The Gold Standard in Chronic Physiologic Monitoring

iPRECIOマイクロインフュージョンポンプを用いた、 より少ない用量での5-HT(セロトニン)投与による血圧降下作用の発見

Michigan State University, East Lansing MI

Robert Patrick Davis, Gregory D. Fink, Bridget Seitz, Stephanie Watts

要約 /Summary

慢性的なセロトニン(5-ヒドロキシトリプタミン; 5-HT)注入は、持続的 な血圧(BP)の低下を引き起こします。この研究室では以前に、SD (Sprague Dawley)ラットで7日間、浸透圧ポンプを経て投与される 連続皮下注入法を用い、5-HTの降圧作用を検討しています。 我々は、5-HTの投与量増加が、血圧の、より大きな減少に帰着する と仮定しました。5-HTまたは賦形剤(Vehicle)を、最初、一定の速度 で48時間、iPRECIOポンプを介して皮下注入(s.c.: subcutaneous injection)投与し、その後、48時間投与を停止した後、最終的に 45mg/kg/分まで段階的に高めたドーズ量を投与しました。 平均動脈圧は、DSIラジオテレメトリーでモニターしました。 本実験では、以前採用したよりもより少ない5-HT(セロトニン)投与 量で、SD(Sprague Dawley)ラットにおける降圧効果が誘発される ことが証明されました。更なる実験が進行中です。

序論 /Introduction

セロトニン(5-ヒドロキシトリプタミン、5-HT)は、消化管の腸クロム親和 性細胞と中枢神経系の縫線核によって主に合成される血管作用性 アミンです。5-HT(セロトニン)は、血管平滑筋の強力な収縮薬と言わ れ、能動的にセロトニン輸送体(SERT)によって受け入れられ、 細胞内のモノアミン酸化酵素(MAO:monoamine oxidase)によって、 不活性代謝産物(5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA))へと、急速 に代謝されます。セロトニン輸送体(SERT)は、血小板、内皮細胞と 平滑筋細胞に存在します。(1)

高血圧と5-HT(セロトニン)の関係を示唆する研究結果があります。 これらの研究では、正常血圧のヒト・動物コントロールと比較し、 高血圧のヒト・動物両モデルにおいて、血漿遊離5-HTの上昇が示唆 され(2-3)、5-HT受容体拮抗剤が、選択された高血圧モデル動物に おいて血圧を降下させることを示唆しています(4).

高血圧動物の動脈は5-HTの収縮剤作用に異常に強い反応を示し、 そして、選択的な5-HT再取込み抑制因子は血圧を上昇させます(5-7)。 この証拠にもかかわらず、最近の知見では、5-HTには、雄の酢酸デオ キシコルチコステロン(DOCA)-塩高血圧性と正常血圧性(Sham)の ラットにおいて、血圧を下げる驚くべき能力があることを証明しています。(8) 本研究は、5-HT送達率の増加が、SD(Sprague Dawley)ラットの 血圧を、段階的により減少させる結果に帰着するかどうかについて 調査しようと試みました。

材料と方法 /Materials and Methods

[テレメトリー]

イソフルラン麻酔下で、雄のSD(Sprague Dawley)ラット左鼡径部 領域の1-1.5cmの切開を通じて、ラジオ・テレメトリー・デバイス(Data Sciences International, St. Paul, MN)を皮下に埋込みました。 テレメトリー・デバイスのカテーテルを、腹膜壁から3-5mm遠位の 左大腿動脈より導入し、先端のセンサー部を腹部大動脈へ進め ました。ラットは、手術後3-4日の回復期間を経て、3-4日のベース ライン測定を行いました。実験期間全体を通じて、平均動脈圧 (MAP)と心拍数(HR)を記録しました。ラットは、腹腔内ペント バルビタールナトリウム(60mg/kg)を使用して安楽死させ、 心臓穿刺によって全血を収集しました。胸部大動脈、頸動脈、 頸静脈と胸部大静脈を、基礎的な5-HT測定のために取り出しました。

[iPRECIOマイクロインフュージョンポンプ]

類似した麻酔方式を使用した第2の手術中に、iPRECIOポンプ (Primetech、Tokyo Japan)を、頸部の基底に作成した小さな切開 を通して埋込みました。鈍的剥離を用い、肩甲骨の間に小さな皮下 ポケットを作成(図3)しました。ポンプを挿入し、切開した皮膚を閉じて 縫合しました。回復後、5-HTまたは賦形剤を、各ポンプにロードしま した。5-HT溶液は、percreatinine complexと1%アスコルビン酸 (抗酸化剤(0.02g/ポンプ))を用い、各時点で二つの方法 - ANOVA分析と事後検定によって評価しました。溶液は1N HCI で溶かし、pHバランス(~7)を4N NaOHで調整しました。





Case Study: iPRECIO-5HT 投与

The Gold Standard in Chronic Physiologic Monitoring



図1:

酢酸デオキシコルチコステロン(DOCA)-塩高血圧性ラット(3n:赤線) とシャム正常血圧性ラット(5n:黒線)における、慢性的な5-HT投与の 心拍数(HR)への影響 C=control、S=infusion



iPrecio Study Data: Blood Pressure

図2:

酢酸デオキシコルチコステロン(DOCA)-塩高血圧性ラット(3n:赤線) とシャム正常血圧性ラット(5n:黒線)における、慢性的な5-HT投与の 平均血圧(MAP)への影響 C=control、S=infusion

結果 /Results

iPRECIOマイクロ・インフュージョンポンプは、我々の研究室に、 5-HTの増加させた投与量を、単一・覚醒下・自由活動下動物に 投与する作用を調査するための革新的なツールを提供しました。 我々は、以前の用量と比較し、SD(Sprague Dawley)ラットに対する 5-HTの増加させた用量を投与することにより、血圧は、次第により 大きく減少する結果に帰着することを仮定しました。 この実験では、増加させた5-HTが血圧を次第に降下させることはなく、 SD(Sprague Dawley)ラットにおいて降圧作用を誘発するには、 より少ない用量の5-HTでよいことが証明されました。(図1・2) これらの知見から、将来の実験では、より少ない用量でよいこと、 特に特定の5-HT作用薬(アゴニスト)に焦点を定めた実験にとって 意味があることが示唆されます。

討論 /Discussion

この研究室は、5-HTに対する用量反応の代わりに、同じ価値の効果 を、以前行った時よりも、より少ない用量で成し遂げることが可能で あることを発見しました。この発見は、自由活動下モデルにおいては、 既存の技術では不可能でした。

iPRECIOは、既存のインフュージョン方法からの技術的な進歩である ことが証明されたと共に、この研究室が、生理学的な検索能力と動物 福祉を向上させる一方で、化合物・労働・経費を節約させる意思 決定を前進させることを可能にしました。この研究室はiPRECIO ポンプの性能に満足して、更なる実験でこの製品を使用する計画です。

Programmable Infusion Pump

2012.07 (rev01)

1. Ni, W. et al. The Serotonin Transporter is Present and Functional in Peripheral Arterial Smooth Muscle. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2004. 43: 770-781.

- 2. B. Brenner, J.T. Harney, B.A. Ahmed, B.C. Jeffus, R. Unal, J.L. Mehta, and F. Kilic. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. J Neurochem.
- (2007) 102: 206-215.
- 3. Carrasco G, Cruz MA, Gallardo V, Miguel P, Lagos M, and Gonzalez C (1998) Plasma and platelet concentration and platelet uptake of serotonin in normotensive and preeclamptic pregnan cies. Life Sci 62: 1323-1332.
- 4. Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, Kilic F (2007) Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. J Neurochem 102: 206-215.
- 5. Watts SW and Fink G (1999) 5-HT2B-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 276: 944-952.
- 6. Watts SW (2005) 5-HT in systemic hypertension; foe, friend or fantasy? Clin Sci 108: 399-412.
- 7. Amsterdam JD, Garcia-Espana F, Fawcett J, Quitkin FM, Reimherr FW, Rosenbaum JF, and Beasley C (1999) Blood pressure changes during short-term fluoxetine treatment. J Clin Psycho pharm 19: 9-14.
- 8. Diaz, J. Ni, W. Thompson, J, King A, Fink G, Watts SW. (2008) 5-hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. JPET. 325: 1031-1038



●お問合せ先(iPRECIO総発売元・DataSciences社日本総代理店):

プライムテップ **株式会社** 東京都文京区小石川 1-3-25 小石川大国ビル9F (東京)Phone:03-3816-0851 (大阪)06-6310-8077 www.primetech.co.jp infusion@primetech.co.jp

Case Study

iPRECIO[®]– 5-HT Administration

DSI

тм

Michigan State University, East Lansing MI Robert Patrick Davis, Gregory D. Fink, Bridget Seitz, Stephanie Watts

<u>Summary</u>: Chronic serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) infusion causes a prolonged fall in blood pressure (BP). This lab previously studied the hypotensive effects of 5-HT using a continuous subcutaneous infusion administered via osmotic pump for 7 days in the Sprague Dawley rat (S.D.). We hypothesized that increasing delivery rates of 5-HT would result in greater reductions in BP. 5-HT or Vehicle (Veh) was administered s.c. via the iPrecio[®] micro infusion pump for 48 hrs at an initial constant rate, stopped for 48 hrs and then delivered in escalated dosages to a final rate of 45mg/kg/min. Mean arterial BP was monitored with DSI radiotelemetry. This study demonstrated that a smaller rate of 5-HT than previously employed elicits a hypotensive effect in the S.D. rats. Further study is ongoing.

Introduction

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is a vasoactive amine synthesized mainly by enterochromaffin cells of the gastrointestinal tract and raphe nucleus in the CNS. Initially described as a potent vasoconstrictor of smooth muscle, 5-HT is actively taken up by the serotonin transporter (SERT) and rapidly metabolized to the inactive metabolite, 5-hydroxyindole acetic acid (5-HIAA), by intracellular monoamine oxidase (MAO). SERT is present in platelets, endothelial cells, and smooth muscle cells⁽¹⁾.

Several lines of evidence suggest an association between hypertension and 5-HT. Studies show elevated free plasma 5-HT in both human and animal models of hypertension compared to normotensive human and animal controls⁽²⁻³⁾ and 5-HT receptor antagonists lower blood pressure in select animal models of hypertension⁽⁴⁾. Arteries of hypertensive animals are hyperresponsive to the constrictor effects of 5-HT, and selective 5-HT reuptake inhibitors elevate blood pressure⁽⁵⁻⁷⁾.

Despite this evidence, recent findings demonstrate that 5-HT has the surprising ability to lower blood pressure in the male deoxycorticosterone acetate (DOCA)-salt hypertensive and normotensive (sham) rat⁽⁸⁾. This study sought to investigate whether increasing delivery rates of 5-HT would result in a progressively greater reduction in blood pressure in the Sprague Dawley rat.



Materials and Methods

Telemetry:

Under isoflurane anesthesia, radiotelemetery devices (Data Sciences International, St. Paul, MN) were implanted subcutaneously through a 1-1.5 cm incision in the left inguinal area of male Sprague Dawley rats. Catheters were introduced into the left femoral artery 3-5 mm distal to the level of the peritoneal wall, and the tip was advanced to the abdominal aorta. The rats were allowed 3-4 days to recover post-operatively, and then 3 -4 days of baseline measurements were made. Mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded throughout the duration of the study. Rats were euthanized using intraperitoneal sodium pentobarbital (60 mg/kg), and whole blood collected *via* cardiac puncture. Thoracic aorta, carotid arteries, jugular veins, and





Case Study

thoracic vena cava were harvested for basal 5-HT measurements.

iPRECIO[®] micro infusion pump:

During a second surgery using a similar anesthetic regimen, the iPRECIO[®] pump (Primetech, Tokyo Japan) was implanted through a small incision made at the base of the neck. Using blunt dissection a small subcutaneous pocket between the scapulae was created. (Figure 3) The pump was inserted and the skin sutured closed. Post recovery 5-HT or vehicle was loaded on each pump. The 5-HT solution was assessed by a two-way mixed design ANOVA and post-hoc testing at each time point with percreatinine complex and 1% ascorbic acid, antioxidant (0.02 g/pump). The solution was dissolved in 1N HCl, and a pH-balance (~7) is achieved with 4N NaOH.





Results

The iPrecio® micro infusion pump offered our laboratory an innovative tool to investigate the effects of delivering increasing doses of 5-HT to a single, conscious, freely moving, animal. We hypothesized that delivery of increasing doses of 5-HT to the S.D. rat would result in progressively greater reductions in BP when compared to the previous dose(s). This study demonstrated that increasing 5-HT did not progressively lower BP and that a smaller dose of 5-HT is required to elicit a hypotensive effect in the S.D. rats. (Figure 1& 2) These findings suggest that future experiments can be conducted at a lower dose, and is particularly relevant to studies focused on specific 5-HT agonists.

Discussion

This lab did discover that instead of a dose response to 5-HT, we were able to achieve an equivalent effect at a much lower dose then had been previously studied. This discovery would not have been possible in a fully ambulatory model with existing technology.

The iPRECIO[®] proved to be a technologic advancement from existing infusion methods and enabled this lab to make decisions moving forward that will save compound, labor and money while increasing physiologic relevance and overall animal welfare. This lab is pleased with the performance of the iPRECIO[®] pump and intends to use this product in further study.

- 1. Ni, W. et al. The Serotonin Transporter is Present and Functional in Peripheral Arterial Smooth Muscle. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 2004. 43: 770-781.
- 2. B. Brenner, J.T. Harney, B.A. Ahmed, B.C. Jeffus, R. Unal, J.L. Mehta, and F. Kilic. Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. J Neurochem. (2007) 102: 206-215.
- 3. Carrasco G, Cruz MA, Gallardo V, Miguel P, Lagos M, and Gonzalez C (1998) Plasma and platelet concentration and platelet uptake of serotonin in normotensive and preeclamptic pregnan cies. Life Sci 62: 1323-1332.
- 4. Brenner B, Harney JT, Ahmed BA, Jeffus BC, Unal R, Mehta JL, Kilic F (2007) Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. J Neurochem 102: 206-215.
- 5. Watts SW and Fink G (1999) 5-HT2B-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol 276: 944-952.
- 6. Watts SW (2005) 5-HT in systemic hypertension; foe, friend or fantasy? *Clin Sci* 108: 399-412.
- 7. Amsterdam JD, Garcia-Espana F, Fawcett J, Quitkin FM, Reimherr FW, Rosenbaum JF, and Beasley C (1999) Blood pressure changes during short-term fluoxetine treatment. J Clin Psycho pharm 19: 9-14.
- 8. Diaz, J. Ni, W. Thompson, J, King A, Fink G, Watts SW. (2008) 5-hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. JPET. 325: 1031-1038



Better Data. Better Science.

DSI • 119 14th Street NW • Suite 100 • St. Paul, MN 55112 T: +1 (651) 481-7400 • F: +1 (651) 481-7404 • Toll free 1 (800) 262-9687 www.datasci.com • information@datasci.com

© Copyright 2009, Data Sciences International.