

УДК 616.127:577.151-02:616.12:616.43]-092.9

Г.С. Сатурська, Н.Я. Потіха, В.Є. Пелих

ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ АЦЕТИЛХОЛІНУ В МІОКАРДІ ЩУРІВ В УМОВАХ РОЗВИТКУ СЕРЦЕВОЇ ТА ЕНДОКРИННОЇ ПАТОЛОГІЇ

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського"

Резюме. У роботі представлені результати досліджень інтенсивності ферментативного гідролізу ацетилхоліну в міокарді щурів фотоелектроколориметричним методом при моделюванні дифузного кардіосклерозу та мерказолілового гіпотиреозу. Описано деякі особливості даного методу, що дозволяє використовувати його для досліджень інтенсивності ферментатив-

ного гідролізу ацетилхоліну в тканині міокарда. Виявлено статеві та вікові відмінності загальної холінестеразної активності міокарда в різних відділах серця при даних експериментальних моделях.

Ключові слова: серце, ацетилхолінестераза, гіпотиреоз, дифузний кардіосклероз.

Вступ. Протягом останніх десятиліть набуває більшої актуальності проблема регуляції серцевої діяльності автономною нервовою системою в умовах розвитку патології серця. Медіатору парасимпатичної ланки ацетилхоліну (АХ) належить провідна роль у передачі нервового збудження, передусім у холінергічних синапсах [1]. Вивчення його метаболізму, а особливо інтенсивності ферментативного гідролізу, є важливим предметом досліджень у галузі сучасної медицини.

Інтенсивність ферментативного гідролізу АХ оцінюють за загальною холінестеразною активністю міокарда (ЗХЕА). Саме ЗХЕА міокарда є чинником, який визначає інтенсивність парасимпатичних впливів на серце і робочу концентрацію АХ у синапсах інтрамуральних гангліїв, а також між закінченням постгангліонарних волокон і клітинами провідної системи серця. Активність ферментативного гідролізу АХ впливає на ефективність вагусної імпульсації, регулюючи кількість нейротрансмітера, що досягає постсинаптичної мембрани [6, 7]. Вона – своєрідний обмежувач надмірної парасимпатичної імпульсації на пейсмекери синоатріального вузла.

Мета дослідження. Вивчити та аналізувати результати дослідження ЗХЕА передсердь і шлуночків міокарда статевонезрілих та статевозрілих щурів різної статі, отриманих модифікованим фотоелектроколориметричним методом, при моделюванні дифузного кардіосклерозу та гіпотиреозу.

Матеріал і методи. Активність ферментативного гідролізу АХ визначали в міокарді передсердь та шлуночків модифікованим методом, адаптованим для визначення ЗХЕА у тканинах, беручи за основу методику визначення активності холінестерази на фотоелектроколориметрі (Дж. Флейшера і Е. Поупе в модифікації Н.Н. Пушкіної і Н.В. Клімкіної) [2]. Враховуючи власний досвід, отриманий у результаті досліджень ЗХЕА міокарда при експериментальних моделях серцевої та ендокринної патології, внесено деякі технічні зміни і доповнення, які, власне, дозволяють використовувати дану методику для вивчення ЗХЕА в різних тканинах, а не тільки в цільній крові, де відображається сумарна активність си-

роваткової холінестерази (бутирилхолінестераза, псевдохолінестераза) та еритроцитарної холінестерази (справжня ацетилхолінестераза). На відміну від вищезгаданого методу, який слугував прототипом, при визначенні ЗХЕА тканини міокарда особливу увагу слід звернути на етап приготування гомогенату міокарда, на якому серце потрібно ретельно відмивати від крові фізіологічним розчином натрію хлориду для того, щоб на результати не впливала наявність сироваткової та еритроцитарної холінестерази, а також пропустити етап додавання розчину сапоніну, який викликає гемолиз еритроцитів.

Визначення активності холінестераз проводять по кількості негідролізованого АХ, яку вимірюють при дії лужного розчину гідроксиламінохлориду з утворенням ацетилгідроксамової кислоти, яка в кислому розчині дає з хлорним залізом кольорову реакцію. Інтенсивність забарвлення залежить від концентрації негідролізованого АХ. 10 % гомогенат тканини передсердь і шлуночків (окремо) серця на основі фосфатного буфера (рН=7,2) екстрагували 1 год при кімнатній температурі, 30 хв центрифугували при 3000 об./хв і використовували надосадову рідину. Контрольна і дослідна пробірки містили по 0,8 мл бідистильованої води та 0,2 мл екстракту. У дослідну пробірку додавали ще 1 мл 0,07 % розчину ацетилхоліну хлориду, приготовленого на основі фосфатного буфера, що містив 4 мкмоль АХ. Проби інкубували 1 год у термостаті при температурі 38 °С. Далі, у дослідну пробірку для припинення реакції, додавали 4 мл лужного гідроксиламіну, ретельно перемішуючи, а вміст контрольної переливали в заготовлену пробірку з сумішшю 4 мл лужного гідроксиламіну і 1 мл 0,07 % розчину АХ хлориду. Через 3 хв послідовно вводили по 2 мл HCl та FeCl₃, а ще через 10 хв фільтрат фотоколориметрували при довжині хвилі 540 нм. Контроль на колір реактивів містив усі реагенти, додані в зворотному порядку. Спочатку розраховували відсоток гідролізу АХ за формулою: $ВГ = (E_K - E_D) / E_K \cdot 100$, де ВГ – відсоток гідролізу АХ; E_K – екстинція контролю; E_D – екстинція дослідної проби. Потім визначали кількість гід-

ролізованого АХ у ммоль/(кг·год), що була пропорційною активності гідролізу, знаючи, що 1 мл 0,07 % розчину ацетилхоліну хлориду, приготовленого на основі фосфатного буфера, містив 4 ммоль АХ.

За вищевказаною методикою нами проведено дослідження ЗХЕА міокарда передсердь і шлуночків щурів в умовах двох експериментальних моделей: дифузного кардіосклерозу (ДКС) (статевозрілі тварини) та гіпотиреозу, викликаному згодовуванням мерказолілу в дозі 75 мг/кг маси тіла протягом 10 діб (статевонезрілі тварини) [3].

При моделюванні ДКС досліди провели на 48 статевозрілих білих нелінійних щурах різної статі віком 4,0-5,0 місяця, яких розподілили на шість груп. Дві групи тварин слугували контролем (самці і самки), а решту тварин було взято для моделювання ДКС, яким проводилося дослідження інтенсивності ферментативного гідролізу АХ у ранньому періоді розвитку патології (на 1 та 24 год з моменту останнього уведення препаратів).

Експериментальний гіпотиреоз моделювали на 40 статевонезрілих щурах-самцях, віком 1,5-2,0 місяця, шляхом перорального уведення мерказолілу в дозі 75 мг/кг маси тіла протягом 10 діб. Група контрольних статевонезрілих щурів-самців складала 20 тварин.

Усі експерименти проводилися з дотриманням принципів "Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1985), ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001) [4]. Результати оброблено параметричними методами варіаційної статистики з визначенням t-критерію Стьюдента.

Результати дослідження та їх обговорення.

При дослідженні ферментативного гідролізу АХ за ЗХЕА передсердь і шлуночків в умовах розвитку ДКС встановлено, що на 1 год розвитку ДКС ЗХЕА передсердь самців зменшилась на 6,3 % ($p < 0,02$) (рис. 1), а через добу – на 13,5 % ($p < 0,002$).

У міокарді шлуночків самців на 1 год моделювання ДКС пригнічення активності гідролізу АХ становило 12,7 % ($p < 0,01$) (рис. 2), а через 24 год – 39,3 % ($p < 0,001$).

ЗХЕА самок в умовах розвитку патології змінювалася однонапрявлено з відповідним показником самців, проте більш виражено. На 1 год моделювання ДКС ЗХЕА передсердь у самок зменшилась на 14,6 % ($p < 0,01$), а через 24 год – на 22,6 % ($p < 0,001$). У міокарді шлуночків самок, яким моделювали ДКС, на 1 год розвитку патології спостерігалось зменшення ЗХЕА на 24,3 % ($p < 0,01$). Показник ЗХЕА продовжував зменшуватися до 24 год моделювання даної патології і був меншим від аналогічного показника контрольних самок на 57,5 % ($p < 0,001$).

Цікавим виявився результат аналізу ЗХЕА у різних відділах серця. Так, у контрольних самців

спостерігалася більша ЗХЕА у передсердях на 30,8 % ($p < 0,001$), а в контрольних самок – на 56,6 % ($p < 0,001$). Це вказує на те, що ЗХЕА міокарда зменшувалася в напрямку від передсердь до шлуночків відповідно до густоти заліяння нервових структур у даних відділах серця.

Дана серія експериментів підтвердила також деякі статеві відмінності в метаболізмі АХ, зокрема, в активності ферментативного гідролізу парасимпатичного медіатора. ЗХЕА міокарда передсердь у групі контрольних статевозрілих самок була на 10,1 % ($p < 0,01$) більшою, ніж у самців (рис. 1). Аналіз ЗХЕА міокарда шлуночків контрольних тварин показав, що в групі самок ЗХЕА виявилася меншою, ніж у самців на 8 % ($p < 0,05$) (рис. 2). Ця статеві відмінність проявляється і в умовах патології, адже порівняння ЗХЕА міокарда між тваринами різної статі в умовах початкового періоду розвитку ДКС показало, що в самок спостерігалось більш виражене пригнічення інтенсивності ферментативного гідролізу АХ у міокарді передсердь і шлуночків, ніж у самців. Це лежить в основі деяких статевих патогенетичних особливостей перебігу модельованої патології.

У серії досліджень ЗХЕА міокарда при моделюванні мерказолілового гіпотиреозу в статевонезрілих щурів отримані результати також продемонстрували неоднорідність передсердь і шлуночків за їх ферментативними характеристиками. У контрольних тварин міокард передсердь розщеплював АХ із швидкістю $75,0 \pm 5,3$ ммоль/год у перерахунку на 1 кг маси досліджуваної тканини. ЗХЕА шлуночків виявилася нижчою, порівняно з передсердями, в 1,6 раза ($p < 0,05$).

У динаміці експериментального гіпотиреозу відмічалось підвищення інтенсивності ферментативного гідролізу АХ передсердь і шлуночків, особливо на 5-у добу експерименту, коли ЗХЕА в передсердях зросла на 70,9 % ($p < 0,001$), порівняно з контролем, а в шлуночках – на 105,3 % ($p < 0,001$). Подальший розвиток патології, незважаючи на насичення організму щурів мерказолілом, супроводжувався поступовим зменшенням інтенсивності ферментативного гідролізу АХ. Так, на 10-у добу гіпотиреозу ЗХЕА передсердь зменшилась на 9,7 % ($p < 0,01$), але перевищувала показник контролю на 54,4 % ($p < 0,001$).

Щодо вікових особливостей активності досліджуваного ферменту, то в статевонезрілих щурів-самців ЗХЕА передсердь виявилася нижчою, ніж у статевозрілих в 1,8 раза ($p < 0,001$), у шлуночках – у 2,2 раза ($p < 0,001$). Відомо, що парасимпатичний відділ автономної нервової системи остаточно дозріває в постнатальному періоді [5]. Зокрема, зростає сумарна активність холінестерази міокарда і відбувається перебудова ферментативної системи. Так, у щурів протягом перших чотирьох діб після народження в тканині атріовентрикулярного вузла міститься переважно бутирилхолінестераза, і лише після 12-ї доби починає домінувати ацетилхолінестераза. Саме в

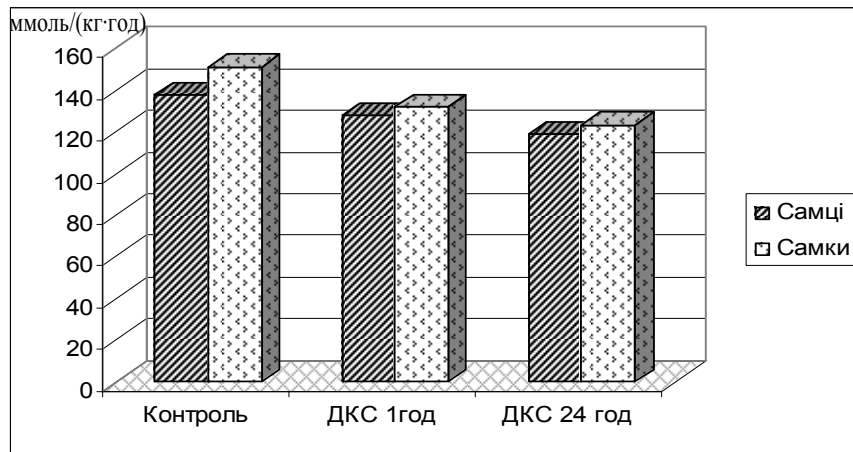


Рис. 1. Загальна холінестеразна активність міокарда передсердь статевозрілих самців і самок щурів при моделюванні дифузного кардіосклерозу

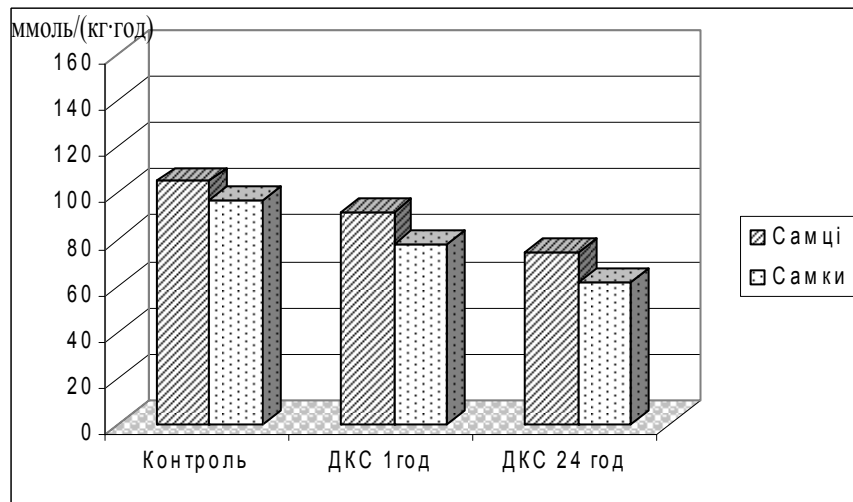


Рис. 2. Загальна холінестеразна активність міокарда шлуночків статевозрілих самців і самок щурів при моделюванні дифузного кардіосклерозу

цей період у міокарді правого передсердя з'являються нервові волокна, зв'язані з атріовентрикулярним вузлом.

Висновки

1. Фотоелектроколориметричний метод визначення загальної холінестеразної активності міокарда є доступним, надійним і дуже інформативним методом оцінки інтенсивності ферментативного гідролізу ацетилхоліну в міокарді щурів і може використовуватися при експериментальних дослідженнях серцевої та ендокринної патології.

2. Моделювання дифузного кардіосклерозу у статевозрілих щурів супроводжується зменшенням активності ферментативного гідролізу ацетилхоліну в міокарді передсердь і шлуночків у ранньому періоді розвитку даної патології.

3. Існує статеві відмінності у зміні метаболізму ацетилхоліну в ранньому періоді дифузного кардіосклерозу, що проявляється більш вираженим пригніченням загальної холінестеразної активності міокарда в міокарді передсердь і шлуночків самок, ніж самців.

4. Виявлено нижчий рівень обміну ацетилхоліну в серці статевонезрілих щурів, порівняно з

дорослими, що свідчить про незавершеність у них формування холінергічних механізмів регуляції серцевої діяльності.

Перспективи подальших досліджень. Вважаємо доцільним проведення подальших досліджень інтенсивності ферментативного гідролізу ацетилхоліну в міокарді щурів у статевому та віковому аспектах при моделюванні ендокринної патології та серцевої патології. Для комплексної оцінки метаболічних процесів у міокарді в умовах досліджуваної патології необхідно також дослідити вміст ацетилхоліну.

Література

1. Тучек С. Синтез ацетилхоліна в нейронах / С. Тучек. – М.: Мир, 1981. – 284 с.
2. Пушкина Н. Н. Биохимические методы исследования / Н.Н. Пушкина. – М.: Наука, 1963. – 223 с.
3. Пат. 66297 Україна, МПК G 09 B 23/28. Спосіб моделювання дифузного кардіосклерозу / Хара М.Р., Боднар Я.Я., Сатурська Г.С., Пелих В.Є.; заявник і патентовласник Терн. держ. мед. університет ім. І.Я. Горбачевського.

- го. – №u2011 08088; заявл. 29.06.11; опубл. 26.12.11. Бюл. № 24.
4. Резніков О.Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О.Г. Резніков // Ендокринологія. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142-145.
 5. Vlk J. Pre- and postnatal development of the autonomic innervation of the heart in rats / J. Vlk // Cesk. Fysiol. – 1989. – Vol. 38, № 3. – P. 199-221.
 6. Localization of molecules related to cholinergic signaling in eggs and zygotes of the sea urchin, *Paracentrotus lividus* / P. Piomboni, B. Baccetti, E. Moretti [et al.] // J. Submicrosc. Cytol. Pathol. – 2001. – Vol. 33, № 1-2. – P. 187-193.
 7. Duysen E.G. Induction of plasma acetylcholinesterase activity in mice challenged with organophosphorus poisons / E.G. Duysen, O. Lockridge // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2011. – Vol. 255, № 2. – P. 214-220.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА АЦЕТИЛХОЛИНА В МИОКАРДЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ СЕРДЕЧНОЙ И ЭНДОКРИННОЙ ПАТОЛОГИИ

Г.С. Сатурская, Н.Я. Потиха, В.Е. Пельх

Резюме. В работе представлены результаты исследований интенсивности ферментативного гидролиза ацетилхолина в миокарде крыс фотоэлектроколориметрическим методом при моделировании диффузного кардиосклероза и мерказолилового гипотиреоза. Описаны некоторые особенности данного метода, что позволяет использовать его для исследований интенсивности ферментативного гидролиза ацетилхолина в ткани миокарда. Выявлены половые и возрастные различия общей холинэстеразной активности миокарда в различных отделах сердца при данных экспериментальных моделях.

Ключевые слова: сердце, ацетилхолинэстераза, гипотиреоз, диффузный кардиосклероз.

DETERMINATION OF THE INTENSITY OF ACETYL CHOLINE ENZYMATIC HYDROLYSIS IN THE RAT MYOCARDIUM UNDER THE CONDITIONS OF CARDIAC AND ENDOCRINE PATHOLOGY

H.S. Satures'ka, N.Ya. Potikha, V.Ye. Pelykh

Abstract. The results of an investigation of the intensity of acetyl choline enzymatic hydrolysis in the rat myocardium by means of the photoelectrocolorimetric method, while modelling diffuse cardiosclerosis and merkazolil hypothyroidism, are presented in this paper. Some features of this method are described, enabling to use this method for investigations of the intensity of acetyl choline enzymatic hydrolysis in the myocardial tissue. Sex and age differences of the total cholinesterase activity of the myocardium have been revealed in different parts of the heart in these particular experimental models.

Key words: heart, acetylcholinesterase, hypothyroidism, diffuse cardiosclerosis.

SHEE "State Medical University Named after I.Ya. Horbachevskyi" (Ternopil')

Рецензент – проф. В.Ф. Мислицький

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 3 (63), part 1. – P. 95-98

Надійшла до редакції 20.04.2012 року