

шка кашало-  
ым серебром/

1955.—162 с.  
organ of the  
awaii, 1970.—

tract and the  
oceti).—Bijd-

а в редакцию  
29.12.81

УДК 612.817.1

Б. А. Ройтуб, Р. С. Златин

## СПОСОБ УСТОЙЧИВОГО ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНА

В истории развития учения о медиаторах важное место занимает открытие [2] биологического метода определения ацетилхолина. Разработка этого метода шла главным образом в направлении повышения его чувствительности. Такое повышение чувствительности особенно важно для установления наличия ацетилхолина в ограниченных объемах отдельных структур мозга. Поскольку биологический метод определения ацетилхолина обязательно включает тестирование известными концентрациями ацетилхолина, то естественно, что повышение чувствительности требует использования более низких концентраций тестирующих растворов, что в значительной степени снижает величину их необратимого связывания с тестирующим объектом и, таким образом, повышает скорость и степень их отмывания.

В последние годы сделан значительный шаг в направлении повышения чувствительности метода определения ацетилхолина за счет использования современной электронной регистрирующей техники, а также за счет высокой препаративной техники, используемой для приготовления тест-объекта [1, 3, 4]. Это дало возможность пользоваться чувствительностью метода в пределах  $10^{-8}$ — $10^{-20}$  г/мл, что указывает на недостаточную устойчивость чувствительности метода, используемого указанными авторами. Однако, в связи со сложностью существующих способов, они не нашли широкого распространения в исследовательских и клинических лабораториях.

Целью настоящей разработки является упрощение способа определения ацетилхолина при сохранении высокой чувствительности биообъекта (до  $10^{-20}$  г/мл) и достаточной стабильности получаемых результатов.

Настоящая цель достигается тем, что тестирующий объект — медицинская пиявка (*Hirudo medicinalis*) — перед изготовлением препарата спинной мышцы подвергается экстремальным воздействиям, включающим голод на протяжении 2—4 нед и выдерживание в течение 4—6 сут в воде при  $t=+4$ — $+6^\circ\text{C}$ , а приготовленный препарат спинной мышцы находится в растворе Рингера при той же температуре в течение 45—50 ч.

Перед опытом препарат мышцы пиявки выдерживают 1 ч в растворе Кребса ( $t=+4$ — $+6^\circ\text{C}$ ), после чего его помещают на пенопластовый препаративный столик и поперечным разрезом с помощью спаренных лезвий, находящихся на расстоянии 8 мм, вырезают участок мышцы в области оральной присоски, на 5 мм каудальнее головных ганглиев. Вслед за этим обрезают продольно-боковые участки мышцы с таким расчетом, чтобы препарат имел ширину 3—4 мм. Препарат укрепляется двумя серфинками в плексигласовой ванночке объемом 2 мл<sup>3</sup>, заполненной аэрируемым раствором Кребса с прозеринном, и присоединяется к механической части электронного устройства.

Исследования проводятся при температуре раствора в ванночке  $+18$ — $+20^\circ\text{C}$ . Перед началом определения ацетилхолина в исследуемой жидкости готовят стандартные тестирующие растворы ацетилхолина на растворе Кребса с прозеринном.

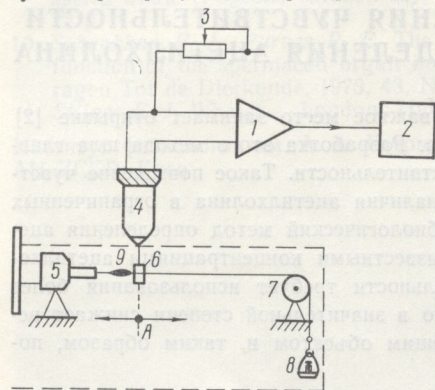
Последовательность исследования состоит в определении: а) минимальной концентрации ацетилхолина, вызывающей сокращение спинной мышцы пиявки; б) степени повторяемости отношения «доза — эффект» (в наших исследованиях повторяемость наблюдалась в 6—12 определениях); в) концентрации ацетилхолина в исследуемых растворах.

Между определениями мышцу отмывают от связанного с рецепторами ацетилхолина раствором Кребса с прозеринном. В случае высокой концентрации ацетилхолина в опытном растворе разведение его повышают.

Регистрацию сокращения участка спинной мышцы пиявки производят электронным самописцем устройства для измерения и регистрации динамики сокращения мыш-

цы пиявки, разработанного в нашем отделе старшим инженером М. Я. Иосимом. Это устройство состоит из механической и электронной частей. Структурная схема устройства представлена на рисунке 1. Чувствительным элементом устройства является механотрон (6М×1С) — прибор, преобразующий перемещение в пропорциональный ему электрический сигнал.

Перемещение кончика штыря механотрона в направлениях А, указанных на рисунке, преобразуется в пропорциональное напряжение на его выходе, которое, будучи усиленным дифференциальным усилителем, поступает на электронный самописец. Регулятор чувствительности служит для изменения усиления дифференциального усилителя и, тем самым, для установления необходимой чувствительности всей системы.



Устройство для измерения динамики сокращения мышцы (структурная схема).

Пунктиром очерчена механическая часть, вне пунктира — электронная часть. 1 — дифференциальный усилитель, 2 — электронный самописец, 3 — регулятор чувствительности, 4 — механотрон, 5 — лимб, 6 — насадка, 7 — блок, 8 — груз, 9 — мышца, А — направления перемещения кончика штыря механотрона.

Исследуемая мышца при помощи серфинок прикреплена одним концом к лимбу, а другим к тонкой шелковой нити, которая пропущена через насадку механотрона и перекинута через блок. В насадке механотрона имеется приспособление, фиксирующее нить относительно себя; на конце нити — крючок для подвеса грузика, служащего для начального натяжения мышцы.

Лимбом, выполненным на базе микрометра, можно устанавливать начальную точку отсчета, а также в начале опыта калибровать при помощи регулятора чувствительности всю систему.

Наши исследования проводились при чувствительности электронной части устройства 0,2—0,5 мВ/мкм. Показателем концентрации ацетилхолина является тангенс угла, образованного в результате отклонения писчика от базисной линии (исходный фон) после добавления опытного или тестирующего растворов.

Построив калибровочную кривую зависимости угла отклонения от концентрации ацетилхолина, определяем содержание ацетилхолина в опытных растворах.

В результате использования математического метода (метод наименьших квадратов) анализа калибровочных кривых, построенных нами на основе тестирования возрастающих концентраций ацетилхолина на различных пиявках, в лаборатории статистического анализа Института физиологии им. А. А. Богомольца АН УССР Н. Н. Косицим была получена формула, позволяющая на основании данных о величине тангенса угла установить концентрацию ацетилхолина в исследуемом растворе:  $-\lg C = 20,0 - 0,2 \lg \alpha$ , где  $C$  — искомая концентрация ацетилхолина.

Предложенная формула освобождает от необходимости построения калибровочных кривых. Сказанное выше не исключает возможность использования классического метода определения концентрации ацетилхолина путем последовательного использования разведений опытного раствора.

Нами осуществлена проверка степени специфичности предлагаемого нами способа. Установлено, что пребывание препарата спинной мышцы пиявки в растворе блокатора холинорецепторов *d*-тубокурарина ( $10^{-3}$  г/мл) в течение 15—30 мин сопровождается снижением сократительного эффекта от 77 % до полного его исчезновения. Это указывает, что кривая, записанная до введения *d*-тубокурарина, является результатом специфического взаимодействия ацетилхолина с холинорецептором спинной мышцы пиявки.

Мы изучали также влияние гомогената ткани мозга на сократительную способность мышцы без добавления прозерина. При этом установлено, что сократительный эффект препарата мышцы снижался на 70—80 %. Это указывает на то, что действующим началом в гомогенате коры, вызывающим сокращение мышцы, является ацетилхолин.

Таким образом, нас возможность определять  $10^{-20}$  г/мл) в малых навного тест-объекта, а так дает возможность внедрлечебных учреждений.

Следует отметить, чдинской пиявки, не по. позволило повысить чувст

1. Beny J.-L. Une methode sympathique cervical di
2. Fühner H. Ein Vorlesu Wirkung des Physostign 85.
3. Kadota K., Nagata M. E nese medical leech: a p method.— Jap. J. Pharm
4. Nagata M., Kadota K. to acetylcholine.— Ibid, 1

Отдел физиологии ствола  
Института физиологии им.  
АН УССР, Киев

УДК 578.088.781

## УСТРО И ИССЛЕДОВА ФО

Исследованию свойств много внимания. Для прям плоских мембран удобно и ны [5, 6]. При этом площа чем площадь плоской мем вом стаканчике. Метод сф изучении транспорта неэлек

Обычно сферическую совой пипетки. При прямых об изменении его концентра ности между двумя концент (задают) до начала опыта взятия пробы [2]. Такие у щениям, на базе которых ст фициента проницаемости м увеличивается тем значите исследуемого вещества. Нес нения концентрации веществ сложности введения датчика

Предлагаемое устройст браны, а также дает возмож какого-либо вещества внутр трируемым устройством, отн рографическим методом на