarcie zacisku i wypuszczenie płynu, wówczas gdy aorta powyżej kaniuli jest zaciśnięta zaciskiem naczyniowym (typ „bulldog“). Następnie usuwamy zacisk i rozpoczynamy perfuzję serca. Z butli lub z kompresora natleniamy płyn perfuzyjny aż do pojawiienia się pęcherzyków gazu. Temperatura płynu perfuzyjnego wynosi ok. 39°C. Początkowo nie stwierdzamy przejawów czynności serca, wkrótce jednak pojawiają się coraz mocniejsze skurcze serca. Wtedy rozpoczynamy oznaczanie. Płyn, który przepłynął przez serce ponownie dolewamy do roztworu podstawowego. Przygotowujemy roztwór epinefryny 1:10000 i powoli bez przerw wstrzykujemy 2 ml tego roztworu poprzez ścianę gumowego drenu tuż powyżej serca. Zwracamy uwagę, aby żaden płyn zawierający leki nie przedostał się ponownie do roztworu podstawowego.

Badanie na izolowanym sercu zwierząt stałocięplnych jest niepewną i praktycznie bez większego znaczenia metodą w ocenie działania leków poprawiających przepływ wieńcowy. Więcej informacji o właściwościach tych leków można uzyskać wówczas, gdy zastosuje się stały, kontrolowany przepływ wieńcowy. Wymaga to zastosowania specjalnej aparatury [15].

6.3. PRZEDSIONKI

6.3.1. Przedsionki królika

Po zabiciu zwierzęcia możliwie szybko otwieramy klatkę piersiową. Przeparujemy serce i umieszcujemy w roztworze Ringer-Locke'a o temperaturze pokojowej. Usuwamy tkanki pozostawiając jedynie przedsionki (p. ryc. 6.3). Do każdego uszka serca przywiązujemy nitkę, preparat umieszcujemy w natlenionym roztworze Ringer-Locke'a o temp. 39°C.



Ryc. 6.3. Wypreparowane serce królika.

Jeden koniec nici zamocujemy do haczyka lub zaczepu znajdującego się na rurce szklanej, napowietrzającej, drugi koniec nici zamocujemy do pisaka z lekko naciągniętą sprężyną lub do przetwornika połączonego ze wzmacniaczem i rejestratorem. Objętość łaźni nie powinna przekraczać 25 ml. Jeżeli podczas preparowania nie został usunięty węzeł przedsionkowy, to preparat będzie pracował przez wiele godzin. Zazwyczaj stosujemy cykl 6-minutowy: 0 min — uruchomić kimograf (oznaczyć częstotliwość skurczów), 1 min dodać lek, 3 min zatrzymać kimograf i przepozostawienie preparatu przez dłuższy czas w spoczynku i dodatkowe przemycie preparatu, aż będzie wykazywał wartości wyjściowe. Zazwyczaj następuje powrót preparatu do wartości wyjściowych, niekiedy jednak nie uzyskuje się zapisu wyjściowego i częstotliwość oraz amplituda skurczów utrzymują się w nowych, narzuconych wartościach.

6.3.2. Przedsionki świnki morskiej

Wymijamy serce świnki morskiej i umieszcujemy w oziębionym płynie McEvena. Krew delikatnie wyciskamy z serca, oddzielamy przedsionki, oczyszczamy z tkanki tłuszczowej i zawieszamy w roztworze McEvena o temp. 32°C, napowietzanego karbogenem. Skurcze oznaczamy w sposób podany powyżej.

6.4. TĘTNICA

6.4.1. Tętnica główna królika

Po zabiciu królika otwieramy klatkę piersiową. Odcinamy tętnicę możliwie jak najbliżej serca i przygotujemy na możliwie najdłuższym odcinku. Po wypreparowaniu przenosimy do naczynia zawierającego roztwór Krebsa i przecinamy spiralnie, aby uzyskać pasek szerokości 4 mm i długości 3–4 cm. Mocujemy nitkę do końca paska tętnicy i preparat zawieszamy w roztworze Krebsa o temp. 37°C wysycanym karbogenem. Łażnia powinna mieć objętość 10–15 ml. Jeden koniec paska tętnicy mocujemy do haczyka lub zaczepu rurki napowietrzającej łaźnię, drugi do pisaka lub do przekaźnika połączonego ze wzmacniaczem i aparaturą rejestrującą. Obciążenie pisaka powinno wynosić 3–4 g, a powiększenie powinno być 10-krotne. Okres adaptacji wynosi ok. 2 h. Ponieważ preparat reaguje powoli i powrót do wartości wyjściowych wymaga dłuższego czasu, zazwyczaj stosuje się długie cykle podawania. Lek pozostaje w łączności z tkanką 2 minuty lub dłużej, jeżeli pasek nadal się kurczy. Pozostawia się okres 8-minutowy pomiędzy kolejnymi wstrzyknięciami. Jeżeli się okres 8-minutowy pomiędzy kolejnymi wstrzyknięciami. Jeżeli spodziewany jest silniejszy efekt, to dłuższy czas, niekiedy nawet 30 min, może być niezbędny, aby pasek osiągnął pierwotną długość.

Jeżeli stosujemy przetwornik, to wystarczają mniejsze dawki leków stosowanych. Takie postępowanie zmniejsza przedziały czasowe pomiędzy wstrzyknięciami i znacznie skraca czas niezbędny dla przeprowadzenia doświadczenia [7].

6.4.2. Tętnica krezkowa przednia drobiu

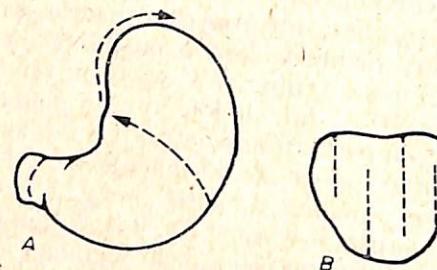
Mięsień podłużny przedniej tętnicy krezkowej drobiu znacznie się różni od mięśni gładkich tętnic oraz tętnicy głównej królika lub tętnicy szyjnej wspólnej owcy, ponieważ ma większą aktywność i zapewnia korzystniejsze procentowe zmiany długości. W przeciwieństwie do innych mięśni naczyniowych rozkurcza się pod wpływem noradrenaliny i silnie kurczy pod wpływem małych dawek acetylocholiny. Materiał uzyskujemy z ptactwa domowego w wieku 1–4 miesięcy.

Przygotujemy przednią tętnicę krezkową rozpoczętając od tętnicy głównej, aż do punktu znajdującego się poza odgałęzieniem naczyń jelicowych. Izolowany odcinek powinien mieć długość 3–7 cm. Po zanurzeniu do roztworu izotonicznego chlorku sodowego o temp. 41–42°C preparat mocujemy końcem bliższym tętnicy głównej do haczyka rurki napowietrzającej tak, aby wokół tętnicy przebiegły 2 elektrody pierścieniowe. Drażnimy nerwy zaopatrujące miesiąc podłużny przedniej tętnicy krezkowej przez stosowanie w cyklach 5–20 s impulsów prostokątnych o długości 0,5 ms, supramaksymalnej częstotliwości 10–20 Hz i napięciu 2–4 V przebiegającego pomiędzy elektrodami. Koniec dalszy tętnicy przy-

mocujemy do izotonicznego pisaka czołowego zapewniającego powiększenie 5–10-krotne. Obciążenie pisaka wynosi 1–2 g. Większość preparatów charakteryzuje napięcie (*tonus*) na początku doświadczenia. Takie preparaty kurczą się rytmicznie bez drażnienia prądem elektrycznym. Skurcze ustępują po pewnym czasie, gdy napięcie zmniejszy się. Zazwyczaj skurcze bez drażnienia prądem elektrycznym nie pojawiają się w paratach o niewielkim napięciu początkowym [2].

6.5. DNO ŻOŁĄDKA

Po zabiciu szczura wycinamy żołądek, otwieramy go wzdłuż krzywizny mniejszej, umieszczamy w naczyniu zawierającym płyn Krebsa i tniem na paski o długości 4–5 cm i szerokości 0,5 cm cięciami poprzecznymi (p. ryc. 6.4). Mocujemy nitkę do każdego końca i umieszczamy preparat



Ryc. 6.4. Dno żołądka szczura: A — odpreparowano żołądek i odcięto rózową częścią odźwie-
nikową od szarowej okolicy dna. Okolicę dna żołądka rozcięto wzduż krzywizny tak, aby uzyska-
ł plaski preparat. Wypłukano zawartość i preparat umieszczono w naczyniu zawierającym ro-
twór Krebsa. B — wykonano nacięcia tak, aby utworzył się pasek. Przyczepiono nitkę do każdego
końca paska i zamocowano na lażni wodnej.

w roztworze Krebsa o temp. 37°C wysyconym karbogenem. Łażnia powinna być dostatecznie długa (8–10 cm), ale wąska, tak aby objętość nie przekraczała 5–10 ml. Jeden odcinek preparatu mocujemy do haczyków rurki napowietrzającej łaźnię, drugi do pisaka czołowego. Zaleca się za stosowanie pisaka aukstotonicznego, tzn. kurczącego się odwrotnie proporcjonalnie do oporu, w którym obciążenie wzrasta w miarę skracania się mięśnia. Waga pisaka w pozycji poziomej wynosi zazwyczaj ok. 1 g i chociaż jego powiększenie może być 16-krotne, to jednak zaleca się, aby stosować powiększenie 5–7-krotne.

Mięsień żołądka nie rozkurcza się spontanicznie po skurczu wywołanym i dlatego trzeba ułatwić fazę rozkurczową przez dodatkowe obciążenie i g. Po zamocowaniu preparatu należy odczekać 30 min. Ponieważ miesiąc kurczy się powoli niezbędne jest zachowanie odpowiednich przedziałów czasowych: 0 min — uruchomić kimograf, 1 min — podać lek, $2\frac{1}{2}$ min — zatrzymać kimograf, przemyć preparat i założyć dodatkowe obciążenie pisaka, 6 min — usunąć dodatkowe obciążenie i uruchomić kimograf. Przedział czasu pomiędzy podaniem dawek wynosi 6 min. Niekiedy miesiąc rozkurcza się tylko po naciągnięciu, co bardzo utrudnia uzyskanie stałej linii zapisu. W takiej sytuacji nie należy obciążać preparatu przez $3\frac{1}{2}$ min, ale umożliwić dłuższy okres rozkurczu bez obciążenia, np. obciążyć preparat przez 2 min zachowując $5\frac{1}{2}$ -minutowy okres regeneracji (powrót do stanu wyjściowego). W takim układzie leki będącymi podawanymi co 10 min (p. tab. 6.1).

Tabela 6.1.
Przykłady stężeń leków badanych na narządach izolowanych

A. Jelito izolowane. Preparaty stosujemy w objętości 0,1 ml na łazienie o objętości 10 ml.

Acetylocholiny chlorek	1×10^{-6} mol/l
Epinefryny chlorowodorek	1×10^{-6} mol/l
Histaminy chlorowodorek	1×10^{-3} mol/l
Chlorek barowy	1×10^{-5} mol/l
Fenazoliny chlorowodorek	1×10^{-5} mol/l
Papaweryny chlorowodorek	1×10^{-5} mol/l
Nikotyna	1×10^{-3} mol/l
Tryptamina	1×10^{-4} mol/l

B. Pasek tętnicy głównej królika. Leki stosujemy w objętości 0,1–0,5 ml.

(–) Epinefryna	5×10^{-7} mol/l
(–) Lewarterenol	5×10^{-7} mol/l
(±) Izoprenalin	2×10^{-5} mol/l
5-Hydroksytryptamina	5×10^{-6} mol/l
Histamina	5×10^{-6} mol/l
Acetylocholiny chlorowodorek	2×10^{-4} mol/l
Oksytocyna	10 U/ml (ok. 2×10^{-5} mol/l); (1 mg = 500 U).

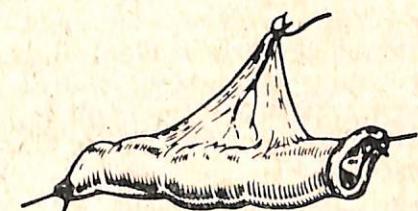
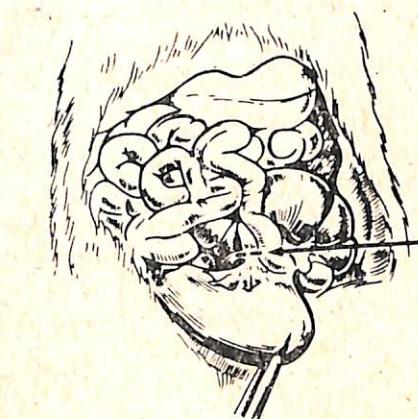
C. Paski żołądka. Leki stosujemy w objętości 0,1–0,2 ml.

5-Hydroksytryptamina	10^{-7} mol/l
Acetylocholiny chlorowodorek	10^{-6} mol/l

6.6. JELIT

6.6.1. Jelito cienkie świnie morskiej

Po zabiciu zwierzęcia otwieramy jamę brzuszną i unosimy jelito grube. Odnajdujemy jelito cienkie odbiegające ku tyłowi (p. ryc. 6.5). Preparujemy odcinek jelita i umieszczamy w naczyniu z płynem Tyrode'a. Zazwyczaj przewiązujemy nitką odcinek dodwunastniczy jelita cienkiego i preparowanie wykonujemy unosząc przewiązkę ku górze. Jelito raczej należy



Ryc. 6.5. Izolowane jelito kręte świnki morskiej. Otworzono jamę brzuszną. Jelito ślepe uniesiono ku górze, odnaleziono połączenie jelita krętego i grubego. W tym miejscu odcięto jelito kręte i przeniesiono do naczynia zawierającego roztwór Tyrode'a.

dotykać palcami niż pęsetą. Ostrożnie preparujemy krezkę. Odcinamy kolejne odcinki jelita o żądanej długości rozpoczynając od gruczołów Peyera. Izolowana tkanka powinna reagować na leki nawet w 2–3 h po zabiciu zwierzęcia. Jeżeli zwierzę było głodzone przez 24 h, to jelito może być użyte bezpośrednio po wypreparowaniu. W przeciwnym przypadku niezbędne jest usunięcie zawartości jelita. Przepłukujemy pipetą wypełnioną możliwie najmniejszą objętością płynu Tyrode'a pod bardzo małym ciśnieniem. Do płukania nie używamy strzykawki, aby nie uszkodzić tkanki w sposób nieodwracalny. Płukanie jelita można wykonać jedynie po całkowitym rozkurczaniu jelita przebywającego przez czas dostatecznie długi w płynie Tyrode'a w temp. 37°C. Rejestrujemy co najmniej 3 skurcze kontrolne o jednakowej wysokości i podajemy leki o działaniu agonistycznym lub antagonistycznym w stosunku do kontroli. Porównujemy wartości uzyskane z wartością kontrolną.

Metoda ta umożliwia ilościową oceną siły działania agonisty lub antagonistyczny zgodnie z proponowanym planem doświadczenia. Badanie to można przeprowadzać także na jelicie cienkim szczura lub innych zwierząt doświadczalnych.

6.6.2. Preparat Finklemana

Preparujemy odcinek jelita cienkiego królika razem z krezką. Nerwy zaopatrujące jelito przebiegają w krezce razem z naczyniami tężniczymi i mogą być łatwo wypreparowane. Odcinek długości 2–3 cm umieszczaemy w naczyniu 50 ml zawierającym płyn McEvena o temp. 37°C. Mocujemy jelito z każdego końca zwracając uwagę, aby światło jelita pozostało otwarte i zadziergniete nici nie zamknęły światła. Krezkę mocujemy na elektrodach połączonych ze stymulatorami wytwarzającymi impulsy prostokątne o długości trwania 0,5 ms (p. ryc. 6.1). Nerwy okołotętnicze drażnimy dwubiegową elektrodą platynową z częstotliwością 2–20 Hz. Jeżeli preparat jest bardzo świeży, to drażnienie z częstotliwością 2–4 Hz może wywołać działanie przywspółczulne. Drażnienie z częstotliwością 30–50 Hz wywołuje działanie współczulne, znikają ruchy wahadłowe i jelito rozkurcza się. Zazwyczaj stosuje się raczej silne bodźce o napięciu supramaksymalnym (ok. 10 V), ponieważ tkanka tłuszczowa krezki pełni rolę izolacyjną. Drażnienie nerwów krezkowych prowadzimy przez 30 s w odstępach co 4 min.

Okresy regeneracyjne mogą być dłuższe, jeżeli ruchy wahadłowe nie powróciły do stanu wyjściowego. Łażnia powinna mieć objętość nieco większą niż zazwyczaj stosowana dla jelita królika, aby zapewnić miejsce dla elektrod. Zazwyczaj objętość łaźni wynosi 25 ml. Po uzyskaniu co najmniej 3 wartości kontrolnych oceniamy siłę działania leku badanego porównując wysokość skurczów uzyskanych w stosunku do kontroli. Preparat ten jest szczególnie przydatny w ocenie leków adrenolitycznych [8, 6] (p. ryc. 6.6).

6.6.3. Jelito czece królika

Po zabiciu królika przygotowujemy odcinki jelita czeciego o długości 3–5 cm. Mocujemy jeden koniec odcinka jelita do lekkiego pisaka czołowego, drugi do wygiętej rurki zapewniającej dopływ powietrza. Preparat zanurzamy w świeżym roztworze Ringer-Locke'a o temp. 37°C. Preparat jest bardzo wrażliwy na temperaturę podwyższoną. Odcinek jelita zanurzony w płynie odżywczym, którego temperatura przekroczyła 40°C musi

być bezwzględnie odrzucony. Izolowane jelito czece królika jest często stosowanym preparatem dla oceny leków adrenolitycznych.

Posługujemy się tym preparatem również dla oceny leków spazmolitycznych o działaniu bezpośrednim. Wówczas po uzyskaniu 3 zapisów kontrolnych, po podaniu BaCl₂, podajemy lek o spodziewanym działaniu spazmolitycznym i ponownie podajemy taką samą dawkę BaCl₂. Oceniamy działanie leku spazmolitycznego przez porównanie z działaniem chlorowodorku papaweryny. Przykłady stężeń leków p. tab. 6.1.

6.6.4. Taśma okrężniczy

Taśmę okrężniczy świnki morskiej oddzielamy od jelita grubego. Preparaty o długości 2–3 cm (nie rozciągane) zawieszamy w płynie McEvena wysyczonego karbogenem w łaźni o pojemności 10 ml, w temp. 37°C.

Odpowiedzi rejestrujemy za pomocą izotonickiego pisaka czołowego zapewniającego powiększenie 6-krotne i obciążenie 1 g. Skurcze taśmy okrężniczy świnki morskiej wywołane przez acetylocholinę są związane z pobudzeniem receptora muskarynowego mięśni gładkich. Preparat może być stosowany do oceny leków cholinomimetycznych lub blokujących zwoje o działaniu niedepolaryzującym. Leki o działaniu agonistycznym podajemy w objętości 0,1–0,5 ml pozostawiając je w łaźni z tkanką badaną przez 30–60 s. Preparat przemywamy zapewniając przepływ płynu odżywczego przez 10 s. Pomiędzy podaniem 2 dawek agonistów musi upływać co najmniej 4 min. Lek o działaniu antagonistycznym podajemy bezpośrednio po każdorazowym wypłukaniu agonisty. Jeżeli stosujemy drażnie śródścienne, to przeprowadzamy dolny odcinek taśmy okrężniczy pomiędzy dwubiegowymi elektrodami w sposób nie zakłócający ruchliwości jelita. Częstość impulsów waha się 1–100 Hz, długość trwania impulsu wynosi 0,1 ms. Stosujemy napięcie supramaksymalne, w ciągu 10–40 s z przerwą co najmniej 3 minutową pomiędzy drażnieniami. Ponieważ taśmę okrężniczy charakteryzuje dość znaczne zmiany napięcia, krzywa dawka-odpowiedź dla agonisty należy zmodyfikować przez wprowadzenie zmian napięcia [według 11]. Dla ustalenia związku pomiędzy napięciem preparatu i wysokością skurczów uzyskanych po podaniu pojedynczych dawek acetylocholiny należy wykonać kilka doświadczeń kolejnych, w których różne stężenia acetylocholiny są oznaczane kilkakrotnie. Przekonamy się wówczas, że nachylenie krzywej logarytmicznej stężenie-dawka jest odwrotnie proporcjonalne do napięcia.

Zależność pomiędzy zmianą napięcia taśmy okrężniczy i podawanymi dawkami acetylocholiny określa równanie:

$$Y_B = Y_A + kd \quad (1)$$

gdzie: Y_B , Y_A — największe wartości odpowiedzi po podaniu acetylocholiny odpowiednio przy mniejszej (B) i większej (A) wartościach napięcia taśmy okrężniczy,

k — stały współczynnik korelacji,

d — różnica poziomu napięcia pomiędzy umiejscowieniem pisaka w różnych okresach podawania acetylocholiny (cm) [16]

6.6.5. Jelito grube szczura

Szczury obydwu płci wykrwawiamy z tężnic szyjnych. Preparujemy pierwsze 3 cm części wstępującej jelita grubego. Odcinek ten zawieszamy w łaźni wodnej pojemności 10 ml zawierającej roztwór Krebsa, wysycony karbogenem. Obciążenie pisaka wynosi 2 g. Skurcze powiększamy 18-krot-

nie za pomocą pisaka czołowego lub przetwornika. Do roztworu podajemy $1,9 \times 10^{-6}$ mol/l chlorowodorku propranololu, tzn. 0,6 µg/ml, ponieważ ten zmniejsza dużą aktywność samoistną jelita grubego nieznacznie tylko zmniejszając aktywność po podaniu angiotensyny.

Jelito grube szczura jest bardzo wrażliwe na skurczowe działanie angiotensyny, ale mało wrażliwe na serotoninę i bradykininę [18]. Angiotensynę podajemy w objętości 0,1–0,3 ml zachowując co najmniej 6-minutowe przedziały czasowe pomiędzy podaniami. Peptyd powinien pozostać w łączności z tkanką ponad 60 s. Po każdym podaniu angiotensyny, która zazwyczaj kurczy jelito grube szczura, należy dwukrotnie przemyć preparat i ponownie zarejestrować wyjściowa linie zapisu.

Preparat jelita grubego szczura przydatny jest w badaniach nad inhibitorami angiotensyny [18].

6.7. MACICA

Izolowany preparat macicy jest przydatny do oceny działania oksytocyny, prostaglandyn lub innych leków kurczących macicę. Doświadczenia te przeprowadzamy w czasie cyklu rujowego samicy szczura lub świnki morskiej, co ustalamy oglądając pod mikroskopem pobrany piętno wymaz z pochwy.

6.7.1. Macica szczura

Macicę pobrać od dziewiczej samicy, której poprzedniego dnia podano 0,1 mg/kg stylbestrolu. Róg macicy o długości 2 cm zawieszamy w łaźni pojemności 5 ml, zawierającej płyn Jalona o temp. 30°C. Po dodaniu leku kurczącego macicę rejestrujemy skurcze posługując się izotonicznym pisakiem czołowym o powiększeniu 4-krotnym. Wykreślamy krzywa dawka-odpowiedź dla acetylocholiny, oksytocyny i 5-hydroksytryptaminy. Jeżeli krzywe dawka-odpowiedź dla oksytocyny i 5-hydroksytryptaminy są równolegle do krzywej dla acetylocholiny, to wówczas można określić aktywność oksytocyny i 5-hydroksytryptaminy względem acetylocholiny posługując się metodą oceny 3-punktowej [13]. Metoda ta polega na interpolacji funkcji liniowej określonej parametrami (x , y) dla dwóch dawek standardowych i wyznaczenia trzeciej dawki poszukiwanej lub równo-ważnej.

6.7.2. Macica świniki morskie

Po wypreparowaniu odcinamy podłużny pasek z każdego rogu macicy i zawieszamy w łazni pojemności 10 ml zawierającej natleniony płyn Tyrode'a o temp. 39°C. Preparat podwieszamy do pisaka zapewniającego 10-krotne powiększenie lub rejestrujemy za pomocą przetwornika. Po umocowaniu preparatu czekamy co najmniej 1,5 h dla uzyskania rytmicznych skurczów.

Jeżeli nie podajemy stylbestrolu dnia diestru, R.

Jeżeli nie podajemy stylbestrolu, to badania te wykonujemy w pierwszym dniu diestrus. Preparat izolowanej macicy umożliwia ocenę działania oksytocyny przez porównanie wysokości skurczów preparatu standardowego, np. Oxytocin (Pitocin-Parke Davis) z preparatem testowanym. Oksytocynę podajemy we wzrastających stężeniach 2×10^{-7} - 2×10^{-2} mol/l, tzn. 200 ng/ml-200 µm/ml. Możemy również porównywać siłę działania skurczu macicy preparatu testowanego w porównaniu z winianem ergo-

taminy podawanym do łazieni we wzrastających stężeniach rozpoczynając od 5×10^{-8} g/ml [14].

Według oceny autora metoda macicy świniki morskiej jest bardziej godna polecenia.

6.3. POWRÓZEK NASIENNY

6.8.1. Powrózek nasienny myszy

Po zabiciu samca myszy białej wagi 30–35 g przygotujemy obydwa powrózki nasienne w miejscu połączenia z pęcherzykiem nasiennym. Powrózki nasienne ostrożnie oddzielamy od otaczającej tkanki tłuszczowej, tkanki łącznej i naczyń krwionośnych i potem łagodnie ściskamy w celu usunięcia nasienia. Objętość łaźni wodnej powinna wynosić 3 ml. Skurcze podłużne oznaczamy przez przyczepienie do górnego końca preparatu lekkiej sprężyny połączonej z pisakiem izometrycznym lub przetwornikiem. Preparat umieszczamy w zmodyfikowanym płynie Krebsa wysyconym karbogenem zawierającym kwas askorbowy (0,1 mol/l) oraz sól sodową kwasu werzenowego (0,027 mol/l). Pojedynczy preparat obciążamy 100–150 mg, preparaty wielokrotne obciążamy 200–300 mg. Nerwy śródścienne drażnimy prądami prostokątnymi o częstotliwości 0,1–0,2 Hz, długości trwania impulsu 0,1–1 ms i napięciu supramaksymalnym przechodzącym pomiędzy zakończeniami elektrod platynowych u dołu preparatu oraz pierścienia o średnicy 10 mm, sporządzonego z folii platynowej umieszczonego w górnej części łaźni.

Badania tego typu umożliwiają ocenę leków o spodziewanym działaniu agonistycznym lub antagonistycznym w stosunku do receptora opiatowego [10]. Sposób oceny działania leków badanych metodą skurczów izolowanego powrózka nasiennego polega na ustaleniu wartości kontrolnej po 3 jednakowych skurczach i porównaniu wysokości skurczu po podaniu leku badanego w stosunku do uprzednio ustalonej kontroli.

6.8.2 Powrózkek pasienny świniki morskiej (preparat Hukoviča)

Powrózek nasienny wyjmujemy z zabitych samców świniki morskiej i umieszczamy w łaźni wodnej w temp. 31°C w natlenionym płynie Krebsa. Skurcze powrózka nasiennego wywołujemy drażniąc nerw podbrzuszny lub też stosując drażnienie śródścienne zakończeń adrenergicznych. Nerw podbrzuszny drażnimy bodźcami prostokątnymi o napięciu 2–3 V, długości trwania impulsu 2 ms i częstotliwości 80 Hz. Pozazwojowe włókna adrenergiczne (drażnienie śródścienne) drażnimy bodźcami o supramaksymalnym napięciu 40–60 V, częstotliwości 30 Hz, nie przekraczając długości trwania impulsu 0,1 ms. Można również stosować wyłącznie drażnienie śródścienne bodźcami o częstotliwości 20, 30, 50 Hz. Badania tego typu umożliwiają ocenę leków o spodziewanym działaniu agonistycznym lub antagonistycznym w stosunku do receptora adrenergicznego.

Leki o spodziewanym działaniu antagonistycznym (adrenolitycznym) podajemy dootrzewnowo na 24 h przed rozpoczęciem doświadczenia w dawkach uzależnionych od ich aktywności w stosunku do guanetydyny. Dawka 20 mg/kg guanetydyny i.p. niemal całkowicie blokuje skurcze zarówno po drażnieniu przedwojennym, jak i pozazwojowym (śródściennym) [12].

Metoda modyfikowana polega na umieszczeniu wyizolowanego powrozka samca świniki morskiej w naczyniu o pojemności 5 ml, w natlenionym

płynie Tyrode'a i temp. 37°C. Drażnienie śródścienne za pomocą 2 pionowych elektrod platynowych: 1 bodziec/min, czas trwania drażnienia 3 s, czas trwania bodźca prostokątnego 1,5 ms, 12 V, 3–8 Hz. [22].

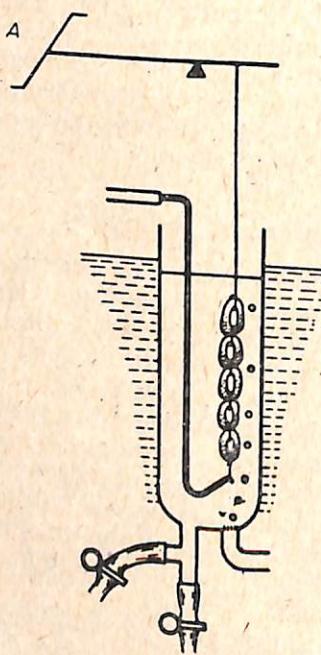
6.8.3. Powrózkek nasienny szczura

Powrózkek nasienny szczura wyjmujemy z zabitych samców szczura i umieszczamy w łaźni wodnej w temp. 37°C w natlenionym płynie Krebsa. Okres adaptacji wynosi 20–30 min. Rejestrujemy skurcze powrózków stosując drażnienie śródścienne. W tym celu stosujemy bodźce o supramaksymalnym napięciu, częstotliwości 0,1–0,2 Hz, nie przekraczając długości trwania impulsu 0,1–1,0 ms. Badania tego typu umożliwiają ocenę leków o spodziewanym działaniu agonistycznym lub antagonistycznym w stosunku do receptora opiatowego.

Ta metoda jest szczególnie przydatna w ocenie działania endogennych związków morfinopodobnych (endorfin) [20].

6.9. TCHAWICA

Działanie leków rozszerzających oskrzela oceniamy rejestrując skurcze łańucha składającego się z pierścieni tchawicy świnki morskiej. Ponieważ mięsień pierścieniowy tchawicy jest bardzo krótki w metodzie oryginalnej [4] łączono 5–6 pierścieni w łańcuch. Jednakże zaciśnięcie mięśni pierścieniowych tchawicy zmniejsza ich reaktywność o $\frac{1}{3}$. Modyfikacja metody



Ryc. 6.7. Izolowane pierścienie tchawicy świnki morskiej. A — odcinek tchawicy przeniesiono do naczynia zawierającego roztwór Krebsa. B — wyizolowane pierścienie połączono w łańcuch. Mięsień międzychrzastkowy umieszczono naprzemienne. łańcuch składający się z 5–6 pierścieni umieszczono w łaźni. Roztwór Krebsa o temp. 37°C wysycony karbogenem. C — zapis skurczów po histaminie.

[1] polega na przecięciu pierścieni tchawicy, oczyszczeniu ich z tkanki chrzęstnej oraz na połączeniu ich jak na rycinie 6.7. Modyfikacja ta zapewnia wystarczająco dobre zapisy po połączeniu 3 pierścieni, zazwyczaj 3 razy silniejsze niż w metodzie oryginalnej.

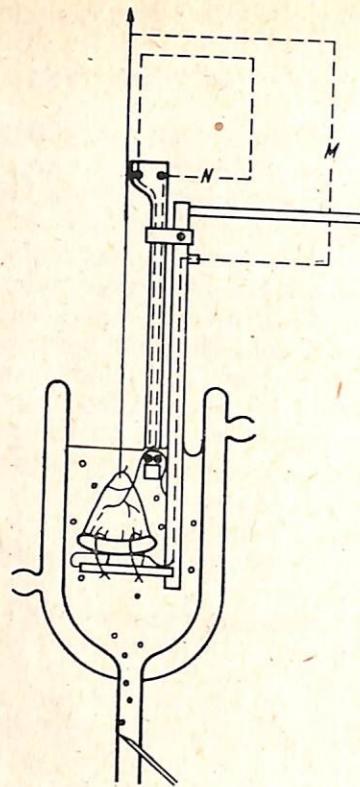
W badaniach posługujemy się nie tylko pierścieniami tchawicy świnki morskiej, lecz również kota, psa, królika lub szczura. Zwracamy uwagę, że przyczepymięśniowe znajdują się na zewnętrznej powierzchni chrząstki tchawicy psa, kota i królika oraz na wewnętrznej powierzchni chrząstki tchawicy pobranej od świnki morskiej i szczura. Izolowane pierścienie tchawicy zawieszamy w łaźni wypełnionej płynem Krebsa wysyconym karbogenem o temp. 37°C. Skurcze mechaniczne rejestrujemy za pomocą pisaka izotonicznego. Ponieważ łańcuch pierścieni tchawicy ma bardzo małe napięcie (*tonus*) możemy go zwiększyć przez dodanie acetylocholiny do płynu odżywczego w stężeniu 1 µm/ml. Według tej modyfikacji [18], łączymy 3 pierścienie o szerokości ok. 3 mm wyparowane z tchawicy kota. Po ich związaniu utworzony łańcuch zanurzamy w łaźni z natlenionym płynem Krebsa o temp. 37°C i obciążamy pisak odważnikiem o masie 0,5 g. Leki rozkurczające błonęmięśniową oskrzeli podajemy przed lub podczas trwania działania acetylocholiny. Jeżeli dysponujemy przetwornikiem o odpowiedniej czułości i aparaturą rejestrującą, to możemy uzyskać skurcze posługując się tylko jednym pierścieniem tchawicy kota bez dodawania acetylocholiny do płynu odżywczego.

6.10. PRZEPONA

Izolowana przepona szczura jest często stosowana w badaniu leków hamujących przekaźnictwo nerwowo-mięśniowe. Preparat ten zapewnia pewne korzyści w stosunku do preparatu nerw kulszowy — mięsień trójkątny łydki ponieważ jest znacznie cieńszy i lek względnie szybko dyfunduje przez cały mięsień. Przed rozpoczęciem doświadczenia sprawdzamy czy nerw i mięsień są umocowane w sposób właściwy. Część środkową przyczepu ścięgnistego przymocujemy do przekaźnika za pomocą cienkiego drutu z nierdzewnej stali, który równocześnie służy jako elektroda do bezpośredniego drażnienia mięśnia (p. ryc. 6.8).

Drut platynowy przymocowujemy do ramienia poziomego elektrody. Generator impulsów prostokątnych powinien mieć co najmniej 2 wyjścia. Mięsień drażnimy bezpośrednio bodźcami prostokątnymi, długość trwania impulsu 0,1 ms, napięcie zwykle 40 V, częstotliwość bodźcowania 100 Hz.

Nerw drażnimy bodźcami trwającymi 0,1 ms, o napięciu zwykle 2–3 V i częstotliwości 0,5–2 Hz. Zwracamy uwagę, aby wyłączyć drażnienie podczas przepłukiwania preparatu, ponieważ nastąpić może nieodwracalne uszkodzenie przepony. Izolowaną przeponę umieszczamy w łaźni o pojemności 50 ml wypełnionej płynem Tyrode'a o temp. 34°C, wysyconym karbogenem. Preparat ustawiamy tak, aby poziom płynu odżywczego znajdował się 0,5 cm powyżej mięśnia i elektrod. Preparat ten umożliwia ocenę leków zwiadczających o działaniu konkurencyjnym z acetylocholiną oraz o działaniu depolaryzującym. Bardzo ważne jest wypełnienie płynu odżywczego po zakończeniu ustawiania preparatu. Następnie drażnimy przeponę pośrednio, poprzez nerw, aby uzyskać skurcze zbliżone do maksymalnych. Potem zwiększamy napięcie dwukrotnie i kontynuujemy drażnienie dopóki odpowiedzi będą umiarkowanie stabilne. Zanim rozpocznijemy testowanie leków należy ustalić wartości kontrolne. Podobnie postępujemy w celu ustalenia wartości kontrolnych po bezpośrednim (mięśniowym)



Ryc. 6.8. Izolowany preparat przepony:
N — drażnienie poprzez nerw (pośrednie), M — drażnienie przez mięsień (bezpośrednie). Strzałka skierowana ku górze oznacza opisane w tekście połączenie do przekaźnika elektromagnetycznego.

pobudzaniu mięśnia przepony. Oceniamy badane leki na podstawie określenia zmniejszenia wartości kontrolnych oznaczanych wobec leku związczającego. Np. dodanie D-tubokuraryny w stężeniu końcowym z 4×10^{-6} mol/l zmniejsza kurczliwość mięśnia przepony po drażnięciu bezpośrednim (mięśniowym) o 25% w stosunku do kontroli [3].

6.11. OZNACZANIE pA_x WEDŁUG SCHILDA

Badanie ma na celu oznaczenie zależności pomiędzy siłą działania agonisty i antagonisty. Badanie to przeprowadzamy na jelcie krętym świnie morskiej lub jelcie czczym szczura. Jelito czcze szczura jest bardziej wrażliwe na związki o działaniu muskarynowym, mniej na związki o działaniu nikotynowym [21]. Doświadczenie wykonujemy w łaźni dla narządów izolowanych o pojemności 10 ml przy użyciu napełnionego płynu Tyrode'a o temp. 37°C. Skurczes odcinków jelita krętego świnie morskiej lub jelita czczego szczura o długości 2 cm rejestrujemy przy pomocy izotonicznej dźwigni o obciążeniu 1 g zapewniającej 10-krotne powiększenie.

Zazwyczaj przyjmujemy $x = 2$, wówczas $pA_x = pA_2$. Wartość ta równa jest ujemnemu logarytmowi takiego stężenia molalnego antagonisty (związku badanego), które powoduje zmniejszenie reakcji standardowej wywołanej danym stężeniem agonisty do reakcji wywołanej dwa razy mniejszym stężeniem agonisty [19]. Początkowo podajemy zestaw zwiększających się stężeń agonisty w układzie półlogarytmicznym, które dają odpowiedź liniową, aż do osiągnięcia stałej submaksymalnej reakcji

skurczowej (10 do 20 skurczów). Następnie podajemy dwa razy większe stężenie agonisty w obecności antagonisty i powtarzamy tę czynność 5-krotnie. Czas kontaktu antagonisty z jelitem wynosi 2 min, czas przerwy pomiędzy podaniami agonisty — 5 min.

Stężenie antagonisty dobieramy w ten sposób, aby skurcze wywołane podwójnym stężeniem agonisty były hamowane w przedziale 20–80% wartości standardowej. Używamy świeżego odcinka jelita tego samego zwierzęcia dla każdego nowego stężenia antagonisty. Wartość pA_2 oznaczamy metodą graficzną. Wyznaczamy na papierze milimetrowym układ współrzędnych, na osi rzędnych wyznaczamy reakcję (skurcz jelita w milimetrach), na osi odciętych nałożone na siebie skale: ujemne logarytmmy ze stężeniem agonisty (g/ml) i antagonisty (stężenia molalne). Po wykreśleniu liniowej zależności od stężenia standardowego agonisty i różnych molalnych stężeń antagonisty wyznaczamy wartość pA_2 . Zastosowanie metody do badania substancji wpływających na układ cholinergiczny oraz interpretacja wyników podane są na str. 237.

Piśmiennictwo

1. Akcasu A.: Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 122, 201, 1959. 2. Bolton T. B.: J. Physiol., Lond. 196, 273, 1968. 3. Bülbbring E.: Brit. J. Pharmacol., 1, 38, 1946. 4. Casillo J. C., Beer E. J.: J. Pharmac. exp. Ther., 90, 104, 1947. 5. Ellit D. E., Reil E.: Brit. J. Pharmacol., 35, 132, 1969. 6. Finkleman B.: J. Physiol. Lond., 70, 145, 1930. 7. Furchtgott R. T., Bhadra-kom S.: J. Pharmacol. exp. Ther., 108, 129, 1953. 8. Gerkens J. F., McCulloch M. W., Wilson J.: Brit. J. Pharmacol., 35, 563, 1969. 9. Gryglewski R., Vane J. R.: Brit. J. Pharmacol., 39, 573, 1970. 10. Henderson G., Hughe S. J., Kosterlitz H. W.: Brit. J. Pharmacol., 46, 764, 1972. 11. Hobbiger F., Mitchelson F., Rand M. J.: Brit. J. Pharmacol., 36, 53, 1969. 12. Huković S.: Brit. J. Pharmacol., 16, 188, 1969. 13. Khan Y., Ahmed N.: Brit. J. Pharmacol., 35, 332, 1969. 14. Knifton A.: J. Pharm. Pharmacol., 42, 17, 1962. 15. Lembeck F., Winne D.: Pharmacologicals Practicum, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 16. Mitchelson F.: Brit. J. Pharmacol., 42, 43, 1971. 17. Parral L. R., Wilson E.: Brit. J. Pharmacol., 43, 612, 1971. 18. Regali D., Vane J.: Brit. Pharmacol. Chemotherap., 23, 351, 1964. 19. Schild H. O.: Brit. J. Pharmacol., 2, 189, 1947. 20. Schulz R. i wsp.: Life Science, 24, 843, 1979. 21. Van Rossum J. M., Ariens E. J.: Arch. int. Pharmacodyn., 118, 418, 1959. 22. Zelter G. i wsp.: Arch. int. Pharmacodyn. 238, 28, 1979. —