

Динаміка вмісту та ферментативного гідролізу ацетилхоліну в серці щурів після видалення гонад на тлі зміненої активності системи оксиду азоту

М.Р. ХАРА, А.М. ДОРОХІНА

/Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського/

Резюме

Динамика содержания и ферментативного гидролиза ацетилхолина в сердце крыс после удаления гонад на фоне измененной активности системы оксида азота

М.Р. Хара, А.Н. Дорохина

В экспериментах на половозрелых крысах обеих полов исследовали влияние модуляторов синтеза оксида азота на количество и ферментативный гидролиз ацетилхолина в условиях дефицита половых гормонов, вызванного гонадэктомией. Установили, что гонадэктомия приводит к увеличению количества ацетилхолина в сердце на фоне снижения холинэстеразной активности у животных обеих полов, нивелирует половые отличия метаболизма медиатора. Введение L-аргинина животным обеих полов с удаленными гонадами приводит к однотипной реакции: ослабление активности гидролиза на фоне увеличения количества метаболитической фракции ацетилхолина. L-NAME усиливает гидролиз ацетилхолина без изменения его содержания у овариэктомизированных самок и на фоне увеличения медиаторной фракции ацетилхолина у самцов.

Ключевые слова: гонадэктомия, ацетилхолин, гидролиз ацетилхолина, L-аргинин, L-NAME

Summary

Dynamic of the Content and Enzymatic Hydrolysis of the Acetylcholine in the Hearts of Different Sex Rats with Saved and Removed Gonads in Case of Modified Nitric Oxide's Activity

M.R. Khara, A.M. Dorokhina

Studied the effects of modulators of nitric oxide's synthesis on the content and enzymatic hydrolysis of acetylcholine in case of the sex hormones' deficit caused by gonadectomy in the experiments on the both sex rats. Established that gonadectomy leads to increased acetylcholine content in the heart according to the reduction of the acetylcholinesterase activity in both sex rats contributing to the leveling of mediator's metabolic sex differences. Introduction of the L-arginine to the gonadectomized both sex animals causes the same reaction: decreasing of the hydrolysis according to the increasing of the acetylcholine metabolic fraction. L-NAME enhances the hydrolysis of the acetylcholine without changing of it content in the ovariectomized female and with increasing of the acetylcholine mediator fraction in male rats.

Key words: gonadectomy, acetylcholine, hydrolysis of acetylcholine, L-arginine, L-NAME

У багатьох країнах світу у зв'язку зі збільшенням середньої тривалості життя надзвичайно актуальними стали медико-соціальні проблеми пов'язані з менопаузою та віковим андрогенодефіцитом [1, 2, 4, 7, 8]. Починаючи з 80-х років ХХ ст. серцево-судинні захворювання посідають перше місце серед усіх причин смертності в осіб обох статей. Проте, ішемічна хвороба серця (ІХС) у жінок розвивається на 7–15 років пізніше, ніж у чоловіків. У 50% випадків жінка може померти після першої коронарної події, а в 38% випадків – помирає протягом першого року, тоді як у чоловічій когорті ці показники значно нижчі – 30 та 25% відповідно [1]. Такі значні статистичні відмінності залежно від статі спонукають дослідників до глибшого вивчення перебігу серцево-судинних захворювань за умов дефіциту статевих гормонів. Одним із основних патогенетичних механізмів виникнення нейроциркуляторної дистонії, розвитку гіпертонічної хвороби, ІХС є дисбаланс ланок автономної нервової системи (АНС) у бік посилення активності симпатичної та пригнічення парасимпатичної [2, 7–9]. Таким чином, фармакологічна модуляція вегетативної активності та нормалізація впливу АНС на серцеву діяльність є одним із пріоритетних напрямків терапевтичних впливів. Нещодавні дослідження показали, що

саме газоподібній молекулі оксиду азоту (NO) притаманна роль важливого медіатора в контролі серця АНС [4, 9, 10]. З'ясувалось, що NO може модулювати мускаринову активність (так званий «прямий» вагусний ефект) та мускариновий антагонізм симпатичного нервового контролю серця («непрямий» вагусний ефект чи акцентований антагонізм) [10]. Проте, невстановленою залишається роль дефіциту статевих гормонів у холінергічному контролі серця на тлі зміни активності функціонування системи NO.

Мета дослідження. Вивчення впливу донатора (L-аргініну) та блокатора (L-NAME) синтезу оксиду азоту на вміст і ферментативний гідроліз ацетилхоліну (АХ) в міокарді гонадектомованих щурів різної статі.

Матеріали та методи дослідження

Досліди виконали на 102 білих лабораторних статевозрілих щурах обох статей, масою 180–210 г. Двобічну гонадектомію проводили з використанням кетамінового наркозу (80 мг/кг) [3]. Тварин досліджували через 4 тижні після оперативного втручання. Вміст АХ визначали в міокарді передсердь (ПС) та шлуночків (ШЛ) з вико-

ристанням біологічного методу [6]. Оскільки в міокарді Пс та Шл домінують різні фракції АХ (медіаторна та метаболічна відповідно), аналізували співвідношення вмісту АХ в Пс та Шл (АХпс/АХшл). Активність ферментативного гідролізу АХ в Пс та Шл визначали методом [5], оцінюючи загальну холінестеразну активність (ХЕА) досліджуваних тканин. Піддослідних щурів розподілили на 12 груп, в кожній було по 11 тварин: у 5-ти з них проводили визначення вмісту АХ, а у 6-ти – визначення ХЕА. 1-шу та 2-гу групи становили інтактні самці та самки відповідно, 3-тю та 4-ту – самці і самки, яким вводили L-аргінін (600 мг/кг), 5-ту і 6-ту – самці і самки, яким вводили L-NAME (25 мг/кг), 7-му та 8-му – гонадектомовані самці та самки, 9-ту та 10-ту – гонадектомовані самці і самки, яким вводили L-аргінін, 11-ту та 12-ту – гонадектомовані самці і самки, яким вводили L-NAME. Вивчення аналізованих показників у наркотизованих тiopенталом натрію щурів (доза препарату 40 мг/кг) проводили через 30 хвилин після внутрішньоочеревинного введення прекурсора та блокатора синтезу NO.

Результати та їх обговорення

За вмістом медіатора і в передсердях, і в шлуночках достовірної різниці між самцями і самками, які мали збережені гонади, не було. ХЕА міокарда передсердь самок була на 9,4% ($p < 0,002$) більшою, а шлуночків – на 8,3% ($p < 0,001$) меншою, ніж у самців (рис. 1, 2).

Застосування прекурсора NO призвело до різкого зростання вмісту АХ у міокарді передсердь і шлуночків тварин обох статей, що може бути свідченням здатності L-аргініну посилювати синтез та

вивільнення АХ [10]. У передсердях вміст АХ збільшився в самців у 2 рази ($p < 0,001$), в самок – в 3 рази ($p < 0,001$) (рис. 1) на тлі зростання ХЕА в 1,9 разу в самців ($p < 0,001$) та на 15% в самок ($p < 0,001$). Активацію ферментативного гідролізу АХ слід оцінити як прояв компенсаторної реакції, спрямованої на підтримання функціональної активності водія ритму. Вміст АХ в шлуночках самців зріс у 6 разів ($p < 0,001$), а самок – в 4 рази ($p < 0,001$). Активність ферментативного гідролізу АХ при цьому зменшилась у самців на 57% ($p < 0,001$), а в самок – на 40% ($p < 0,001$). Порівняння аналізованих показників у тварин

різної статі показало, що на тлі застосування L-аргініну рівень АХ в передсердях самок був у 1,6 разу ($p < 0,001$) більшим, а ХЕА на 34,5% ($p < 0,001$) меншою, ніж у самців. У шлуночках закономірність була протилежною, вміст АХ у самок був меншим в 1,4 разу ($p < 0,001$), а ХЕА – більшою на 28,4% ($p < 0,001$).

Введення L-NAME самцям та самкам зі збереженими гонадами викликало збільшення вмісту АХ в передсердях на 34,8% ($p < 0,001$) та на 34,2% ($p < 0,001$) відповідно. При цьому ХЕА передсердь зросла в 2,2 разу ($p < 0,001$) у самців і в 1,4 разу ($p < 0,001$) у самок. Збільшення вмісту АХ в передсердях на тлі різкого посилення ферментативного гідролізу за застосування L-NAME, найімовірніше, є компенсаторною реакцією, що реалізується за механізмом «акцентованого антагонізму», та результатом перехресних адренергічно-холінергічних впливів. Адже зменшення утворення NO, спричинене введенням блокатора його синтезу, призводить до посилення симпатичного тону, що, в свою чергу, полегшує вивільнення АХ [4, 10]. У міокарді шлуночків після введення L-NAME відбулося збільшення вмісту АХ з одночасним пригніченням активності його гідролізу в 10,7 разу ($p < 0,001$), порівняно з контролем. У самок рівень АХ збільшився в 2,8 разу ($p < 0,001$), а ХЕА зменшилась в 3 рази ($p < 0,001$). При застосуванні L-NAME у тварин зі збереженими гонадами рівень АХ у передсердях самок був на 7% ($p < 0,05$) вищим при меншій швидкості ферментативного гідролізу на 29,5% ($p < 0,001$), ніж у самців. Це є ще одним свідченням важливої ролі статевих гормонів у метаболізмі NO та функціонуванні холінергічних процесів [7, 2]. Шлуночки щурів різної статі відрізнялись лише за ХЕА, яка була в 3,2 разу ($p < 0,001$) вищою у самок.

У тварин групи контролю співвідношення між вмістом ацетилхоліну в передсердях і шлуночках становило 5,8 у самців та 6,1 у самок. Після застосування L-аргініну показник АХпс/АХшл у самців зменшився до 2,0, а у самок – до 4,5. Зазначена динаміка аналізованого співвідношення на тлі збільшення вмісту АХ і в передсердях, і в шлуночках є свідченням суттєвого впливу донатора синтезу NO на метаболічну фракцію та більшу чутливість самців до дії амінокислоти. Подібне співвідношення вмісту ацетилхоліну в передсердях і шлуночках спостерігалась і при введенні блокатора синтезу NO. Показники АХпс/АХшл зменшились як у самців, так і у самок до 2,6 та 2,9 відповідно. Це відбувалось на тлі збільшення вмісту АХ, головним чином, за рахунок метаболічної фракції.

Дефіцит статевих гормонів, спричинений гонадектомією, призвів до збільшення вмісту АХ у передсердях у 2 рази ($p < 0,001$) у самців і в 1,9 разу ($p < 0,001$) у самок, а в шлуночках на 43,5% ($p < 0,001$) та 38,0% ($p < 0,001$) відповідно (рис. 3). ХЕА передсердь самців зменшилась на 20,5% ($p < 0,001$), самок – на 25,5% ($p < 0,001$), а шлуночків – на 11,3% ($p < 0,001$) та 3,8% ($p < 0,002$) відповідно (рис. 4). Гонадектомовані тварини різних статей не відрізнялися між собою за рівнем АХ в передсердях і шлуночках, а також за активністю його ферментативного гідролізу. Гонадектомія нівелювала статеві відмінності у метаболізмі АХ.

Введення L-аргініну гонадектомованим самцям викликало зростання швидкості ферментативного гідролізу АХ в передсердях на 21,1% ($p < 0,001$) без зміни його рівня ($p > 0,05$), тоді як в шлуночках тенденція була іншою. Вміст АХ збільшився в 2,4 разу ($p < 0,001$) при зменшенні активності його гідролізу на 32,9% ($p < 0,001$) (рис. 3, 4). У самок з видаленими яєчниками застосування прекурсора синтезу NO також не змінило рівня АХ у передсердях ($p > 0,05$), проте зменшило ХЕА на 38,2% ($p < 0,001$). У шлуночках спостерігали збільшення вмісту АХ в 1,9 разу ($p < 0,001$) та зменшення його

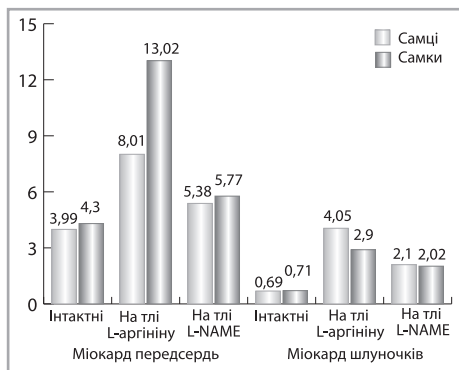


Рис. 1. Вміст ацетилхоліну в міокарді самців і самок щурів зі збереженими гонадами при застосуванні L-аргініну та L-NAME (мкмоль/кг)

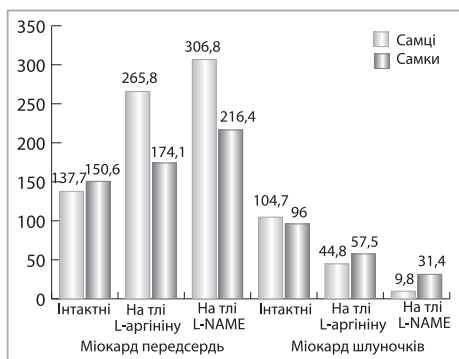


Рис. 2. Холінестеразна активність міокарда щурів зі збереженими гонадами при застосуванні L-аргініну та L-NAME (моль/(кг* год))

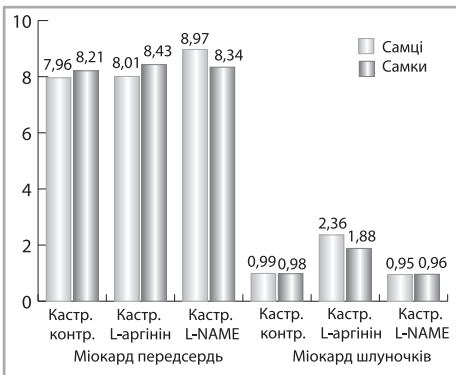


Рис. 3. Вміст ацетилхоліну в міокарді щурів з видаленими гонадами на тлі L-аргініну та L-NAME (мкмоль/кг).

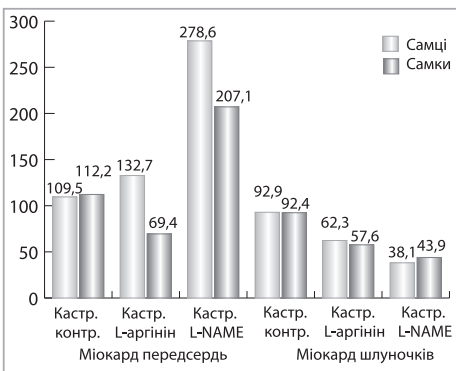


Рис. 4. Холінестеразна активність міокарда щурів з видаленими гонадами при застосуванні L-аргініну та L-NAME (ммоль/(кг* год))

гідролізу на 37,7% ($p < 0,001$). На тлі L-аргініну самці і самки з видаленими гонадами достовірно не відрізнялися за вмістом медіатора в передсердях ($p > 0,05$), тоді як активність гідролізу була на 47,7% ($p < 0,001$) меншою у самок. У шлуночках і рівень АХ, і ХЕА були також меншими в оварієктомованих самок на 20% ($p < 0,001$) та 7,6% ($p < 0,001$) відповідно.

Застосування L-NAME у гонадектомованих самців призвело до збільшення в передсердях вмісту АХ на 12,7% та ХЕА ($p < 0,05$) – в 2,5 разів ($p < 0,001$). У шлуночках спостерігали лише зменшення ХЕА в 2,4 рази ($p < 0,001$). У гонадектомованих самок введення L-NAME спричинило зростання ХЕА в 1,8 рази ($p < 0,001$) у передсердях та її зменшення в 2,1 рази ($p < 0,001$) в шлуночках, без зміни вмісту АХ. На тлі L-NAME гонадектомовані тварини різної статі не відрізнялися за рівнем АХ в передсердях та шлуночках. ХЕА передсердь самок була на 25,7% ($p < 0,001$) меншою, а шлуночків на 15,3% ($p < 0,001$) більшою, ніж у самців.

Співвідношення між вмістом АХ в передсердях і шлуночках після гонадектомії, у порівнянні з контрольними тваринами, збільшилось до 8,0 та 8,4 у самців та самок відповідно, що, зважаючи на динаміку вмісту АХ, свідчило про суттєвіші зміни медіаторної фракції. Введення L-аргініну тваринам за умов дефіциту статевих гормонів викликало зменшення співвідношення АХ_{пс}/АХ_{шл} у щурів обох статей, і становило 3,4 у самців та 4,5 у самок. Враховуючи зміни кількості АХ в передсердях та шлуночках, можна говорити про збільшення, головним чином, метаболічної фракції АХ. Блокада синтезу NO у гонадектомованих щурів збільшила співвідношення між вмістом АХ в передсердях і шлуночках у самців до 9,4 та вказувала на збільшення медіаторної фракції АХ. При застосуванні L-NAME в оварієктомованих самок щурів змін вмісту АХ, а відповідно й співвідношення АХ_{пс}/АХ_{шл}, ні в передсердях, ні в шлуночках не було.

Висновки

1. L-аргінін за збереженої активності гонад викликає збільшення вмісту ацетилхоліну, головним чином, за рахунок метаболічної фракції, з посиленням його гідролізу у тварин обох статей. У щурів обох статей зі збереженими статевими залозами L-NAME сприяє підвищенню вмісту ацетилхоліну за рахунок метаболічної фракції на тлі різкого посилення його ферментативного гідролізу в передсердях та пригнічення – в шлуночках.
 2. Гонадектомія сприяє нівелюванню статевих відмінностей у метаболізмі ацетилхоліну. L-аргінін в гонадектомованих тварин збільшує вміст медіаторного ацетилхоліну лише в шлуночках, зменшуючи активність його гідролізу. L-NAME у самців з дефіцитом статевих гормонів призводить до збільшення вмісту ацетилхоліну за рахунок медіаторної фракції.
- Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні впливу дефіциту статевих гормонів на стан системи оксиду азоту у тварин різної статі.

Література

1. Волков В.И. Гендерные и возрастные особенности ишемической болезни сердца / В.И. Волков, В.И. Страна // Здоров'я України. – 2007. – №12/1. – С. 33–35.
2. Дедов И.И. Возрастной андрогенный дефицит у мужчин / И.И. Дедов, С.Ю. Калинин. – М. : Практическая медицина, 2006. – 240 с.
3. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. – Изд-во Московского Университета. – 1968. – 275 с.
4. Покровская Т.Г. Комбинированная фармакологическая коррекция метаболического пути L-аргинина / Т.Г. Покровская // NO при моделировании дефицита оксида азота: автореф. дис... д-ра. мед. наук: 14.00.25. – Курск : Курский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию, 2009. – 47 с.
5. Пушкина Н.Н. Биохимические методы исследования / Н. Н. Пушкина. – М. : Наука, 1963. – 223 с.
6. Сас Л.М. Синтез і гідроліз ацетилхоліну в міокарді щурів з тироксиним токсикозом / Л.М. Сас // Мед. хімія. – Т. 4, № 4. – С. 44–47.
7. Сметник В. П. Системные изменения у женщин в климактерии / В. П. Сметник // РМЖ. – 2001. – Т. 9, № 9. – С. 1–5.
8. Сметник В.П. Современные представления о менопаузальном метаболическом синдроме / В.П. Сметник, И.Г. Шестакова // Consilium medicum. – 2003. – Т. 5, N 9.
9. Massion P.B., Ferron O., Dessy C., Balligand J.-L. Nitric oxide and cardiac function // Circ. Res. – 2003. – V. 93. – P. 388–400.
10. Herring Neil, Danson Edward J.F., Paterson David J. Cholinergic Control of Heart Rate by Nitric Oxide is Site Specific // News Physiol. Sci. – 2002. – V. 17, N. 5. – P. 202–208.