



IN VIVO EN IN VITRO

KARDIOVASKULÊRE EFFEKTE VAN CHOLIENSUUR

MET DIE WISTARROT AS PROEFDIER

Pieter Hendrik Joubert

UOVS-SASOL-BIBLIOTEEK 0190771



111022657101220000019

Verhandeling voorgelê om te voldoen aan die vereistes vir
die graad M.Med.Sc. in die Fakulteit van Geneeskunde (de-
partement Farmakologie) aan die Universiteit van die
Oranje-Vrystaat

1975

ALLENDEKLEINPLAAR MAG ONDER
GEEN OMSTANDIGHED E UIT L'N
BIBLIOTHEEK VERWYDER WORD NIE

T 615.71 Jon.
190771

PLAATLAAR KAC ONDER
G. A. ONMANGICHEDE UI
BIBLIOTHEEK DEEL 2 D. 117

INHOUD

	<u>B1.</u>
1. <u>DOELSTELLING</u>	1
2. <u>LITERATUUR-OORSIG EN TEORETIESE OORWEGINGS</u>	3
2.1. FISIOLOGIESE ASPEKTE TEN OPSIGTE VAN GALSURE ...	3
2.2. STRUKTURELE OORWEGINGS	4
2.3. GALSURE EN DIE KARDIOVASKULÊRE STELSEL	7
3. <u>EKSPERIMENTELE WERK</u>	13
3.1. OBSTRUKTIEWE GEELSUG IN ROTTE	13
3.2. <u>IN VIVO</u> CHOLIENSUUR-TOEDIENING	17
3.3. ROL VAN DIE OUTONOME SENUWEESTELSEL <u>IN VIVO</u>	29
3.4. <u>IN VITRO</u> EFFEKTE VAN CHOLIENSUUR	43
3.5. FAKTORE WAT DIE <u>IN VITRO</u> NEGATIEF CHRONOTROPE EFFEK MAG BEINVLOED	53
3.5.1. Oppervlakte-spanning	53
3.5.2. Elektroliete	54
3.5.3. Outonome oordragstowwe	59
3.5.4. Sel-morfologie	63
3.6. CHOLIENSUUR EN HEMOLISE	67
3.7. CHOLIENSUUR EN ARITMIE	75
4. <u>SUMMARY/OPSOMMING</u>	
4.1. THE CARDIOVASCULAR EFFECTS OF CHOLIC ACID IN THE WISTAR RAT	79
4.2. KARDIOVASKULÊRE EFFEKTE VAN CHOLIENSUUR IN DIE WISTARROT	81
5. <u>BIBLIOGRAFIE</u>	85
6. <u>BEDANKINGS</u>	91

1. DOELSTELLING

Die ontstaan van bradikardie tydens geelsug is 'n welbekende kliniese waarneming wat gewoonlik toegeskryf word aan die teenwoordigheid van verhoogde sistemiese galsuurkonsentrasies.

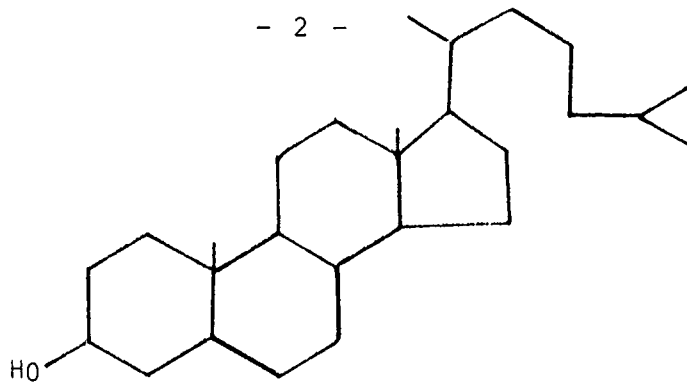
Alhoewel die verband tussen galkomponente en bradikardie reeds lank bekend is en verskeie elektrokardiografiese en mediese handboeke terloops daarna verwys, is daar verbasend min literatuur oor hierdie onderwerp beskikbaar. Die bestaande publikasies is ook opvallend uiteenlopend van aard en daar is fundamentele verskille in die bevindings van die onderskeie werkers op hierdie gebied.

'n Opvallende probleem is die feit dat verskillende aspekte van die effek van verskillende galsure op die kardiovaskulêre stelsel van verskillende spesies onder wyduiteenlopende proefomstandighede bestudeer is en dat dikwels slegs op ekstreme toksisiteit gelet is.

Die doelstelling van hierdie projek was dus om duidelikheid te probeer verkry deur die effek van 'n enkele galsuur (choliensuur*) in 'n spesifieke spesie (die Wistarrot) te ondersoek om:

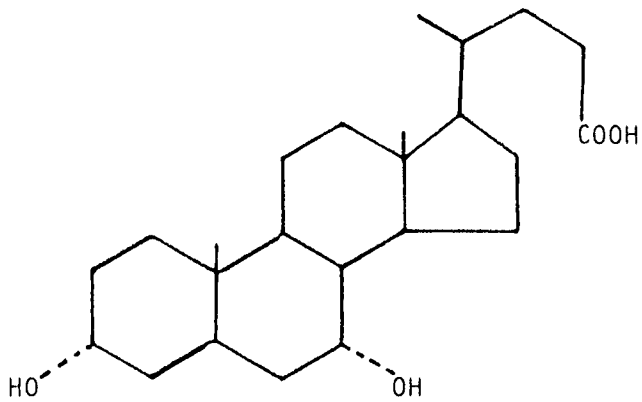
- (i) vas te stel of daar wel 'n negatiewe chronotrope effek aangetoon kan word onder in vivo en in vitro omstandighede;
- (ii) om vas te stel of 'n dosis-effek verwantskap vir so 'n effek bestaan;
- (iii) om helderheid te verkry oor die moontlike meganisme of meganismes wat by so 'n effek betrokke kan wees.

* Choliensuur is relatief nie-toksies vergeleke met ander galsure wat uitgesproke skade aan selle en selkomponente kan veroorsaak.

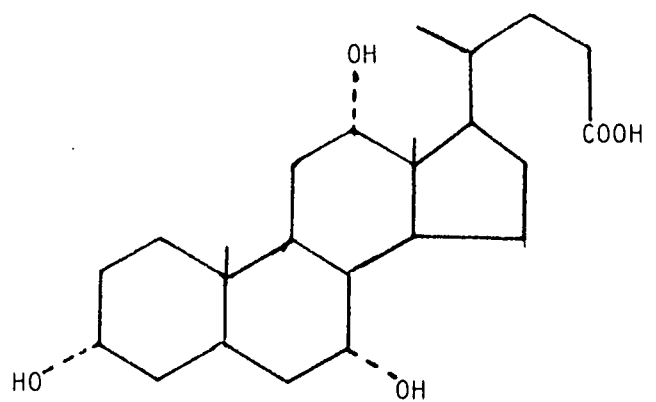


CHOLESTEROL

LEWER



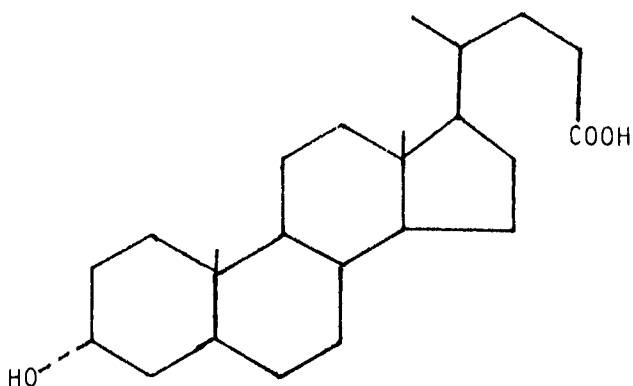
CHENODEOKSIECHOLIENSUUR



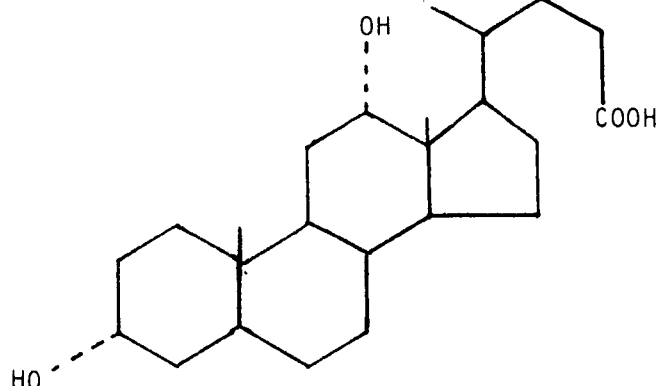
CHOLIENSUUR

Dermkanaal
bakterieë

Dermkanaal
bakterieë



LITOCOLIENSUUR



DEOKSIECHOLIENSUUR

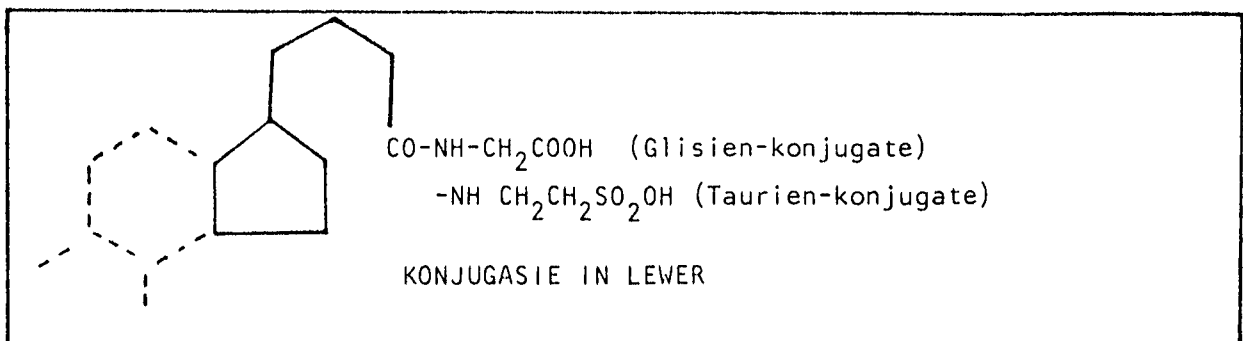


Fig. 2.1.a Enkele aspekte van galsuur-metabolisme

2. LITERATUUR-OORSIG EN TEORETIESE OORWEGINGS

2.1. FISIOLOGIESE ASPEKTE TEN OPSIGTE VAN GALSURE

Galsure het in die afgelope dekade baie aandag geniet en was die onderwerp van verskeie oorsigte^{1, 2, 3} wat veral toegespits was op die rol wat hulle in gastro-intestinale en hepatiese siektetoestande speel. Galsure geniet teenswoordig ook aandag as middels om galsteendissolusie teweeg te bring^{4, 5, 6}. Kardiovaskulêre effekte word in al hierdie besprekings oor die hoof gesien.

Galsure is monokarboksiliese sure wat as produkte van cholesterolmetabolisme gevorm word (fig. 2.1.a). Twee reekse, nl. 'n tri- en 'n dihidroksie-reeks word gevorm. Die sogenaamde primêre galsure ontstaan in die lewer, hulle is chenodeoksiecholiensuur (die 3 α , 7 α dihidroksiesuur) en choliensuur (die 3 α , 7 α , 12 α trihidroksiesuur). Hierdie sinteseproses is onderhewig aan 'n negatiewe terugvoermeganisme wat die sirkulerende enterohepatiese galsuurpoel onder normale omstandighede relatief konstant hou. Die sekondêre galsure ontstaan as gevolg van die effek van intestinale bakterieë wat dehidroksilasie van chenodeoksiecholiensuur en choliensuur veroorsaak om lithocholiensuur ('n mono-hidroksiesuur) en deoksiecholiensuur ('n dihidroksiesuur) respektiewelik te vorm.

Galsure word in gal en bloed in die gekonjugeerde vorms aangetref en ondergaan 'n aktiewe enterohepatiese hersirkulasie. Die konjugasieproses benodig koensiem A en vind waarskynlik in die lewermikrosome plaas waar die galsure met glisien en taurien gekonjugeer word (fig. 2.1.a). Ongekonjugeerde galsure kan slegs in bepaalde siektetoestande soos obstruktiewe geelsug en lewersirroze in die bloed aangetoon word. Die normale totale galsuur-

konsentrasie in sistemiese bloed is gewoonlik minder as 10 mg/l, maar kan in siektetoestande soos obstruktiwe geelsug en lewer-sirroze, wat met versteurde galsuur-uitskeiding gepaard gaan, tot 400 mg/l styg. Die trihidroksie-galsuurreeks verteenwoordig die grootste komponent van sirkulerende galsure in die mens en hierdie fraksie is, persentasiegewys, groter in die rot as in die mens⁷.

Die funksies van galsure is hoofsaaklik tot die lewer- en gastro-intestinale stelsels beperk en behels die beheer van galuitskeiding, regulering van cholesterol-sintese en uitskeiding, miseelvorming en vetabsorpsie, effekte op die metabolisme van gastro-intestinale mukosa en die beheer van sout en water transport in die dikderm. Galsure verteenwoordig ook 'n belangrike roete vir die eliminasië van endogene stowwe met 'n steroïed-kern.

2.2. STRUKTURELE OORWEGINGS

Choliensuur, soos die ander galsure, bestaan hoofsaaklik uit drie dele (fig. 2.2.a):

- (i) 'n plat hidrofobe steroïedkern wat ten volle versadig is en verantwoordelik is vir die lipofiele en oppervlakte-spanning-verlagende eienskappe van galsure;
- (ii) 'n ioniese groep aan die syketting wat belangrik is vir wateroplosbaarheid;
- (iii) hidroksielgroepe (drie in die geval van choliensuur) wat aan dieselfde kant van die steroïedkern geleë is en noodsaaklik is vir wateroplosbaarheid.

Hierdie strukturele eienskappe is daarvoor verantwoordelik

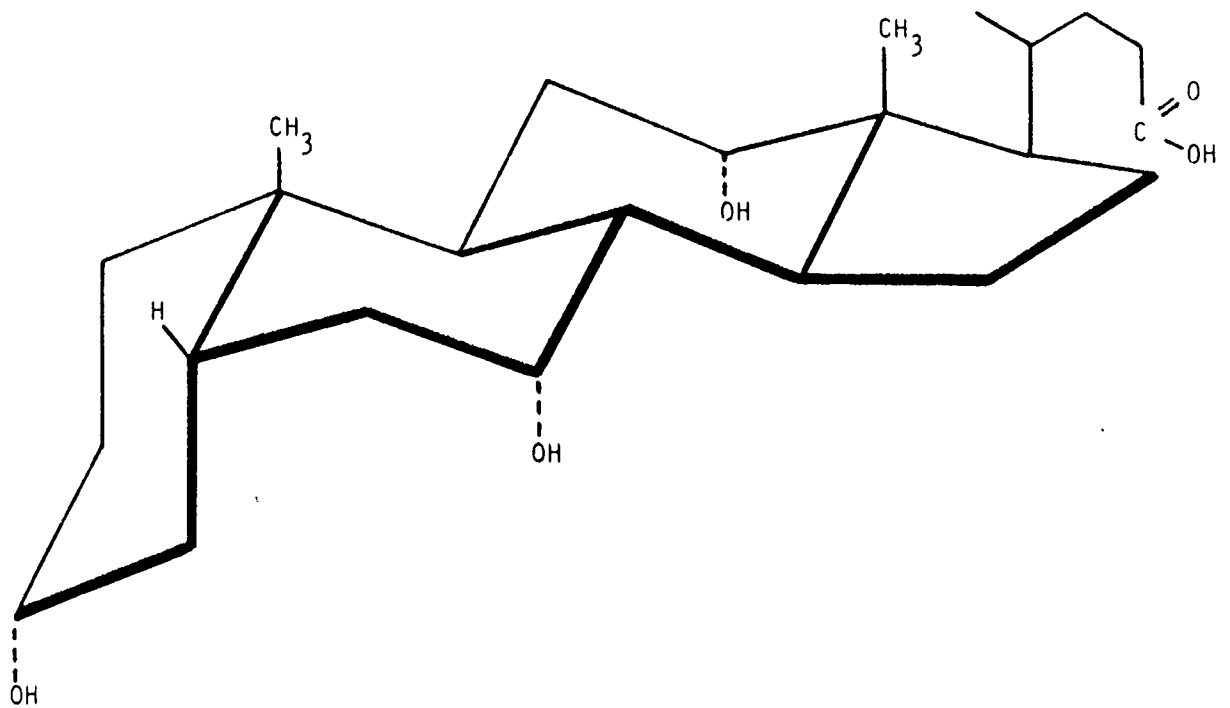
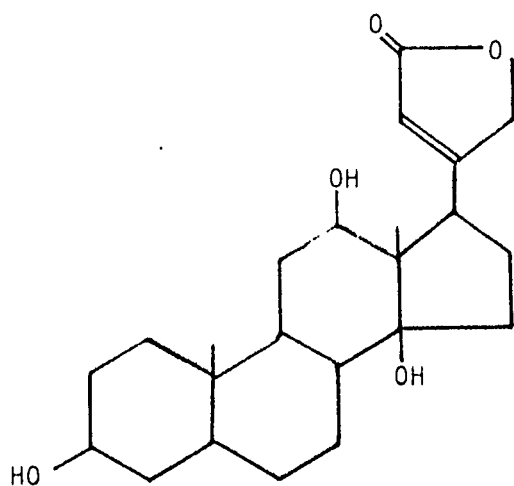
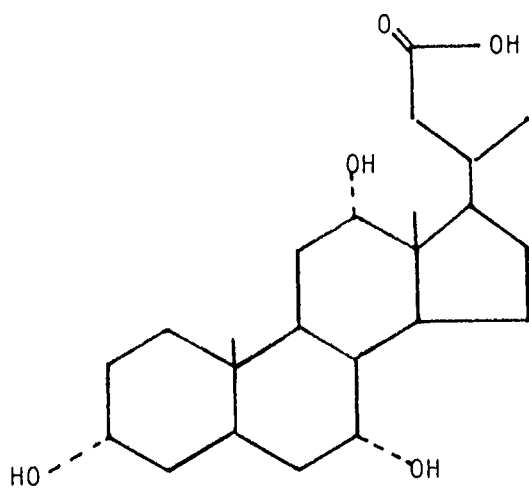


Fig. 2.2.a Perspektief-voorstelling van die choliensuurmolekuul om aan te toon dat die polêre groepe in dieselfde rigting georiënteer is, sodat daar 'n hidrofiele sowel as 'n hidrofobe kant van die molekuul bestaan.



DIGOKSIGENIEN



CHOLIENSUUR

Fig. 2.2.b Die chemiese strukture van digoksigenien (die aglikoon van digoksien) en choliensuur het verskeie gemeenskaplike eienskappe.

dat choliensuur hidrofiele sowel as hidrofobe eienskappe toon. Molekule met hierdie eienskappe kan met selmembrane reageer om 'n monolaag te vorm deurdat die hidrofobe gedeelte aan die lipiedmembraan koppel, terwyl hidrofiele groepe reghoekig tot die seloppervlakte georiënteer is^{8, 9}.

Selskade (bv. hemolise van eritrosiete en lewerselnekrose) asook beskadiging van intrasellulêre organelle soos mitochondriae en lisosome is waarskynlik aan hierdie reaksie met membrane te wyte^{9, 10}.

Dit is ook interessant om daarop te let dat choliensuur struktureel heelwat ooreenkomste met hartglikosiede toon (fig. 2.2.b) en dat galsure ATP'ase-aktiwiteit in intestinale mukosale selle verminder, wat waarskynlik verantwoordelik is vir die effekte op ion-uitruiling oor hierdie selmembrane¹⁰.

'n Laaste aspek ten opsigte van galsure moet ook vermeld word. Die verband tussen verhoogde galsuurkonsentrasies en pruritis het al dikwels aandag geniet en een van die moontlike meganismes wat betrokke mag wees is die vrystelling van chemiese mediators soos proteases en histamien¹¹. Aangesien histamien kenmerkende kardiovaskulêre effekte kan uitlok, moet hierdie bevindings in gedagte gehou word in die beskouing van die kardiovaskulêre effekte van galsure.

2.3. GALSURE EN DIE KARDIOVASKULÊRE STELSEL

Twee bekende aanbevole handboeke vir voorgraadse mediese studente het in onlangse uitgawes uiteenlopende verklarings ten opsigte van die effek van galsure en galsoute op hartspoed gehad:

(a) "Sinus bradycardia is associated with
..... obstructive jaundice (the effect of direct
action of the bile salts on the S.A. Node)"¹²

(b) Bradycardia is sometimes found in the early stages
(of obstructive jaundice) and may be produced by
an increase in vagal inhibitory tone due to circu-
lating bile salts"¹³.

'n Direkte effek op die sino-atriale node volgens Schamroth¹²
en 'n vagotoniese effek volgens Davidson¹³ verteenwoordig twee
uiteenlopende meganismes en dit dien as 'n illustrasie van die
verwarrende beeld wat nog steeds bestaan, ten spyte van die feit
dat Landois¹⁴ reeds in 1863 aangetoon het dat galtoediening aan
honde na outonome denervasie van die hart, bradikardie veroorsaak
het. Hy het dit toegeskryf aan 'n direkte effek op die hart.
Röhrig¹⁵ het in dieselfde jaar beweer dat die effek van gal as
gevolg van die beskadiging van eksitatoriese outonome ganglia
is*.

In twee artikels wat in 1939 en 1940 verskyn het^{16, 17}, het
Wakim en sy medewerkers gevind dat gal-, natriumtaurocholaat-
en natriumglikocholaat-toediening direkte toksiese effekte op
die geïsoleerde konynhart gehad het en bradikardie, 'n negatief
inotrope effek, ventrikulêre ekstrasistole, ventrikulêre fibril-
lasie en hartstilstand veroorsaak het, terwyl bloeddruk daling,
bradikardie en aritmieë in honde met gedenerveerde harte veroor-
saak is. Hulle het, net soos Landois bykans 80 jaar voor hulle,
tot die gevolgtrekking gekom dat die innervasie van die hart
geen rol speel in die effek wat deur galsoute uitgelok word nie.
Hulle verklaar dat: "Whole blood and bile salts can produce

* Verwysings uit die publikasie van Wakim (1940)¹⁷

practically the same hypotensive effect and cardiac changes such as bradycardia and disturbances in rhythm, in the absence, as well as in the presence of cardiac autonomic nerves."

Twaalf jaar later het Lyores en Gowdey¹⁸ 'n hele reeks stereoïede wat 'n verskeidenheid galsoute en galsure (deoksiecholiensuur, natriumdeoksiecholaat, natriumdehidrocholaat en natriumglikocholaat) ingesluit het, se effek op die geïsoleerde, hipodinamiese paddahart bestudeer. Hulle het gevind dat die stereoïede wat hulle ondersoek het almal, in 'n mindere of meerdere mate, 'n positief inotrope effek sonder betekenisvolle chronotrope veranderinge teweeggebring het en tot die gevolgtrekking gekom het dat hulle hierdie effek in gemeen het met die hartglikosiede, en dat afgesien van die onversadigde laktoonring, die siklopentanoperhidrofenantreen-nukleus belangrik is vir die kardiotoniese effekte van die hartglikosiede.

In 1964 het Erdmann en Rohr¹⁹ deoksiecholiensuur aan honde toegedien en bevindings gepubliseer wat direk teenstrydig was met die van Wakim. Hulle het tot die gevolgtrekking gekom dat galsure 'n direkte sentrale werking op die vagale sentrum het en dat daar geen direkte effek of 'n effek op simpatikustonus bestaan nie. Hulle het die volgende gevolgtrekkings gemaak:

"The following possibilities of the bradycardia were excluded by suitable experiments:

1. direct action on the heart muscle;
2. actions on the heart innervation by reducing sympathetic tone;
3. actions on the heart innervation by sensitizing the parasympathetic tone (eg. anticholinesterase effect) and

4. actions on the heart receptors of the cardiovascular reflexes.

..... This shows that the bile acids stimulate directly the vagal centre (Diese kann nur auf den Wege über eine zentrale Vaguserregung zustand gekommen sein)."

In 1963 het Guth en Held²⁰ die effek van 'n enkele toksiese dosering deoksiecholiensuur op die aksiepotensiaal en inotrope eienskappe van rotatria bestudeer. Hulle het gevind dat daar 'n aanvanklike, kortstondige positiewe inotrope effek was wat gevolg is deur 'n negatiewe inotrope effek. Wat die aksiepotensiaal betref, was daar 'n aanvanklike toename, gevolg deur 'n uitgesproke afname in die duur van die aksiepotensiaal. Daar was ook 'n gepaardgaande afname in amplitude asook dv/dt . Op grond hiervan het hulle tot die gevolgtrekking gekom dat die effek van galsure ooreenstem met die van hartglokosiede en gevolglik gepostuleer dat hulle op grond van dieselfde meganisme hulle effekte uitoefen. "Der Einfluss der Gallensäure stimmt mit den der Digitalisglykoside auffallend überein, sodass ein gleicher Wirkungsmechanismus für beide Stoffe angenommen werden darf."

In 1966 het 'n groep werkers uit dieselfde laboratorium geïsoleerde rotatria aan toksiese konsentrasies natrium-deoksiecholaat blootgestel, wat tot die staking van spontane aktiwiteit aanleiding gegee het²¹. Hulle het gevind dat uitgesproke mikroskopiese selskade in die oppervlakkige lae van die atria aangetoon kon word, wat veral gemanifesteer het as mitochondriale swelling, swelling van die sarkoplasmiese retikulum en 'n afname in glikogeeninhoud van die miokardiale selle.

In 1967 het Nemesánsky en Hegyváry die effek van natrium-

deoksiecholaat en natriumcholaat op geïsoleerde paddaharte bestudeer⁸ en 'n negatief chronotrope asook 'n negatief inotrope effek aangetoon met diastoliese hartstilstand. Hulle kon 'n soortgelyke effek met ander stowwe wat oppervlakte-spanning verlaag, uitlok (Tween 80, Triton WR-1339) en het hiervan afgelei dat die effek van galsure as gevolg van 'n nie-spesifieke oppervlakte-spanning verlaging is.

Huang (1969)²² het die effek van deoksiecholiensuur op konynatria ondersoek en gevind dat die helling van fase 4, die duur en die dv/dt van die aksiepotensiaal in die sino-atriale (S.A.) node verminder is en het tot die gevolgtrekking gekom dat die hipotese van Erdmann en Rohr¹⁹, dat galsure die vagale sentrum in die brein stimuleer, onjuis is en dat galsure 'n direkte effek op die S.A. node uitoefen: "Therefore slowing of the heart by sodium desoxycholate must be due to a direct action on the S.A. node."

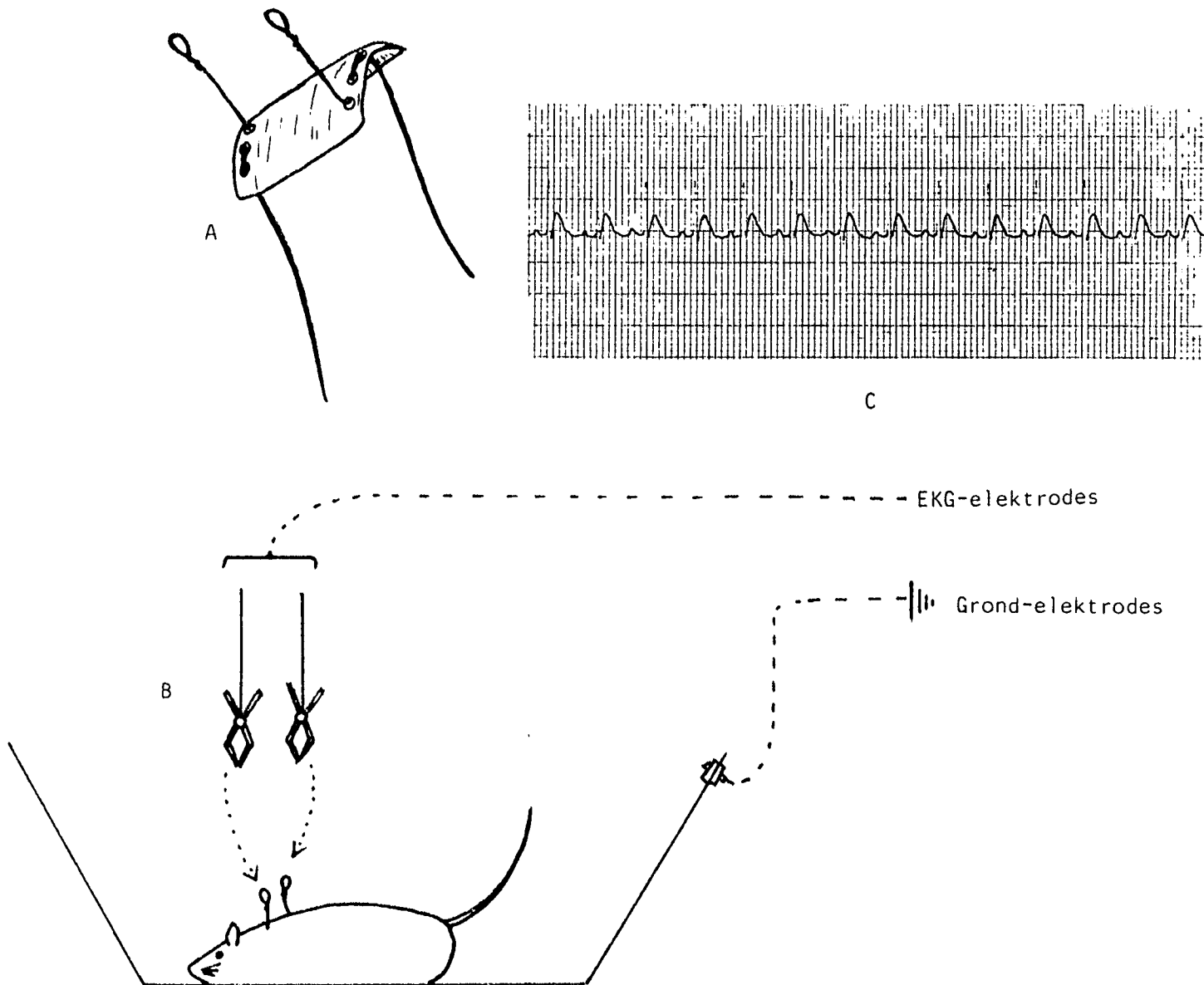


Fig. 3.1.1.a 'n Voorstelling van die elektrode-saaltjie (A), die koppeling van elektrodes aan die wakker rot (B) en 'n voorbeeld van 'n elektrokardiogram deur hierdie metode verkry (C).

3. EKSPERIMENTELE WERK

3.1. OBSTRUKTIEWE GEELSUG IN ROTTE

3.1.1. Eksperimentele tegnieke

Hierdie eksperiment is uitgevoer om vas te stel of obstruktiewe geelsug in die Wistarrot wel 'n invloed op hartspoed het.

Aangesien dit moeilik is om presies-herhaalbare narkose-toestande in rotte te skep, en met die oog op die moontlike effek van geelsug en lewer-aantasting op die werking en farmakokinetika van narkosemiddels, veral t.o.v. die kardiovaskulêre stelsel, moes 'n tegniek gevind word om hartspoed in wakker rotte te meet. So 'n tegniek moes hartspoed in die ongestremde rot kon meet om veral simpatiese stimulasie te verhoed.

'n Metode om elektrokardiogramme (EKG's) in wakker rotte wat vryelik kan beweeg, te registreer, is gebruik²³. Saaltjies van ongeveer 2 X 1 cm is uit 'n plastiekhouer vir wegdoenbare intra-veneuse infuusstelle gesny en drie gaatjies aan elke kant gemaak. Twee elektrode-draadjies is, soos op die skets in figuur 3.1.1.a aangedui, daardeur geryg. Die saaltjies is in 70% etielalkohol gesteriliseer en daarna subkutaan op die rûe van rotte (onder eternarkose) geïmplanteer deur 'n klein snit ($\pm$ 2 cm) op die rug oor die torakale werwels te maak. Die twee lang draadjies is onder die vel na die sternum gelei wat ook deur 'n snit van $\pm$ 2 cm blootgelê was, terwyl die korter draadjies toegelaat is om deur die wond op die rug uit te steek. Een lang elektrode is aan die bo- en een aan die onderpunt van die sternum gekoppel. Die snitte is geheg en toegelaat om te genees ($\pm$ 1 week) voordat die eksperiment verder gevoer is.

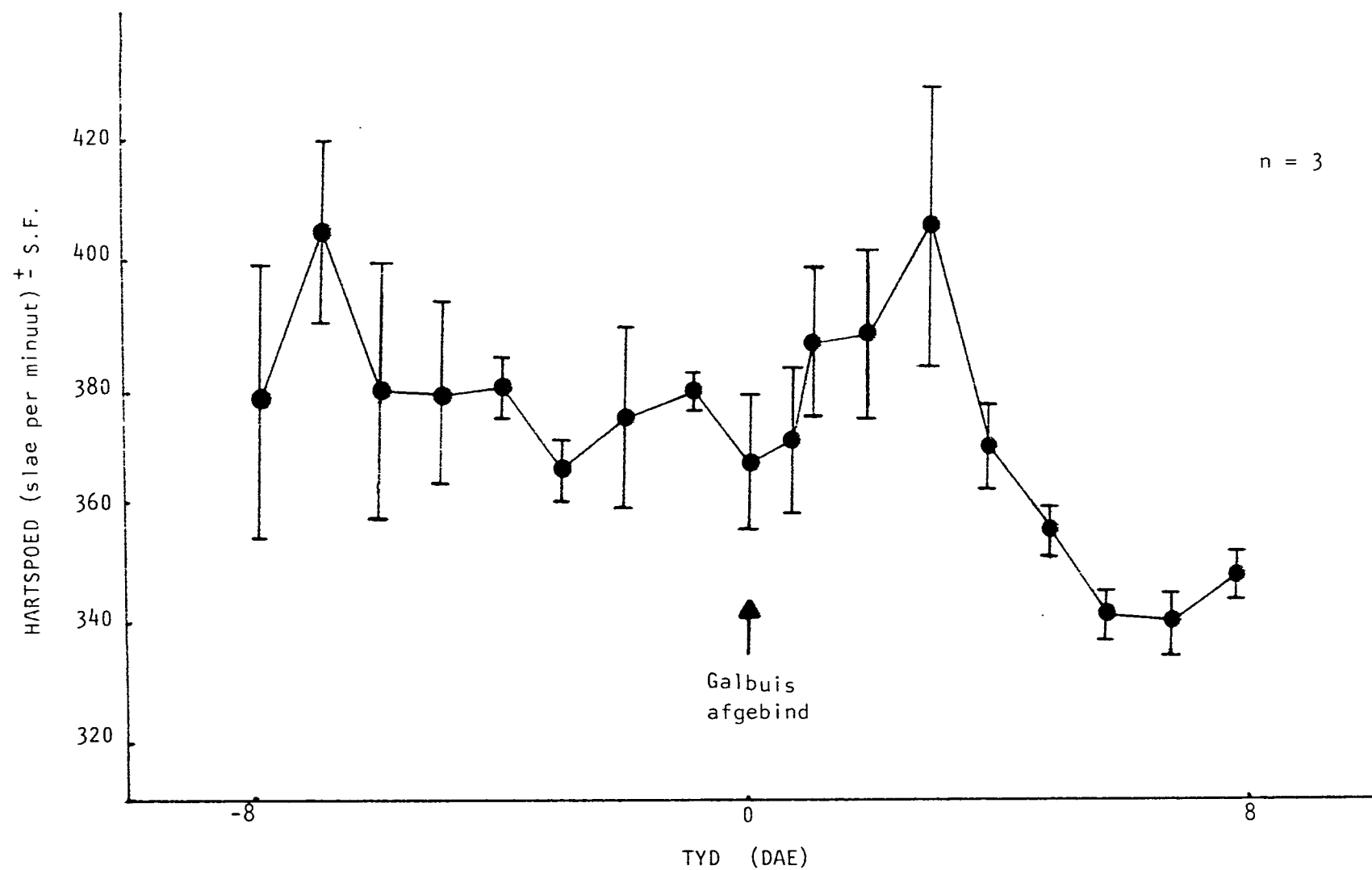


Fig. 3.1.2.a Effek van obstruktiwe geelsug op hartspoed

Om EKG's te registreer is die rotte in 'n metaalbak geplaas. Die grondelektrode is direk aan die bak gekoppel, terwyl twee van die ledemaat elektrodes d.m.v. knyp-elektrodes wat bokant die bak gehang het, aan die draadjies op die rug van die rotte gekoppel is (fig. 3.1.1.a). Dit was sodoende moontlik om goeie kwaliteit EKG's in die wakker, ongestremde rotte te registreer (fig. 3.1.1.a).

Obstruktiewe geelsug is teweeggebring deur die buikinhoud deur 'n midlyn-snit bloot te lê, die galbuis wat ongeveer 1 mm in deursnee is, te identifiseer, dit op twee plekke met sy-gare af te bind en dit dan tussen die afbindings deur te sny.

EKG's is daagliks op dieselfde tyd geneem vir 'n week vóór en 'n week ná galbuis-ligasie. Registrasies is 5 minute nadat die elektrodes gekoppel was, bekom en hartspoed is gemeet deur van die gemiddelde RR-tyd van 10 opeenvolgende komplekse gebruik te maak.

3.1.2. Resultate

Vier rotte is vir hierdie eksperiment gebruik. Een is kort na die galbuis-afbinding dood weens 'n gal-lekasie en gal-peritonitis. Hierdie rot is uit die berekeninge gelaat.

Soos in figuur 3.1.2.a gesien kan word, het die hartspoed in die voorbehandelings tydperk na 'n aanvanklike styging (waarskynlik weens die vreemdheid van die prosedure), relatief konstant gebly. Nadat die galbuis afgebind is, was daar aanvanklik 'n styging in hartspoed, waarskynlik weens die metaboliese respons op trauma en daarna 'n duidelike en statisties-betekenisvolle afname in hartspoed. As die aanvanklike hartspoed-styging en dié gedurende die eerste vier postoperatiewe dae buite rekening gelaat

word, was die gemiddelde hartspoed ($\pm$ S.D.) voor galbuisligasie 374 ± 21 en daarna 348 ± 11 slae per minuut. Die afname is statisties hoogs betekenisvol ($t = 4,2$; $p < 0,0005$).

Die rotte is op die 8ste dag na die uitlokking van obstruktiwe geelsug doodgemaak. Almal het duidelike geel verkleuring van die slymvliese gehad met erge dilatasie van die proksimale galbuis (± 5 mm in deursnee). Dit het helder, geel gal bevat.

3.1.3. Bespreking

Uit hierdie eksperiment is dit duidelik dat daar wel 'n duidelike bradikardie in Wistarrotte met obstruktiwe geelsug, intree. Dit vind betreklik gou plaas en is statisties hoogs betekenisvol. Dit was dus 'n aanduiding dat hierdie diere wel geskik sou wees om die negatief chronotrope effek van cholien-suur te bestudeer.

3.2. IN VIVO CHOLIENSUUR-TOEDIENING

3.2.1. Eksperimentele tegnieke

Kommersiële choliensuur (B.D.H. Biochemicals, ontleding 98-101%) is deurgans in eksperimente gebruik. Aangesien choliensuur baie swak oplosbaar in water is, is dit opgelos deur 0,2N NaOH met voortdurende kontrole van die pH, by te voeg. Deur ekwimolêre hoeveelhede NaOH by te voeg kon 'n oplossing met 'n pH van 7,4 verkry word. Gedistilleerde water is bygevoeg tot 'n finale choliensuurkonsentrasie van 40 mg/ml. Waar daar dus verder in hierdie verhandeling na choliensuur verwys word, word hierdie oplossing, d.w.s. natriumcholaat, bedoel.

In al die eksperimente is van manlike Wistarrotte met 'n liggaamsmassa van $\pm$ 250 g gebruik gemaak. Die rotte is voor die aanvang van elke eksperiment geweeg en uretaan (etielkarbaat) as narkosemiddel is intraperitoneaal in 'n dosis van 1,4 g/kg (0,6 ml per 100 g van 'n 25% oplossing), toegedien.

Nadat narkose uitgelok is, is die tragea, karotis arteries en jugularis venas deur disseksie blootgelê. Die tragea is gekanuleer en die rotte deurgans d.m.v. 'n S.R.I. ventilator vir klein proefdiere (5056) teen 50 asemhalings per minuut en 'n inspiratoriese druk van 20 cm H₂O geventileer.

Elektrokardiogramme (EKG's) en bloeddruk (BD) is direk gemeet d.m.v. naald-elektrodes in die ledemate en 'n kanule in die karotus kommunis arterie, respektiewelik. Lesings is op 'n 4-kanaal Hewlett-Packard registreerder (7754 A) gedoen. BD is deur 'n 8805 B voorversterker geregistreer d.m.v. 'n 1280 B sensor en dp/dt lesings is van die bloeddruk afgelei deur koppeling met 'n 8814 A voorversterker. Die EKG (afleiding II) is deur 'n 8811 A voorversterker geregistreer en hartspoed hiervan afgelei

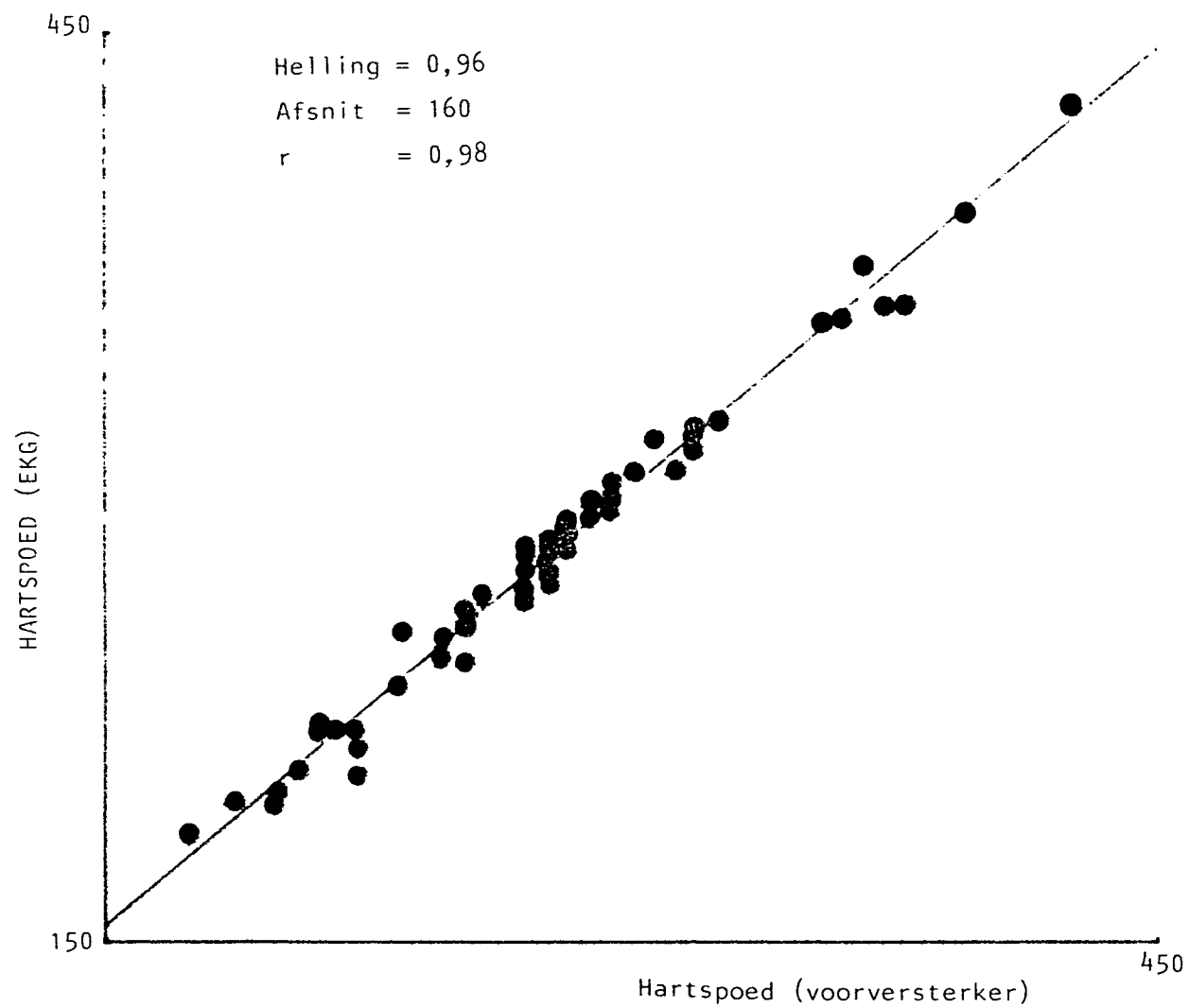


Fig. 3.2.1.a Akuraatheid van hartspoed deur 8812A voorversterker geregistreer

deur 'n 8812 A voorversterker. Fig. 3.2.1.a toon 'n vergelyking tussen hartspoed soos deur die 8812 A voorversterker 'geregistreer, vergeleke met die hartspoed, afgelei deur die gemiddelde RR-tyd van 10 komplekse op 'n gelyktydige EKG teen 'n opnamespoed van 100 mm/sek te bepaal. Hiervoor is 55 rotte gebruik.

Na korrekte plasing van al die kanules is daar vir 30 minute basislyn-registrasies geneem voordat choliensuur toegedien is.

Die choliensuur (40 mg/ml) is deur 'n mikrosput deur die kanule in die vena jugularis toegedien en daarna deurgespoel met 0,9% NaCl ($\pm$ 0,2 ml). 'n Dosis-respons effek is ondersoek deur 'n enkele dosering per rot toe te dien en 5 rotte vir elke dosering te gebruik. Daar is begin met 'n dosis van 5 mg/kg met inkremente van 5 mg/kg. Die maksimum dosis wat toegedien is, was 60 mg/kg.

3.2.2. Resultate

Hierdie resultate verteenwoordig die gegewens wat met 12 verskillende doserings (5 rotte per dosering) van choliensuur verkry is.

Die doserings van 5 tot 30 mg/kg het toenemende grade van sinusbradikardie uitgelok, sonder betekenisvolle veranderinge in die PR-tyd, vorm en duur van die QRS-kompleks of die QT-tyd. By die hoër doserings egter, het verskillende grade van atrioventrikulêre (A.V.)-blok ontstaan. Twee rotte is na die 40 mg/kg dosering dood a.g.v. totale hartstilstand wat deur 2^o en 3^o A.V. blok voorafgegaan is. Twee is na die 50 mg/kg en 3 na die 55 mg/kg dosis dood. Die 60 mg/kg dosis het 'n bykans onmiddellike hartstilstand in al die rotte uitgelok.

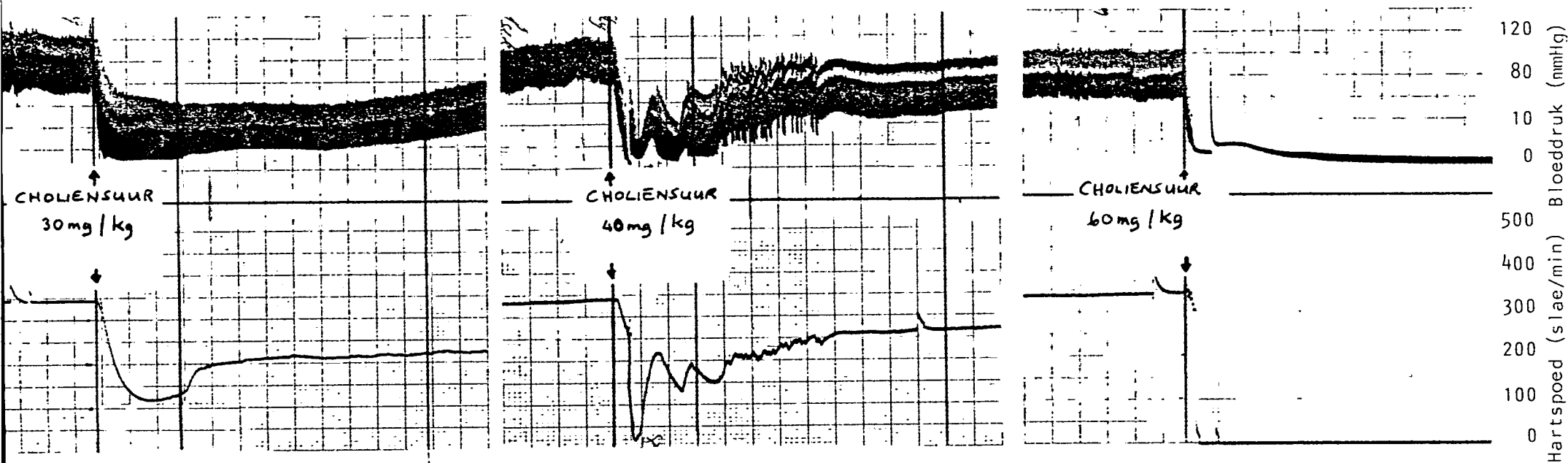


Fig. 3.2.2.a Verteenwoordigende registrasies van die effek van choliensuur-toediening op hartspoe en bloeddruk

In figuur 3.2.2.a is voorbeelde van verteenwoordigende registrasies van die vernaamste veranderinge wat ingetree het en in fig. 3.2.2.b word voorbeelde van die EKG-veranderinge wat waargeneem is, getoon. Die dosis-effek verband t.o.v. gemene bloeddruk (diastoliese druk + $\frac{2}{3}$ van die polsdruk word in figuur 3.2.2.c getoon, terwyl die verband t.o.v. hartspoed (ventrikulêr) in fig. 3.2.2.d (1 minuut na choliensuur-toediening) en fig. 3.2.2.e (maksimum afname binne eerste minuut) aangetoon word. In tabel 3.1.2.a word die veranderinge in terme van sinusbradikardie, A-V blok en mortaliteit getoon.

3.2.3. Bespreking

Uit die voorafgaande resultate is dit duidelik dat intraveneuse choliensuurtoediening wel 'n afname in hartspoed teweegbring. In doserings van 5-15 mg/kg is hierdie afname onvoorspelbaar, maar in die hoër doserings word dit sonder uitsondering uitgelok.

Op grond van die EKG-veranderinge is dit dus duidelik dat die hartspoedafname wat deur laer choliensuurdoserings uitgelok word, die gevolg van 'n sinusbradikardie sonder enige geleidingsprobleme is, aangesien die PR-tyd, QRS-voorkoms en QRS-duur nie verander nie. By die hoër doserings is daar duidelike effekte as gevolg van geleidingsvertraging deur die A-V-knoop met uiteindelijke totale A-V-dissosiasie. Ekstreme toksisiteit word as totale afwesigheid van elektriese aktiwiteit (elektrokardiografies gemeet) met hartstilstand, gemanifesteer.

Choliensuur het ook deurgans 'n duidelike bloeddruk-daling veroorsaak, alhoewel daar soms na 'n aanvanklike daling 'n styging bokant kontrole-waardes was (fig. 3.2.3.a). Hierdie

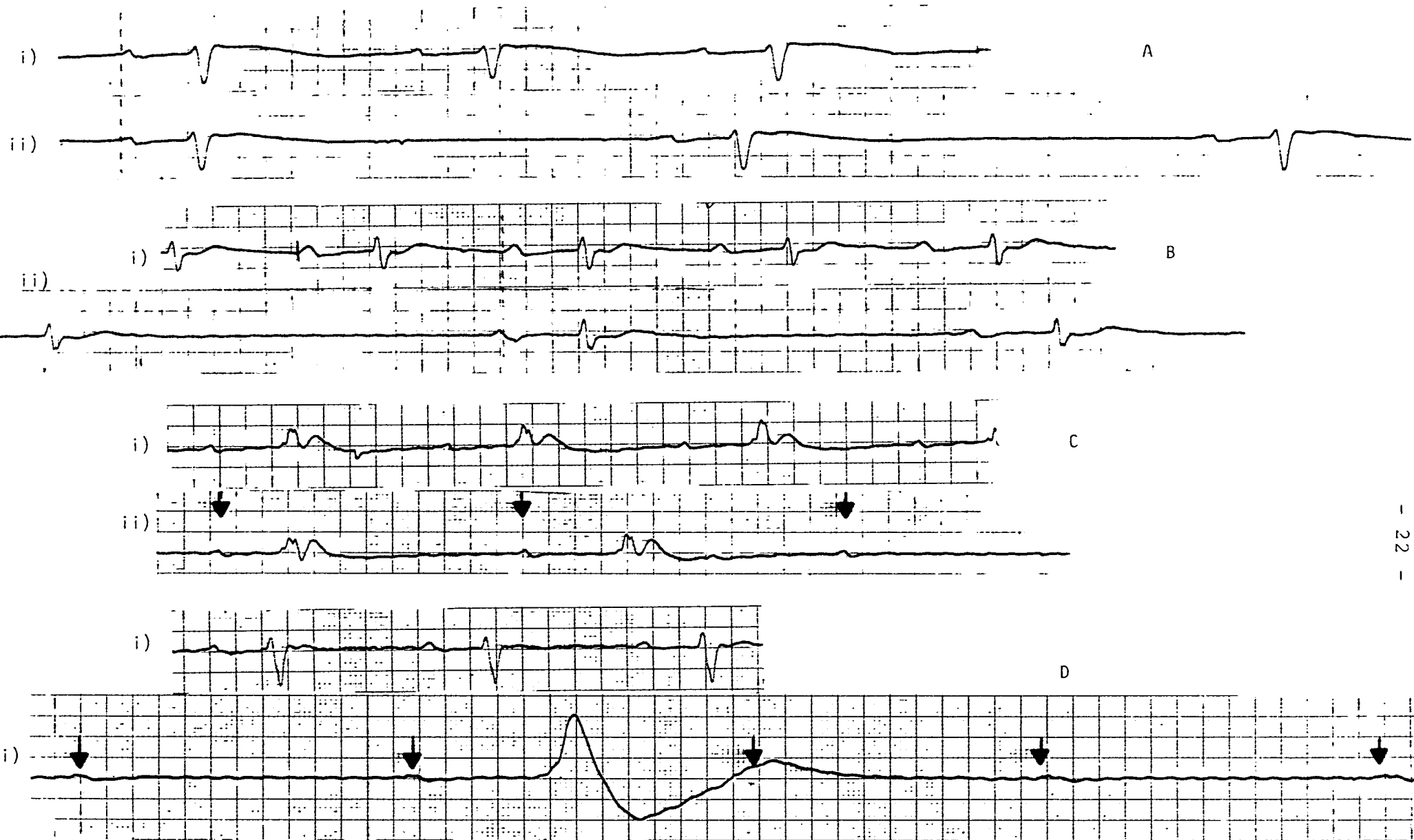


Fig. 3.2.2.b

Voorbeelde van EKG-veranderinge a.g.v. choliensuur, sinus bradikardie (A), 1° AV blok (B), 2° AV blok (C) en totale AV-dissociatie (D) met erg abnormale QRS-komplekse (i-voor en ii-na choliensuurtoediening).

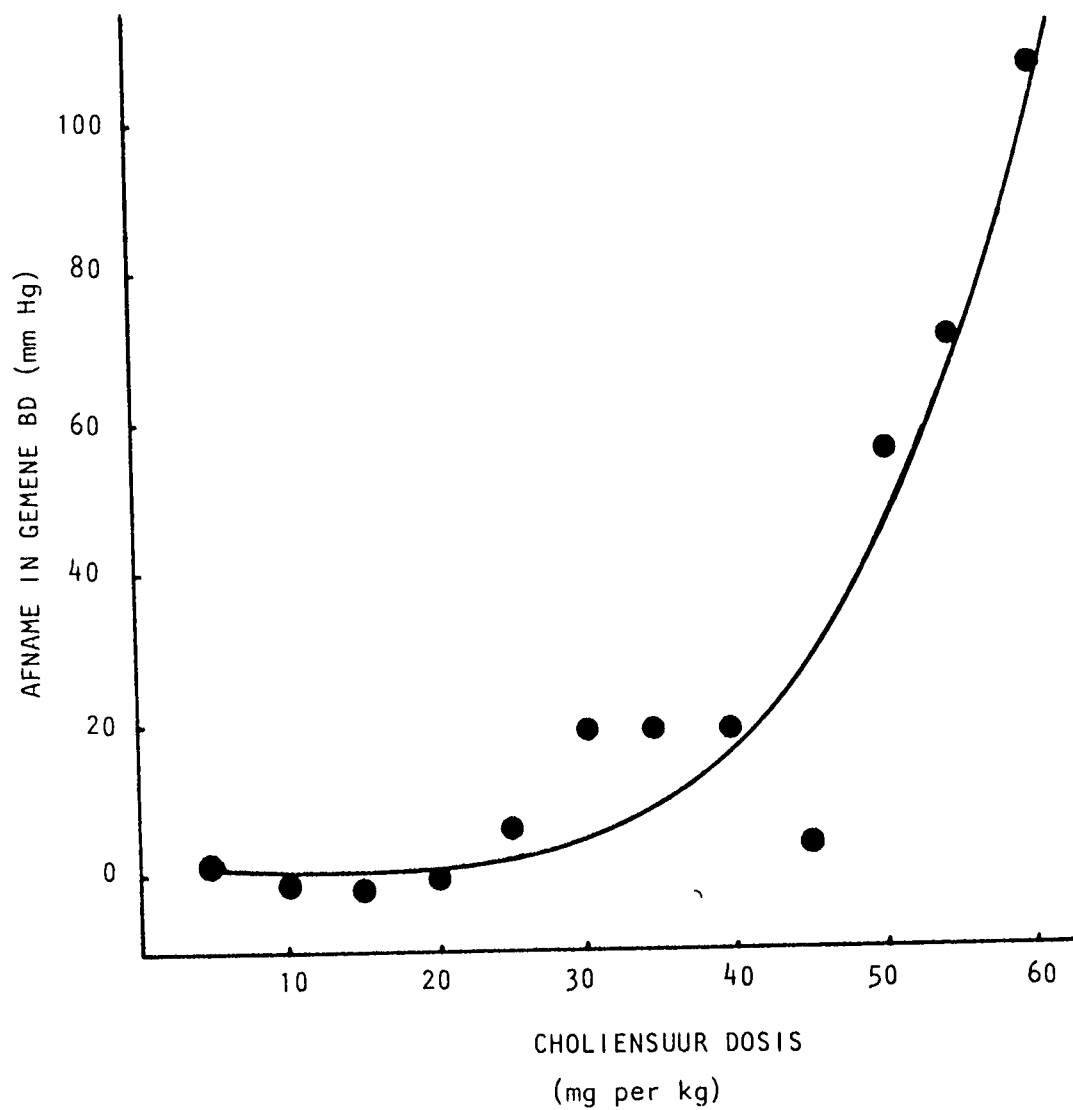


Fig. 3.2.2.c Effek van choliensuurtoediening op gemene bloeddruk,
1 minuut na toediening gemeet.

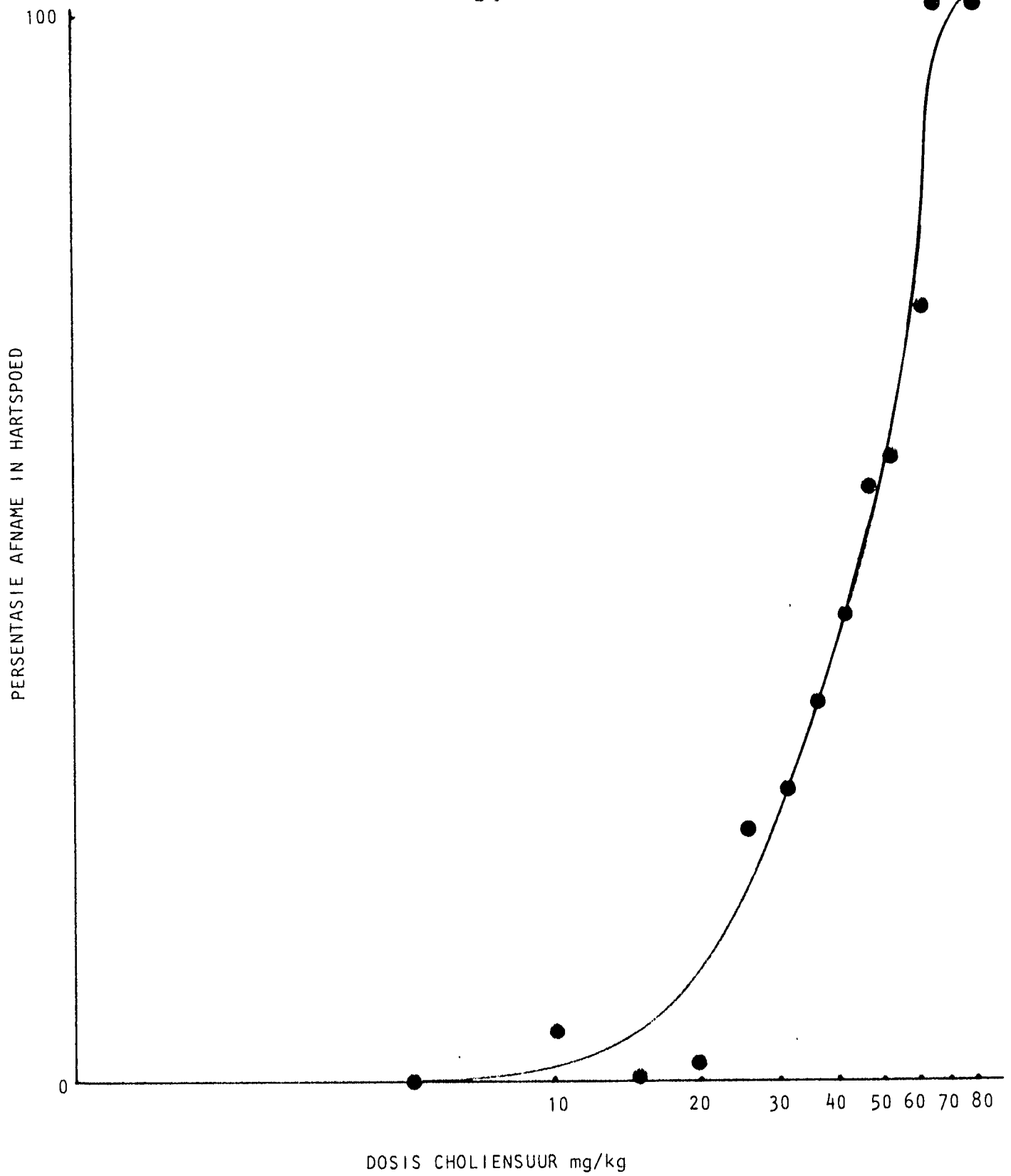


Fig. 3.2.2.d Effek van choliensuur op hartspoed 1 minuut na toediening

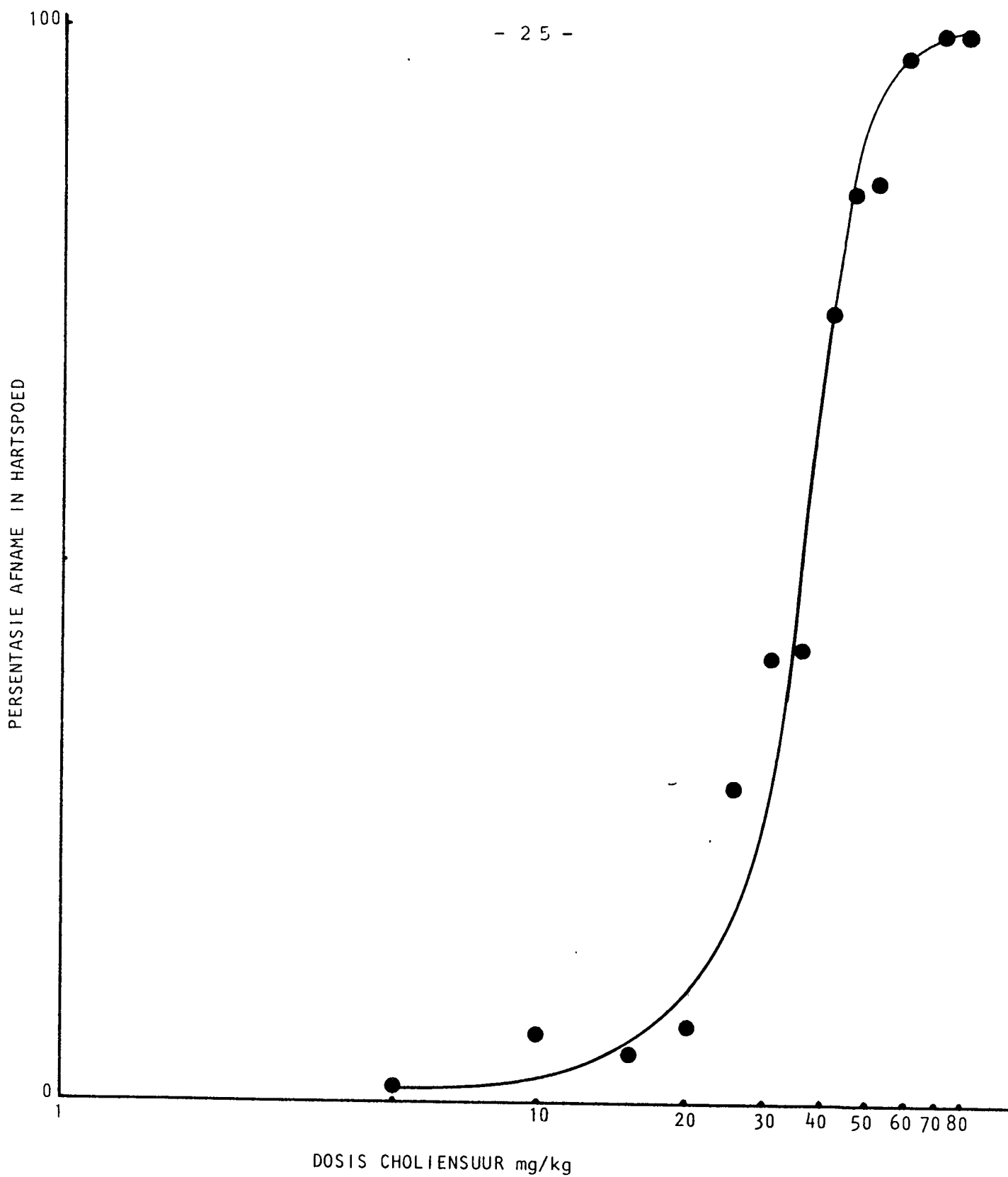


Fig. 3.2.2.c Effek van choliensuur op hartspoed, gemeet as die maksimum afname gedurende die eerste minuut na choliensuur-toediening.

DOSERING mg/kg	AANTAL ROTTE WAT HARTSPOED-AFNAME GETOON HET		AANTAL ROTTE WAT SINUS- BRADIKARDIE 1 MIN NA CHOLIENSUUR GETOON HET	AANTAL ROTTE WAT ATRIO-VENTRIKULÈRE BLOK GETOON HET		MORTALITEIT (AANTAL ROTTE)
	1 min na choliensuur	4 min na choliensuur		2°	3°	
5	1	1	1	-	-	-
10	4	3	4	-	-	-
15	3	1	3	-	-	-
20	5	1	5	-	-	-
25	5	4	5	-	-	-
30	5	5	5	-	-	-
35	5	5	4	1	-	-
40	5	5	5	2(4min)	-	2
45	5	5	1	4	-	-
50	5	5	1	4	1	2
55	5	5	2	2	1	3
60	5	5	-	-	-	5

Tabel 3.2.2.a Effek van choliensuur op hartspoe, SA-node, AV-geleiding en oorlewing
(5 rotte per dosering)

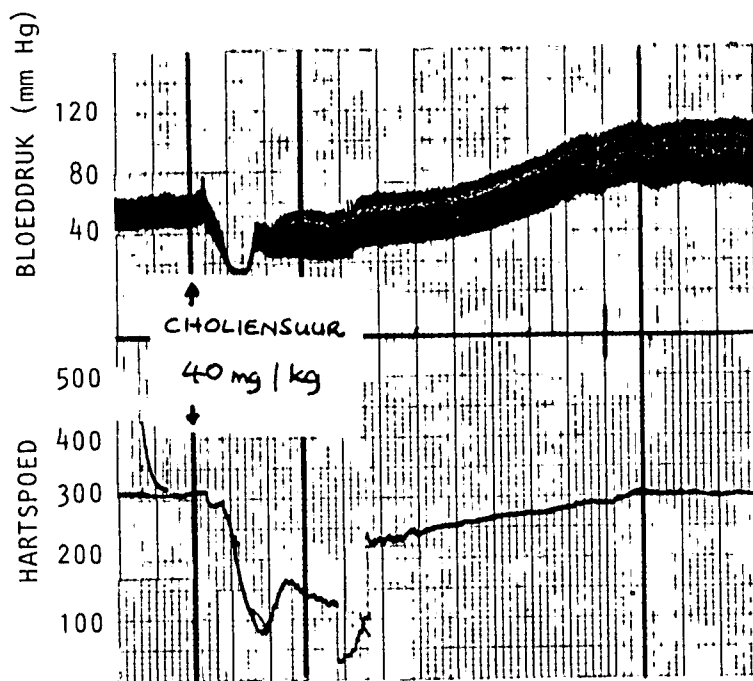


Fig. 3.2.3.a Voorbeeld van 'n eksperiment waar daar na 'n aanvanklike daling in bloeddruk, 'n styging bokant kontrole waardes plaasgevind het.

bloeddrukdaling kan deels te wyte wees aan die verlaagde kardiale uitwerp wat a.g.v. die bradikardie ontstaan. Geen voorspelbare effek kon op die dp/dt registrasies aangetoon word nie, maar aangesien die kateter in die karotis arterie en nie in die linker ventrikel was nie, kan nie veel peil op hierdie parameter as 'n indeks van intraventrikulêre drukveranderinge getrek word nie²⁴ en gevolglik is die studie van die effek op kontraktiliteit gelaat vir die in vitro situasie.

Die bradikardie wat met die laer choliensuurdoseringe ontstaan, kan dus in teoretiese terme die gevolg van 'n direkte of indirekte effek, of beide, op die S.A. node wees. In die lig van uiteenlopende bevindings in die literatuur het dit op hierdie stadium onwaarskynlik gelyk dat die effek van choliensuur op grond van 'n enkele meganisme verklaar kan word en dat daar liewers in terme van 'n multifaktoriale meganisme gedink moes word.

In die situasie met hoër doseringe choliensuur is die waarskynlikste moontlikheid vir die ernstige geleidingsprobleme en onderdrukking van outomatisiteit, direkte selskade.

In die lig van die bevindings wat tot op hierdie tydstip verkry is, is besluit om die invloed van die outonome senuweestelsel op verskillende vlakke op die effek van choliensuur te bestudeer, en om daarna die effekte in vitro in geïsoleerde rotatrium-preparate te ondersoek.

3.3. ROL VAN DIE OUTONOME SENUWEESTELSE IN VIVO

3.3.1. Eksperimentele tegnieke

Hierdie reeks eksperimente is uitgevoer om duidelikheid te probeer verkry oor die rol van die outonome senuweestelsel t.o.v. die negatief chronotrope effek van choliensuur.

In al hierdie eksperimente is slegs 4 van die 12 doserings van die aanvanklike dosis-responskurwe gebruik. Hulle is gekies uit 'n relatief liniêre gedeelte van die kurwe. Elk van hierdie doserings (nl. 15, 30, 35 en 40 mg/kg) is aan 5 rotte toegedien. Die narkose en ander basiese tegnieke was soos in hoofstuk 3.2.1. beskryf.

Eksperimente is onder die volgende omstandighede uitgevoer:

- i) na bilaterale vagotomie in die nek;
- ii) na toediening van atropien-sulfaat (0,5 mg/kg intraveneus)²⁵;
- iii) na ganglion blokkade met pentolinium-tartraat (5 mg/kg intraveneus)²⁵;
- iv) na reserprien-toediening (2,5 mg/kg vir drie dae)²⁵;
- v) na deserebrasie deur bloedtoevoer na die brein af te sluit met 'n stywe tourniquet hoog-op in die nek en vernietiging van die brein deur die oogkas met 'n no. 15 hipodermiese naald;
- vi) deur kopwaartse toediening van choliensuur deur die karotis kommunis arterie.

3.3.2. Resultate

Aangesien die maksimum afname in hartspoed

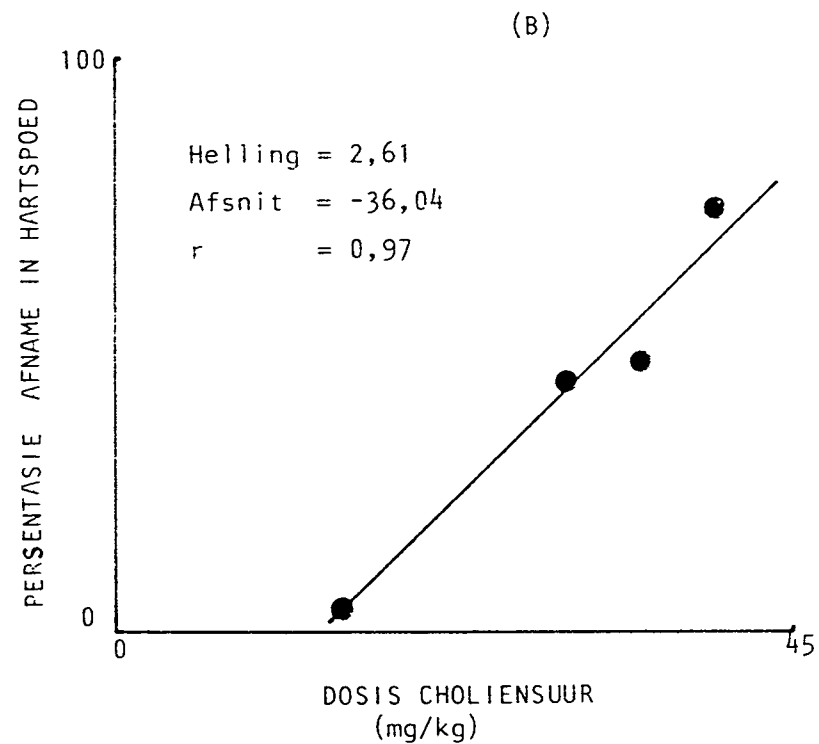
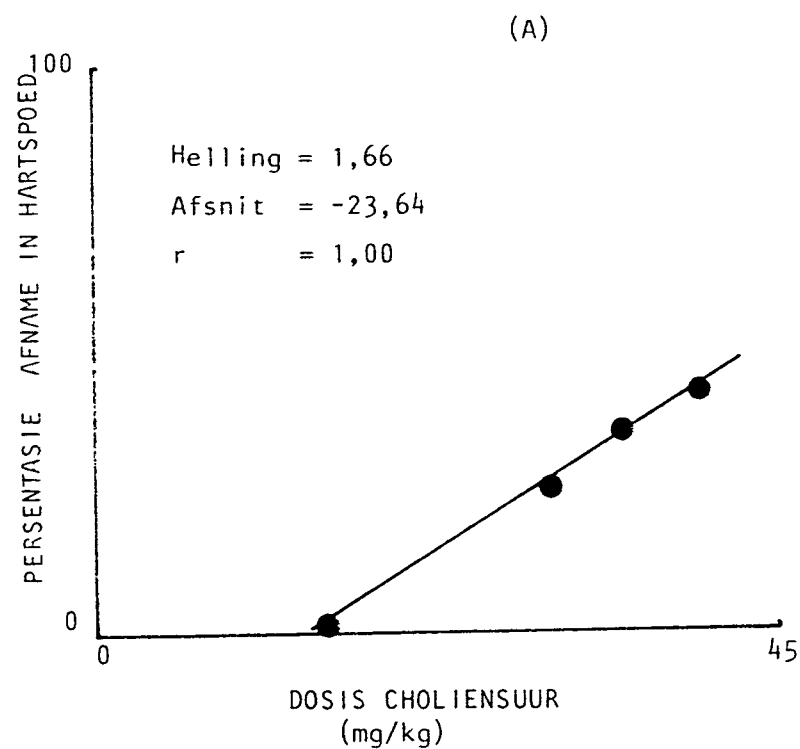


Fig. 3.3.2.a Vergelyking tussen die afname in hartspoeed 1 minuut na choliensuurtoediening (A) en die maksimum afname in hartspoeed gedurende die eerste minuut (B).

gedurende die eerste minuut groter was as die hartspoed-afname presies een minuut na choliensuurtoediening (figuur 3.3.2.a) en die hartspoed-registreerder betroubaar bevind is (fig. 3.2.1.a), is die vergelykings getref t.o.v. die maksimum afname in hartspoed gedurende die eerste minuut.

3.3.2.1. Uitskakeling van die parasimpatikus

Vagotomie, sowel as atropien-toediening het 'n statisties-betekenisvolle afname in die negatief chronotrope effek van choliensuur veroorsaak (fig. 3.3.2.1.a). Na vagotomie en atropientoediening was daar 'n betekenisvolle toename in hartspoed, sodat die aanvangs-hartspoed in hierdie rotte hoër was as in die kontrole-groep. Die verandering in hartspoed is egter deurgans as 'n persentasie uitgedruk om so-doende hierdie verskil uit te skakel.

3.3.2.2. Uitskakeling van die simpatikus

In hierdie groep rotte het die 15, 35 en 40 mg per kg dosering 'n groter en die 30 mg per kg dosering kleiner effekte as in die kontrole rotte uitgelok (fig. 3.3.2.2.a), die helling van die dosis-respons kurwe was egter effens steiler as dié van die kontrole rotte.

3.3.2.3. Uitskakeling van beide die simpatikus en parasimpatikus

Fig. 3.3.2.3.a toon die invloed van ganglionblokkade met pentolinium, en deserebrasie op die negatief-chronotrope effek van choliensuur. In albei modelle was die

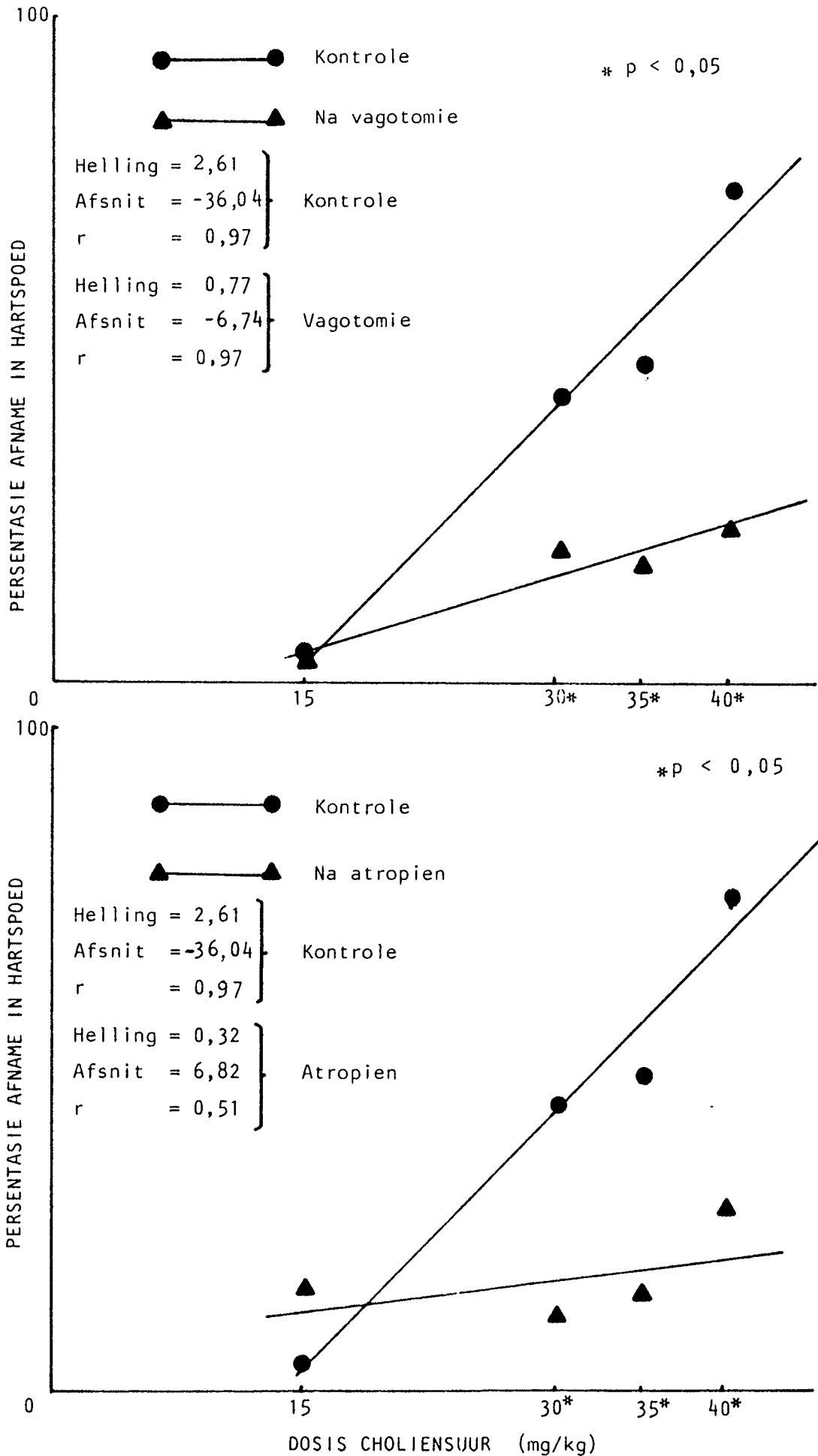


Fig. 3.3.2.1.a Effek van uitskakeling van die parasimpatikus

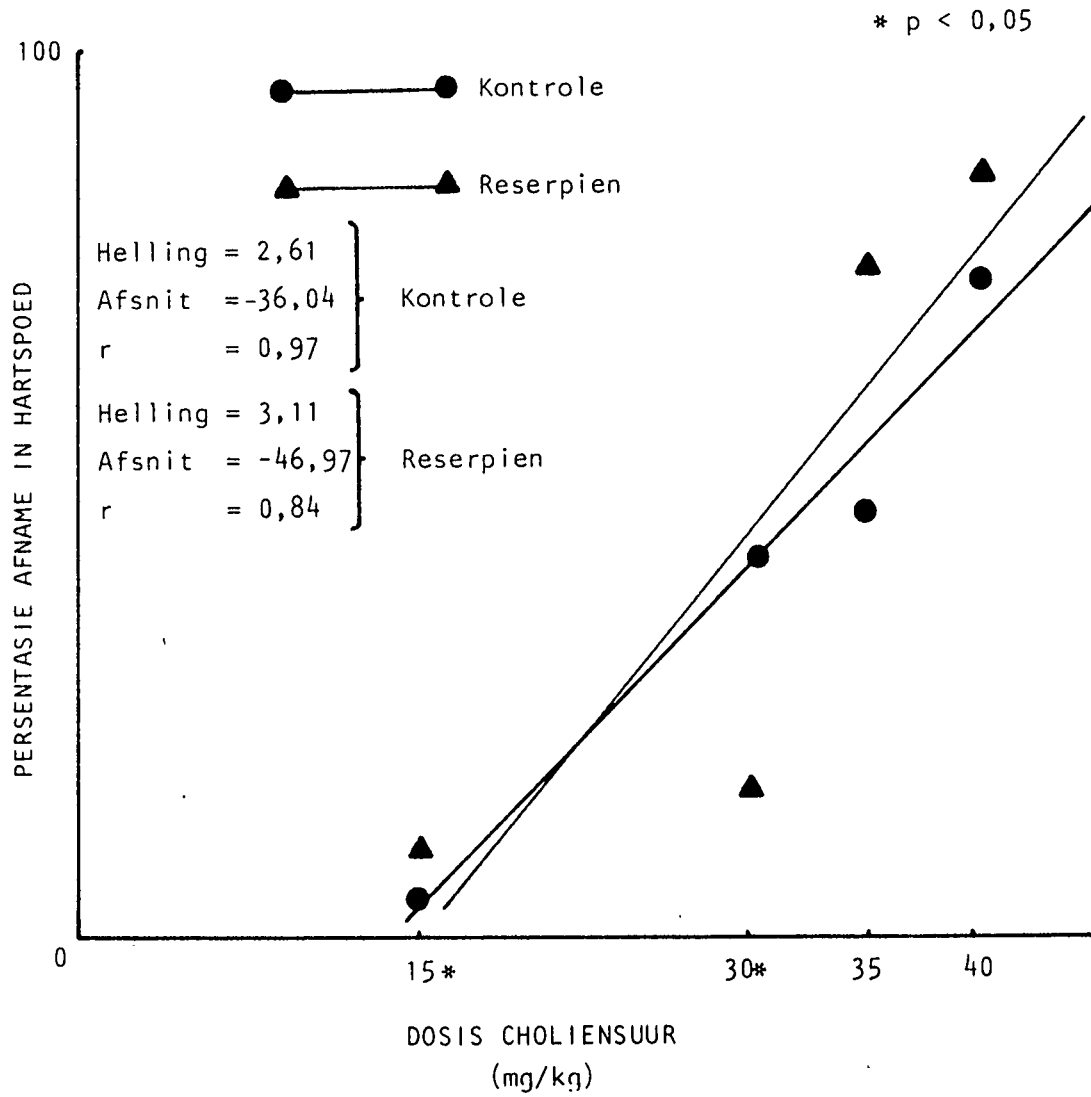


Fig. 3.3.2.2.a Effek van die uitskakeling van die simpatikus met reserpien op die effek van choliensuur op hartspoed.

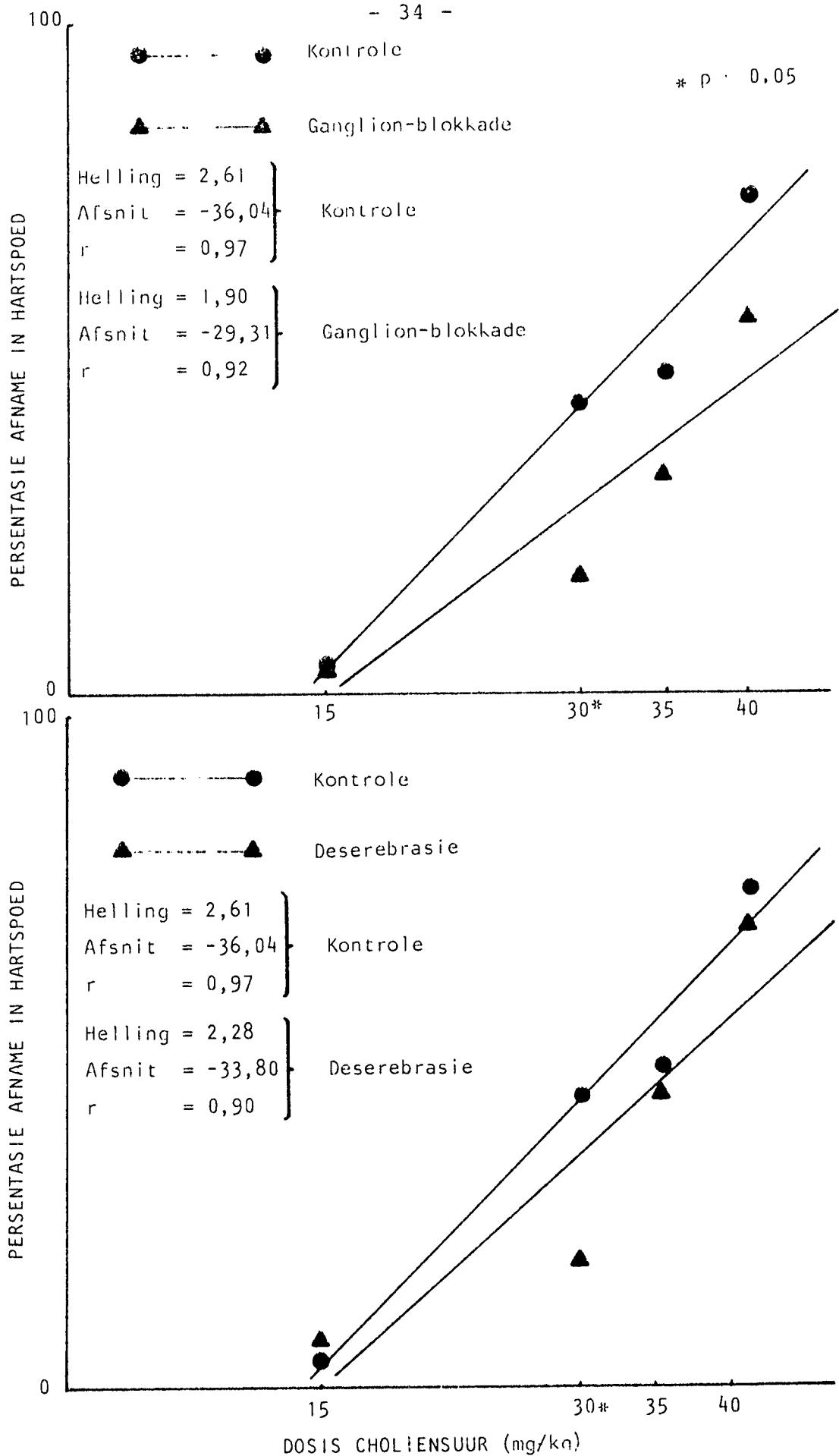


Fig. 3.3.2.3.a Effek van uitskakeling van beide die simpatikus en die parasimpatikus op sentrale en ganglioniese vlak.

choliensuur-effek verminder, alhoewel dit in beide gevalle slegs statisties betekenisvol vir die 30 mg per kg doserings was. Die afname in die negatief chronotrope effek van choliensuur was egter nie so uitgesproke as na atropien-toediening of vagotomie nie.

3.3.2.4. Intra-karotis toediening van choliensuur

Hierdie eksperiment is uitgevoer om 'n moontlike sentrale vagus-prikkeling deur choliensuur te ondersoek, met die idee dat toediening in die karotis kommunis arterie die effek van choliensuur sou potensieër.

Soos uit die resultate blyk (fig. 3.3.2.4.a) was die effek van choliensuur deur die arterie toegedien, opvallend en betekenisvol minder as in kontrole rotte.

3.3.3. Bespreking

Die opvallendste waarneming wat deur hierdie reeks eksperimente na vore gebring is, was die feit dat uit-skakeling van die parasimpatikus, óf deur atropien-toediening óf deur bilaterale vagotomie, die negatief chronotrope effek van choliensuur betekenisvol verminder, maar nie totaal opgehef het nie.

Dit is dus duidelik dat die vagus op een of ander manier gedeeltelik by die bradikardie wat in vivo deur choliensuur uitgelok word, betrokke is. Moontlike meganismes waardeur hierdie vagotoniese effek uitgelok kan word sluit dus 'n sentrale vagus-stimulasie soos deur sommige werkers gepostuleer is¹⁹, efferente stimulasie (op ganglion-vlak of by die senu-eindes) of afferente stimulasie, bv. vanuit die karotussinus of aortaboog, in²⁵.

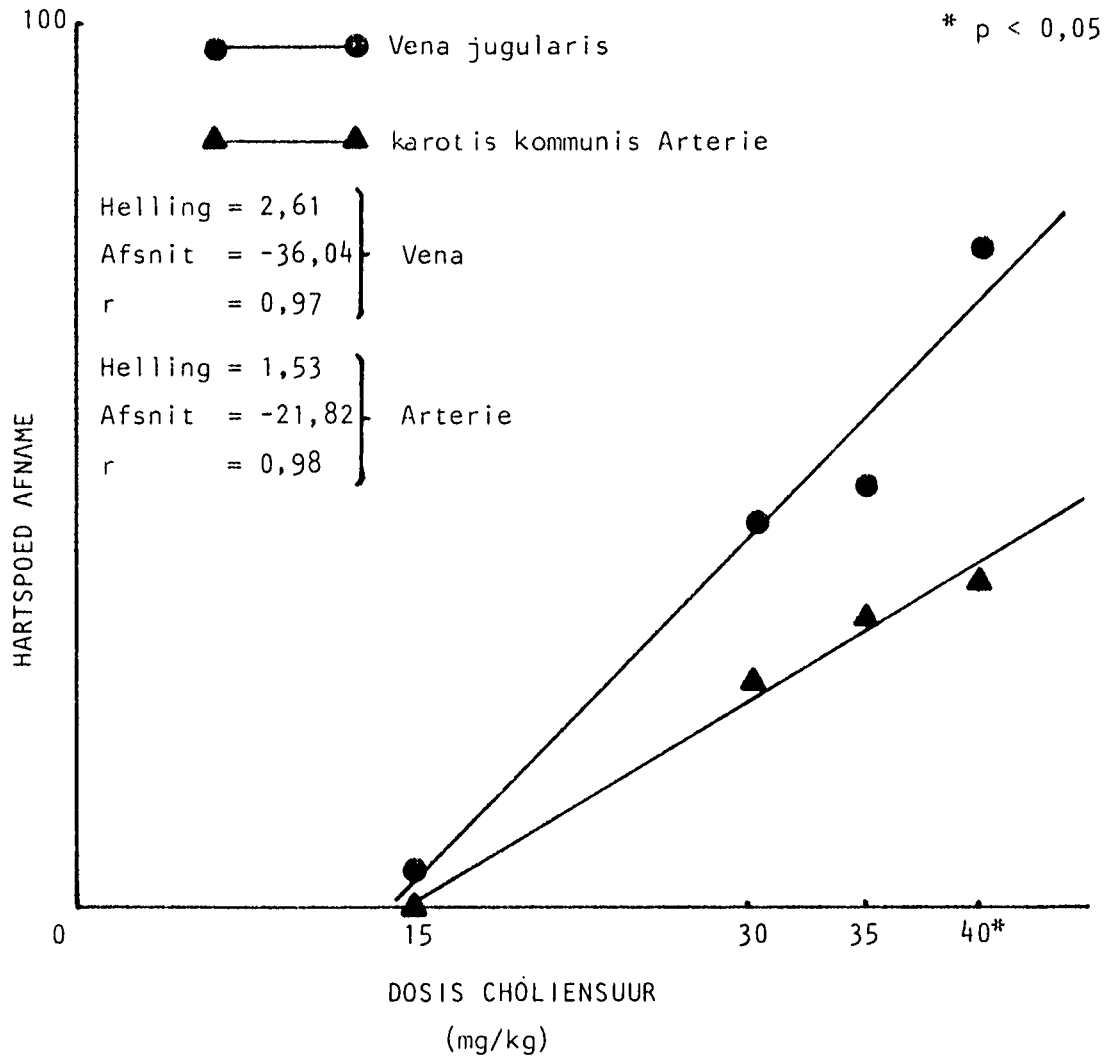
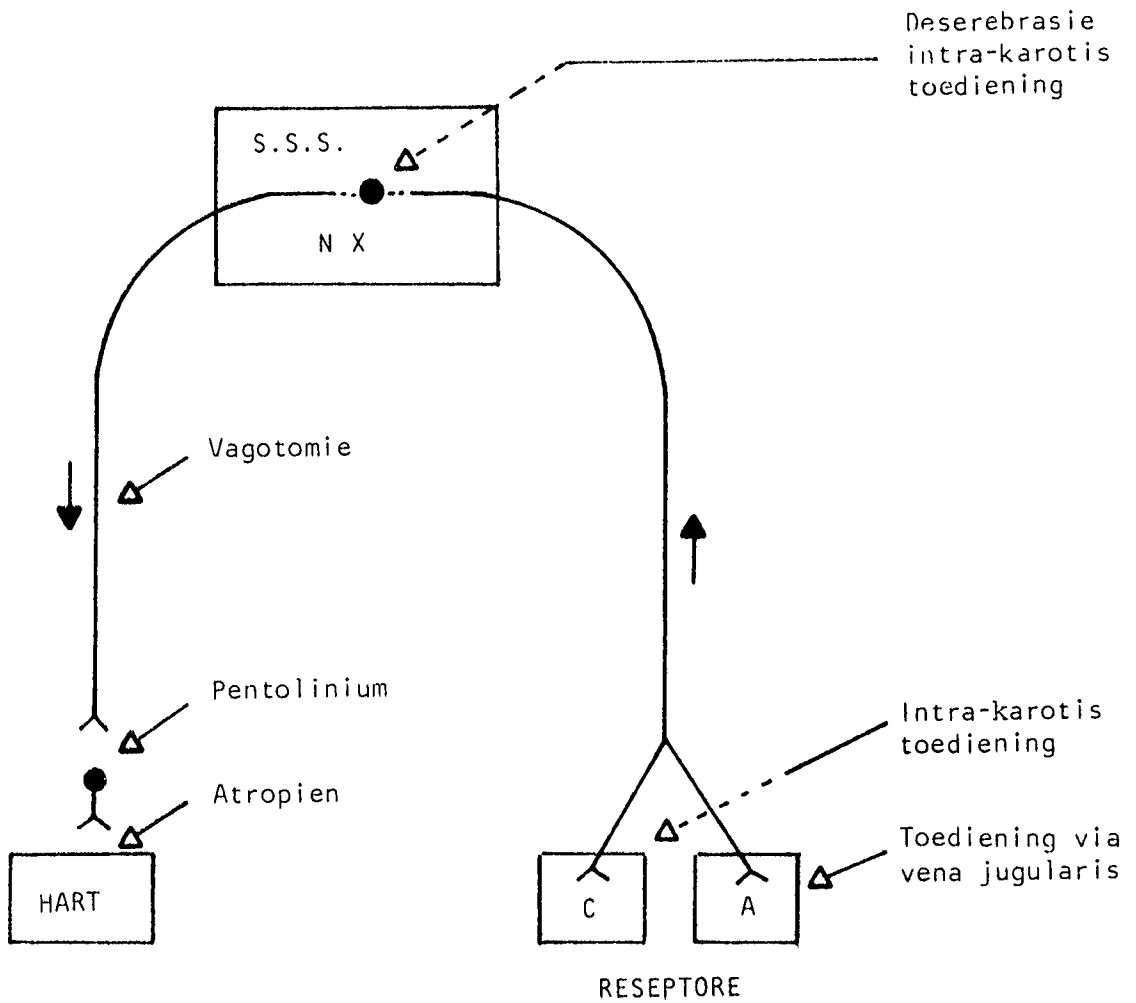


Fig. 3.3.2.4.a Vergelyking tussen die effek van intraveneuse (vena jugularis) en intra-arterieële (karotus kommunis) toediening van cholien- suur op hartspoed.

Laasgenoemde meganisme is al gedeeltelik eksperimenteel bevestig t.o.v. die hartglikosiede²⁹. In figuur 3.3.3.a word moontlike setels van werking t.o.v. die vagus geïllustreer en die rol van die verskillende eksperimentele tegnieke daarin, toegelig.

Direkte stimulasie van die parasimpatiese ganglia as 'n moontlike meganisme is uitgeskakel weens: i) die feit dat vagotomie in die nek (d.w.s. proksimaal tot die ganglia) dieselfde effek as atropien-toediening (wat by die senu-eindes 'n vagolitiese effek uitoefen) uitlok en ii) dat deserebrasie (d.w.s. uitskakeling van die vagus proksimaal tot die ganglia) ook 'n vermindering in die negatief chronotrope effek van choliensuur veroorsaak het wat ooreengestem het met die invloed van ganglionblokkering. Die feit dat die effek na deserebrasie nie presies ooreengestem het met dié na ganglionblokkade nie, mag aan onvolledige deserebrasie te wyte gewees het.

Galsure word nie besonder goed passief uit die dermkanaal geabsorbeer nie en die hoofmeganisme van absorpsie is aktiewe transport wat in die ileum plaasvind². Alhoewel geen literatuur t.o.v. die beweging van choliensuur oor die bloed-brein skans gevind kon word nie, lyk dit onwaarskynlik dat so 'n aktiewe transportmeganisme daar bestaan. Indien choliensuur wel die bloed-breinskans geredelik kruis en sy vagotoniese effek a.g.v. 'n sentrale stimulasie uitoefen, sou 'n mens verwag het dat toediening deur die karotis kommunis arterie (wat direkte toegang aan 'n gekonsentreerde bolus tot die serebrale sirkulasie verleen) 'n uitgesproke vagotoniese effek sou hê, en dat dit baie meer uitgesproke as die effek na intraveneuse toediening sou wees. Dit was nie die geval nie. Die effek was in teën-



S.S.S. = Sentrale senuweestelsel
 C = karotissinus
 A = Aortaboog
 N X = Vagus-nukleus

Fig. 3.3.3.a Skematiese voorstelling van die afferente en efferente komponente van die vagus t.o.v. effekte op die hart, met 'n aanduiding van die spesifieke komponent wat deur elke eksperiment ondersoek is.

deel, minder as na intraveneuse toediening. Hierdie waarneming het ook terselfdertyd 'n meganisme wat op karotissinus-stimulasie berus, uitgeskakel.

Die vagotoniese effek van choliensuur moet dus toegeskryf word aan 'n perifere reseptor-stimulasie wat nie in die karotissinus plaasvind nie. Afferente senu-eindes van die vagus in die aortaboog is goed beskryf²⁵, maar daar bestaan moontlik ook reseptore in die atria en ventrikels. Op grond van die eksperimentele gegewens is die waarskynlikste meganisme dus vagus-stimulasie a.g.v. prikkeling van aortaboog-reseptore, alhoewel die invloed van reseptore in die hart nie uitgeskakel is nie.

Die moontlikheid van 'n direkte simpatolitiese effek van choliensuur is uitgeskakel deur die feit dat reserpienbehandeling nie die negatief-chronotrope effek van choliensuur opgehef het nie, maar eerder 'n neiging getoon het om dit te potensieër. Dit dui daarop dat die intakte simpatikus eerder die effek van choliensuur teëgaan.

Met hierdie gegewens is dit dus moontlik om te postuleer dat die effek van choliensuurtoediening aan kontrole-rotte t.o.v. hartspoed, as volg saamgestel is:

$$E_k = D + V - S$$

E_k = effek van choliensuur in kontrole rotte (afname)

D = direkte effek van choliensuur (afname)

V = vagotoniese effek van choliensuur (afname)

S = refleks simpatiese stimulasie (toename)

In die eksperimentele situasie sou 'n mens dan verwag dat:

i) Die effek van vagotomie (E_v) = D - S

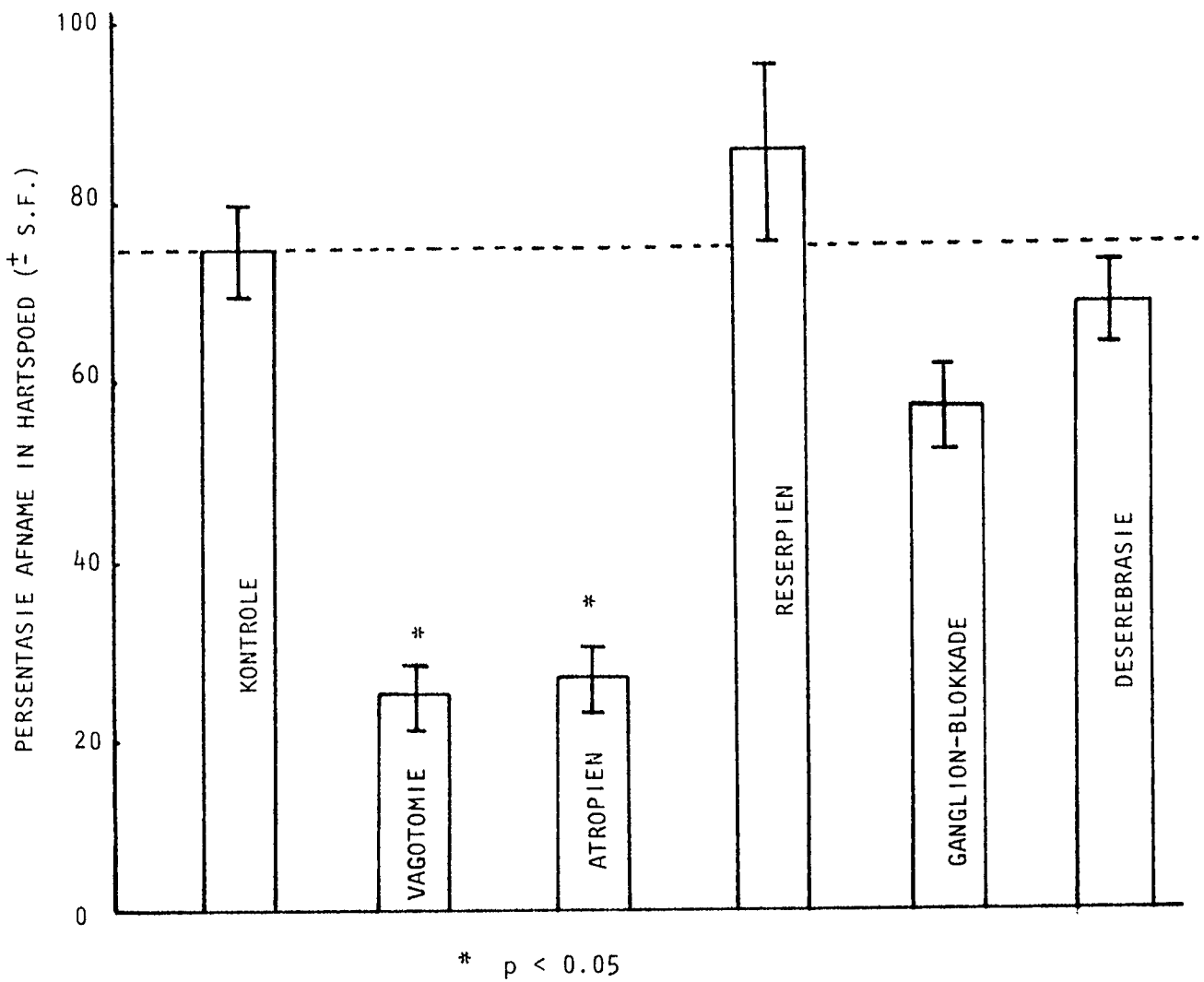


Fig. 3.3.3.b Vergelyking tussen die effekte wat deur 40 mg/kg choliensuur uitgelok is in die in vivo eksperimente om die rol van die outonome senuwstelsel te bestudeer

ii) Die effek van reserpien (E_r) = D + V

iii) Die effek van ganglionblokkade (E_g) = D

Die effek na ganglionblokkade verteenwoordig m.a.w. die "ware" direkte in vivo effek van choliensuur.

Indien die 40 mg per kg choliensuur-dosering deur 'n direkte effek op die hart, 'n 50% afname in hartspoed veroorsaak, en 'n verdere 40% afname a.g.v. vagus-stimulasie, en indien verder aangeneem word dat daar as gevolg hiervan 'n 20% toename in hartspoed weens refleks toename in simpatikustonus plaasvind, sou die volgende persentasies afname in hartspoed onder die verskillende eksperimentele omstandighede verwag kon word:

$$E_k = 50 + 40 - 20 = 70\%$$

$$E_v = 50 - 20 = 30\%$$

$$E_r = 50 + 40 = 90\%$$

$$E_g = 50\%$$

In figuur 3.3.3.b word die effekte wat onder die verskillende eksperimentele omstandighede waargeneem is, getoon en die persentasie afname in hartspoed was E_k (74%), E_v (26%), E_r (85%) en E_g (56%). Hierdie persentasies vergelyk goed met die hipotetiese situasie hierbo.

Dit was dus uit hierdie reeks eksperimente duidelik dat choliensuur 'n vagotoniese effek het, maar dat daar ook 'n direkte effek wat onafhanklik van outonome innervering is, bestaan. Die volgende reeks eksperimente is dus in vitro gedoen (geïsoleerde atria) om die direkte effek van choliensuur op hartspoed, te bestudeer.

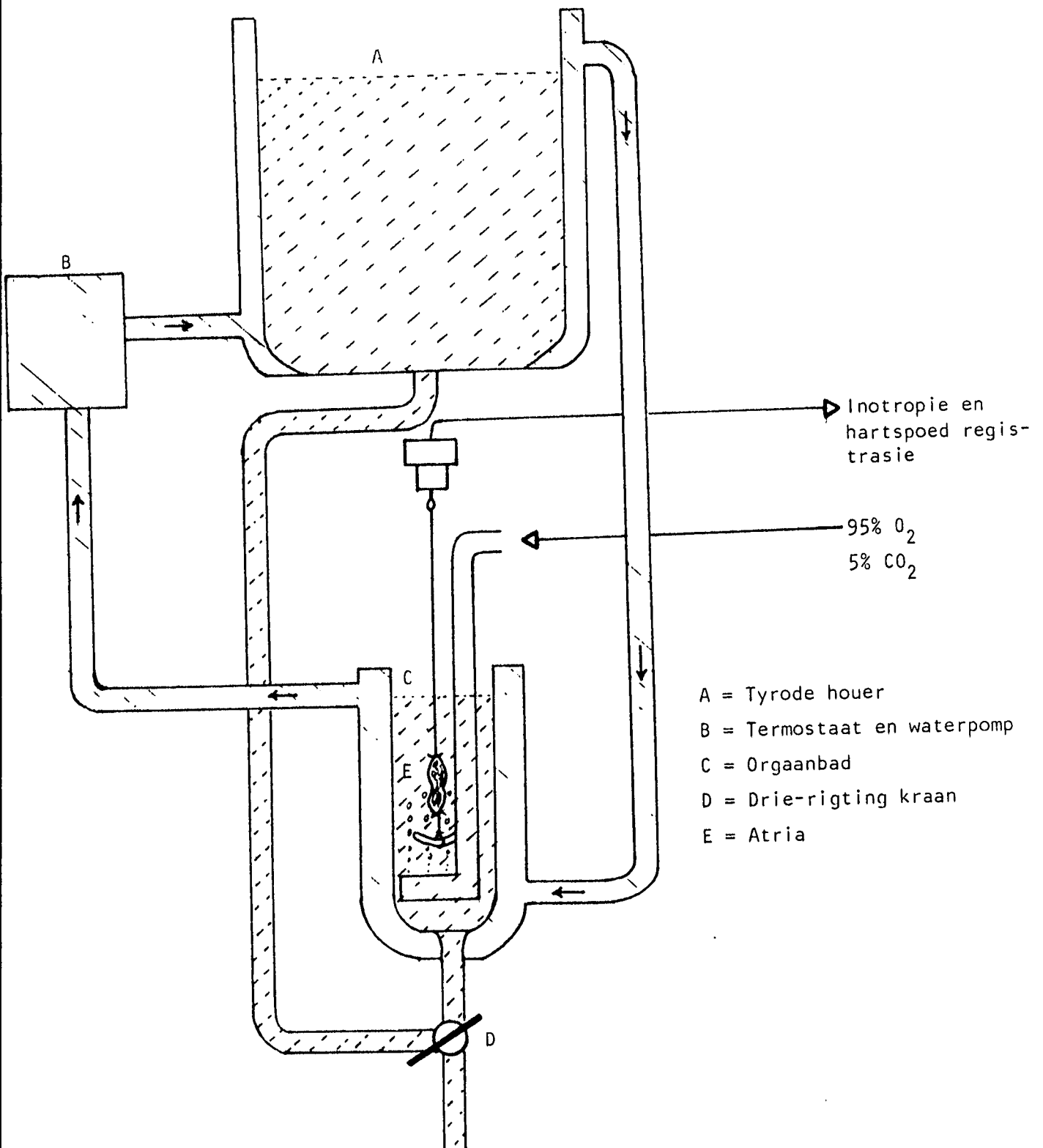


Fig. 3.4.1.1.a Skematiese voorstelling van apparaat gebruik vir die in vitro studies.

3.4. IN VITRO EFFEKTE VAN CHOLIENSUUR

3.4.1. Spontaan-kloppende atria

3.4.1.1. Eksperimentele tegnieke

Volwasse Wistarrotte is deur 'n harde hou op die kop gedood en die hart onmiddellik verwyder. Die hart is daarna in koue (4°C) Tyrode-oplossing²⁸ geplaas.* Die atria is hierna met 'n skerp skêr van die ventrikels losgeknip en die groot venas gelyk met die atriumoppervlakte afgeknip.

Die atria is in 'n orgaanbad met Tyrode (37°C), waardeur 'n mengsel van 5% koolsuurgas en 95% suurstof geborrel is, geplaas. 'n Basale spanning van 0,2 gram is aangebring deur 'n verstelbare mikrostaander te gebruik. Spanning is d.m.v. 'n Hewlett-Packard FTA-10-1 HP drukgeleier en 'n 8805 B voorversterker geregistreer en hartspoed is van die sametrekking afgelei met 'n 8812 A voorversterker. Die samestelling van die apparaat word skematies in figuur 3.4.1.1.a voorgestel.

Die preparate is toegelaat om vir 30 minute te stabiliseer, waarna die orgaanbad tweemaal uitgespoel is en met 50 ml vars Tyrode gevul is. Eksperimente is 10 minute later begin. Choliensuurtoevoeging het geen effek op die pH van die bad (7,6) gehad nie. Dit is kummulatief met tussenposes van 5 minute toegedien en hartspoed en kontraksiekrag is voortdurend geregistreer.

* Samestelling van Tyrode-oplossing:

$\text{NaCl} = 8 \text{ g/l}$

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = ,0648 \text{ g/l}$

$\text{KCl} = ,2 \text{ g/l}$

Glukose = 1 g/l

$\text{MgCl}_2 = ,1 \text{ g/l}$

$\text{CaCl}_2 = ,2 \text{ g/l}$

$\text{NaHCO}_3 = 1 \text{ g/l}$

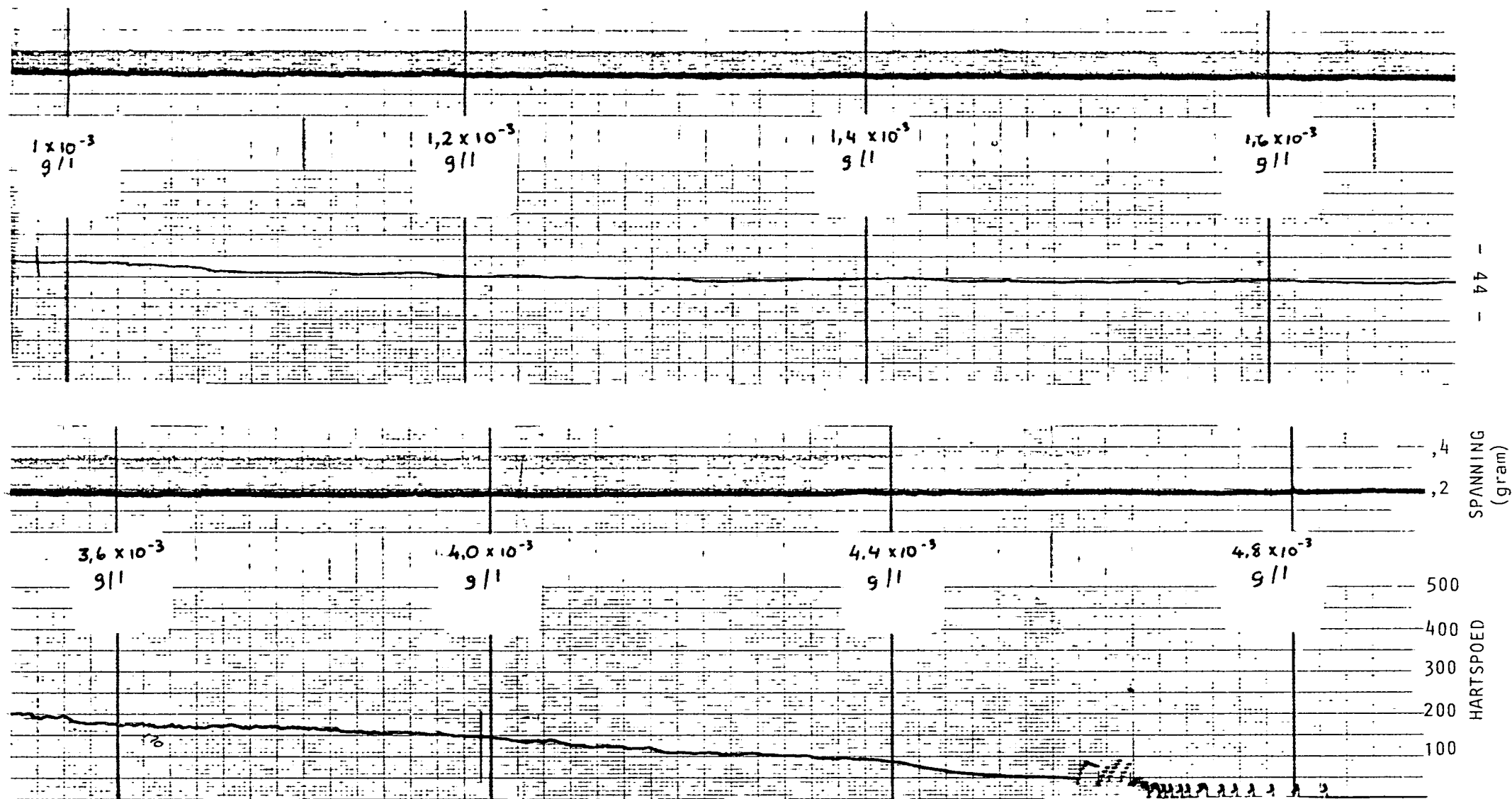


Fig. 3.4.1.2.a Gedeelte van die registrasies van 'n dosis-respons eksperiment met geïsoleerde rotatria (kummulatiewe choliensuur-toediening)

3.4.1.2. Resultate

Die toevoeging van choliensuur het in alle gevalle 'n duidelike negatief chronotrope effek met gepaardgaande positiewe inotropie openbaar. 'n Totaal van 12 preparate is bestudeer en fig. 3.4.1.2.a toon 'n verteenwoordigende voorbeeld van die effek wat waargeneem is. Geen preparaat het hartstilstand met konsentrasies choliensuur kleiner as $4,4 \times 10^{-3}$ gram per liter (d.w.s. tot en met $3,6 \times 10^{-3}$ gram per liter) getoon nie. Die konsentrasie van $5,2 \times 10^{-3}$ gram per liter het tot staking van spontane aktiwiteit in 10 uit 12 preparate aanleiding gegee. Die atria het weer spontaan begin klop as die choliensuur uitgespoel is.

Fig. 3.4.1.2.b toon die effek van choliensuur op hartspoed (die gemiddelde van die 12 eksperimente).

Die effek op inotropie word in figuur 3.4.1.2.c getoon. Slegs die konsentrasies waarby al die atria nog spontaan geklop het (d.w.s. tot en met die $3,6 \times 10^{-3}$ gram per liter konsentrasie) is hier gebruik. Omdat die positief inotrope effek liniêr was is dit met die negatief chronotrope effek as 'n reguitlyn vergelyk. Vir hierdie vergelyking is die effek met die $3,6 \times 10^{-3}$ gram per liter konsentrasie as 100% geneem. Soos duidelik uit fig. 3.4.1.2.c blyk, was die hellings van die reguitlyne feitlik identies.

3.4.1.3. Bespreking

Uit die voorafgaande resultate is dit dus duidelik dat choliensuur in vitro beide 'n negatiewe chronotrope én 'n positiewe inotrope effek op atria van Wistarrotte uitlok.

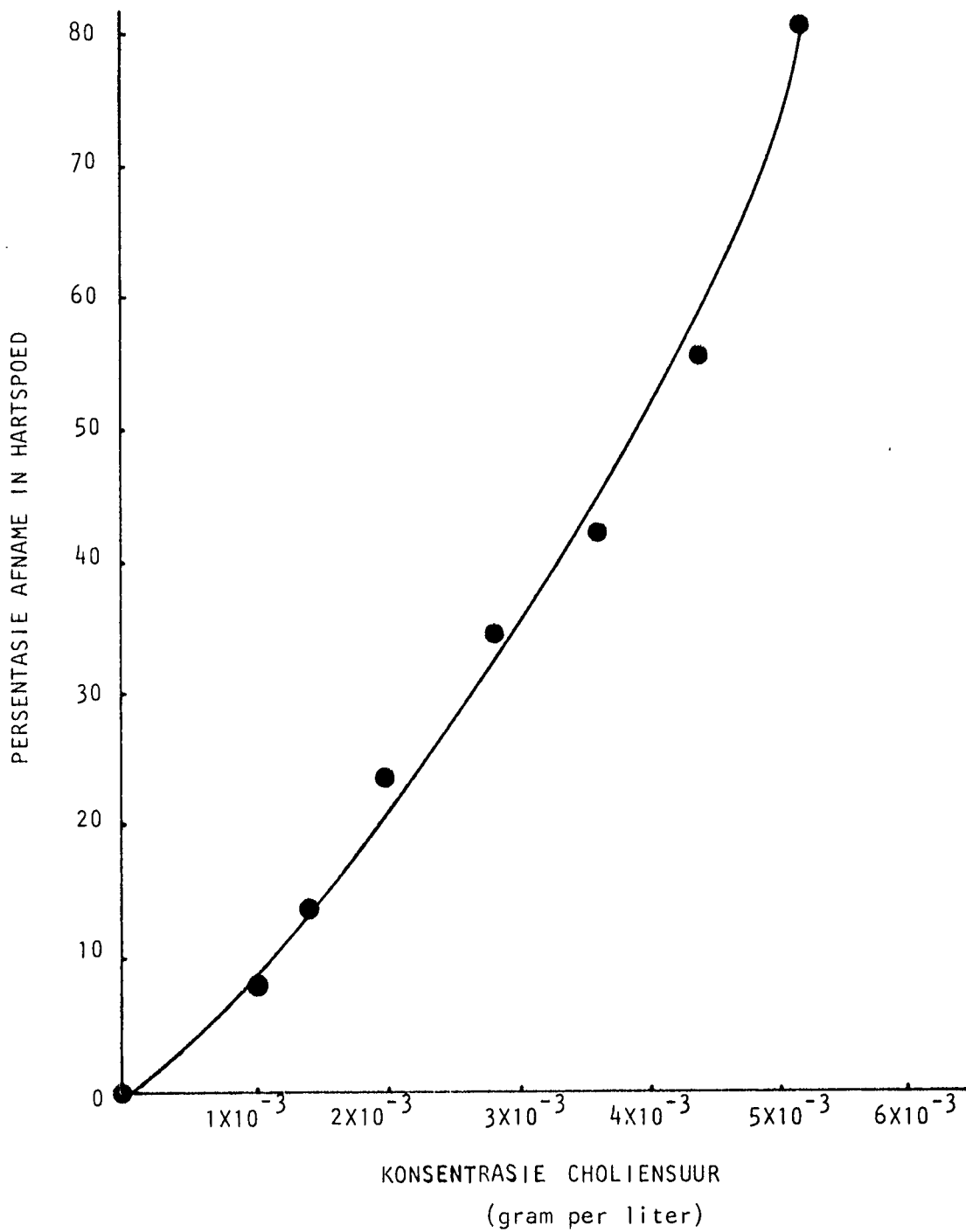


Fig. 3.4.1.2b Effek van choliensuur op hartspoed (geïsoleerde rotatrium)

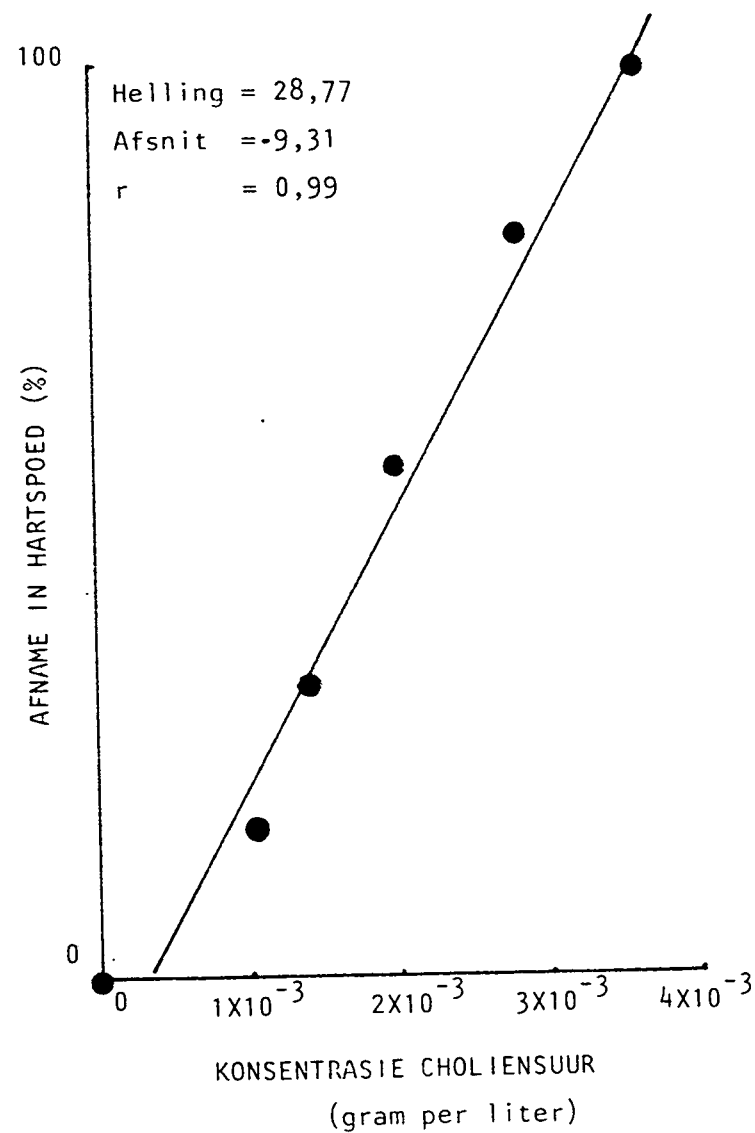
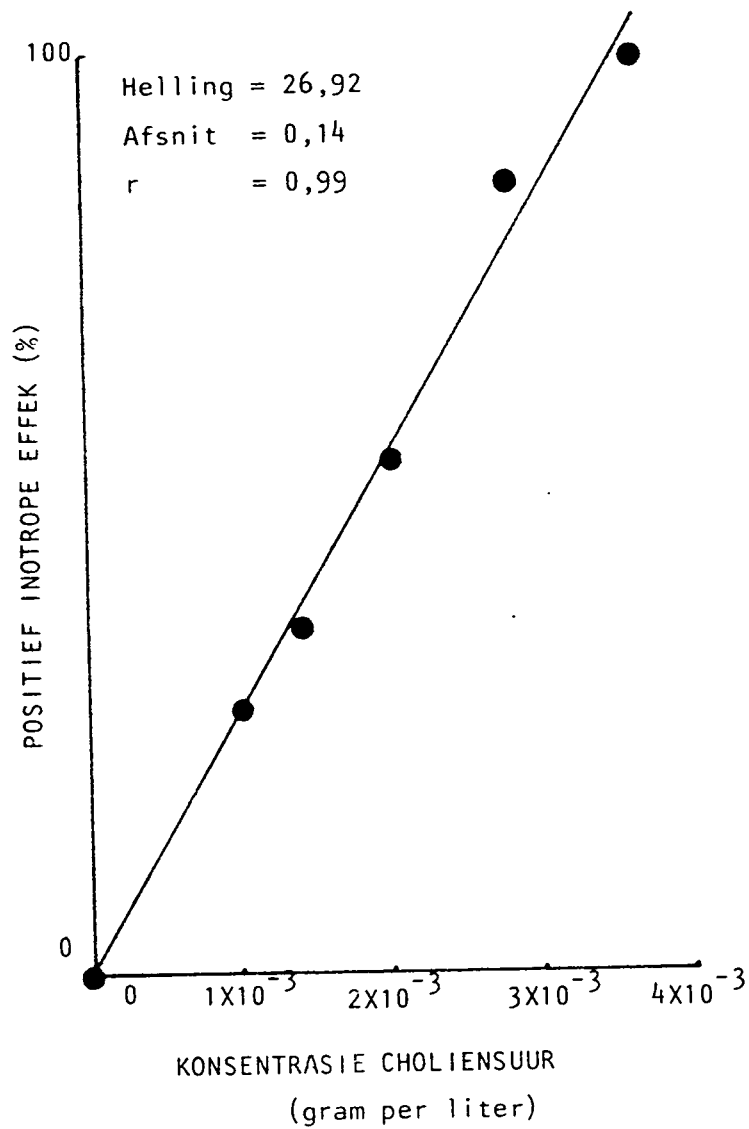


Fig. 3.4.1.2.c Vergelyking tussen die in vitro chronotrope en inotrope effekte van choliensuur

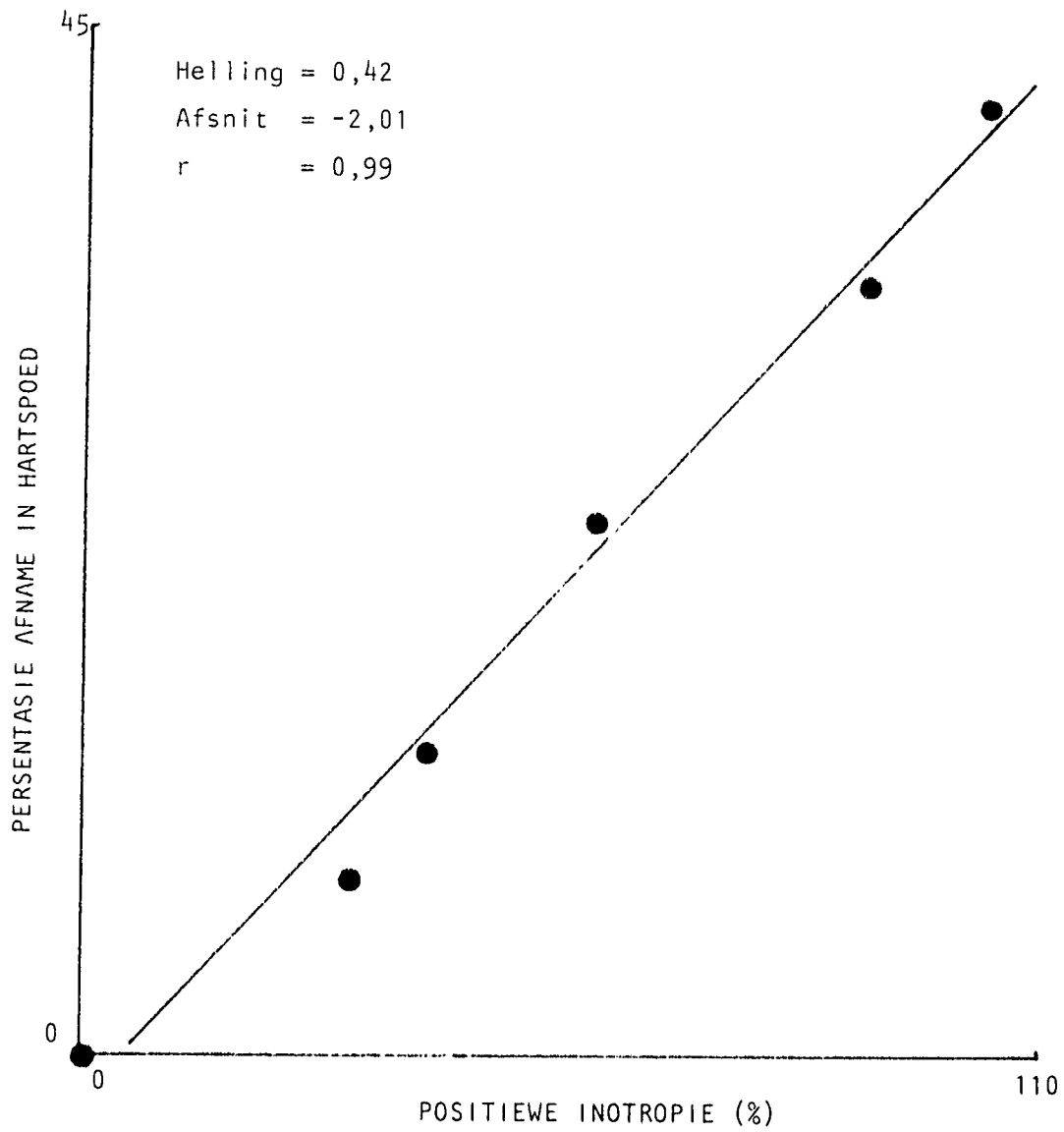


Fig. 3.4.1.3.a Die liniêre verwantskap tussen die positief inotrope en negatief chronotrope effek van choliensuur

Die "direkte" effek van choliensuur wat in die intakte rot gedemonstreer is, kan dus ook in vitro aangetoon word. Hierdie effek is duidelik dosisafhanklik en gee tot uiteindelik omkeerbare staking van spontane aktiwiteit aanleiding.

Die positief inotrope effek vind parallel tot die negatief chronotrope effek plaas (fig. 3.4.1.2.c), wat daarop dui dat die twee effekte verwant kan wees²⁹. Die chronotropiekurve is egter effens regs van die inotropiekurve en mag daarop dui dat 'n gedeelte van die inotrope effek onafhanklik van die chronotrope effek is. 'n Verdere aanduiding dat daar 'n verband tussen die twee effekte is, was die feit dat daar 'n goeie liniêre korrelasie tussen hierdie twee effekte was (fig. 3.4.1.3.a).

Aangesien dit betreklik maklik is om een van hierdie twee veranderlikes (nl. hartspoed) konstant te hou, is die volgende reeks eksperimente uitgevoer om die effek van choliensuur op inotropie te bestudeer in rotatria wat teen 'n konstante tempo met 'n elektriese pasaangeër gestimuleer is.

3.4.2. Elektries-gestimuleerde atria

3.4.2.1. Eksperimentele tegnieke:

Die basiese tegnieke wat in hierdie eksperiment gebruik is, was, behalwe vir twee verskille, dieselfde as dié wat in hoofstuk 3.4.1.1. beskryf is.

Hier is slegs van die linkeratrium gebruik gemaak om die effek van die sino-atriale node wat in die regteratrium geleë is, uit te skakel. Die linkeratrium is elektries gestimuleer d.m.v. elektrodes in die bad. Daar is van 'n Harvard stimulator

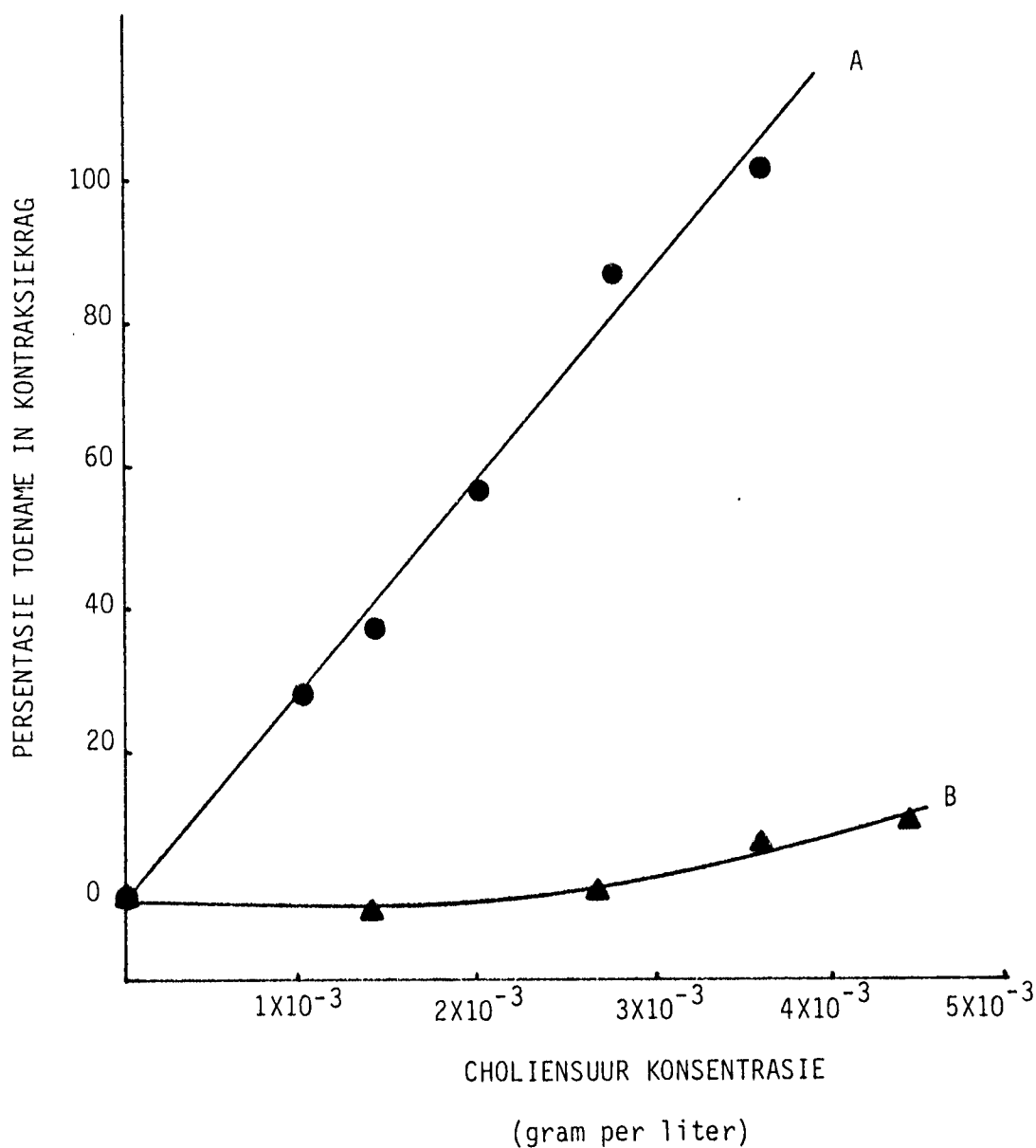


Fig. 3.4.2.2.a Vergelyking tussen die positief inotrope effek van choliensuur in spontaan-kloppende atria (A) en elektries gestimuleerde (konstante spoed) atria (B).

gebruik gemaak (180 impulse per minuut, impuls-duur = 10 millisekondes, potensiaal = 20 volt).

3.4.2.2. Resultate

In die vier linkeratrium preparate waar die effek van choliensuur bestudeer is, is daar slegs 'n geringe positief inotrope effek by die hoër bad-konsentrasie van choliensuur waargeneem, wat selfs by die hoogste konsentrasie ($4,4 \times 10^{-3}$ gram per liter) nie betekenisvol van die kontrolewaardes verskil het nie (fig. 3.4.2.2.a). Met konsentrasies hoër as $4,4 \times 10^{-3}$ gram per liter het die hartspoed afgeneem en het die atria onreëlmatig op stimuli gereageer en was daar later geen reaksie op elektriese stimulasie nie.

Wanneer die choliensuur uit die bad verwyder is en met skoon Tyrode vervang is, het die preparaat weer op elektriese stimulasie gereageer.

3.4.2.3. Bespreking

Uit die voorafgaande is dit dus duidelik dat wanneer die negatief chronotrope effek van choliensuur deur 'n elektriese pasaangeër uitgeskakel word, daar min of geen positiewe inotrope effekte waar te neem is. Hierdie waarneming, gekoppel aan die feit dat daar 'n uitstekende liniêre korrelasie tussen negatiewe chronotropie en positiewe inotropie t.o.v. choliensuur bestaan (fig. 3.4.1.3.a) dui dus daarop dat choliensuur prakties-gesproke geen direkte effek op inotropie het nie, maar wel 'n indirekte positiewe inotrope effek as gevolg van die afname in hartspoed.



190771

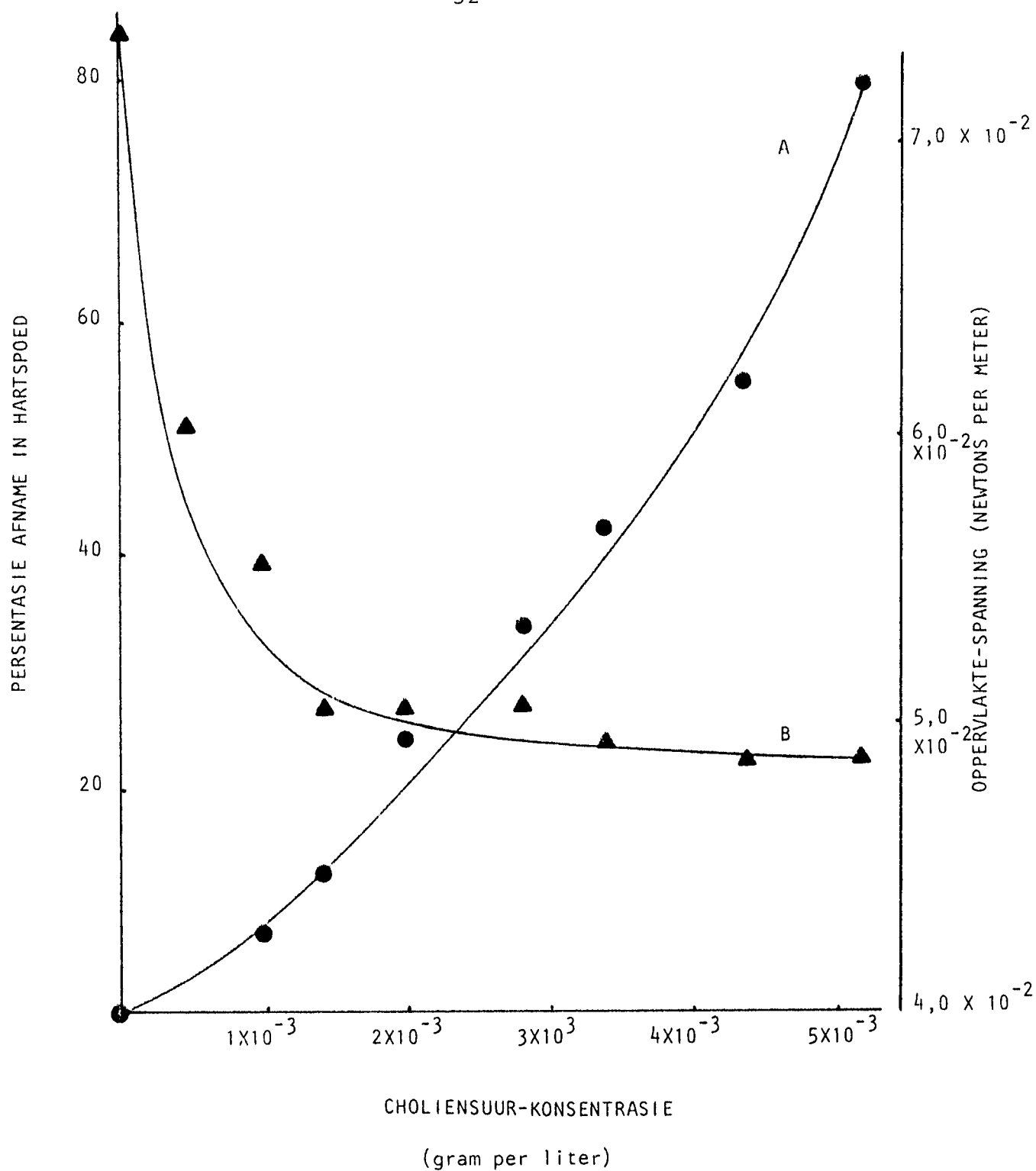


Fig. 3.5.1.2.a Vergelyking tussen die effek van choliensuur op hartspeed (A) en oppervlakte-spanning (B).

3.5. MOONTLIKE FAKTORE WAT BY DIE NEGATIEF CHRONOTROPE EFFEK BETROKKE MAG WEES

3.5.1. Verandering in oppervlakte-spanning

Aangesien een van die prominente fisiese eienskappe van choliensuur die verlaging van oppervlakte-spanning is, en daar beweer is dat die negatief chronotrope effek van galsure die gevolg van 'n nie-spesifieke verlaging van oppervlakte-spanning is⁸, is besluit om in 'n eenvoudige eksperiment die verband tussen choliensuurkonsentrasie in Tyrode en oppervlakte-spanning te ondersoek.

Vir hierdie doel is 'n Searle-weegskaal gebruik³⁰ om die oppervlakte-spanning van Tyrode as sulks, asook Tyrode wat verskillende konsentrasies choliensuur bevat het, te meet. Oppervlakte-spanning in Newtons per meter is met die formule $\gamma = \frac{F}{2X}$ bereken, waar γ = opv.-spanning, F = krag in Newtons en X = die lengte van die liniêre kontak met die vloeistof. F is van 'n grafiek wat uitwyking op die weegskaal met krag vergelyk, afgelees.

3.5.1.2. Resultate

Die resultate van hierdie eksperiment (as die gemiddelde van 4 bepalinge) word in figuur 3.5.1.2.a vergelyk met die negatief chronotrope effek van choliensuur. Dit is duidelik dat die oppervlaktetenspanning logaritmies afneem en reeds by 'n konsentrasie van $1,4 \times 10^{-3}$ gram per liter choliensuur in die bad 'n maksimum verlaging getoon het, terwyl die hartspoed-afname minimaal was. Geen verskil in oppervlakte-spanning kon tussen die konsentrasies van $1,4 \times 10^{-3}$ en 3×10^{-3} gram per liter aangetoon word nie, alhoewel daar 'n meer as 20% afname in hartspoed tussen hierdie konsentrasies waargeneem kon word.

3.5.1.3. Bespreking

Op grond van hierdie gegewens lyk dit dus onwaarskynlik dat die verlaging in oppervlakte-spanning in die badvloeistof direk met die negatief chronotrope effek in verband gebring kan word.

3.5.2. Elektroliete

Aangesien choliensuur duidelike effekte op outomatisiteit en geleiding getoon het, en ioon-uitruiling oor membrane ten nouste by hierdie faktore betrokke is, is 'n reeks in vitro eksperimente uitgevoer om die effek van kalium en kalsium op die negatief chronotrope effek van choliensuur te ondersoek.

3.5.2.1. Eksperimentele tegnieke

Geïsoleerde rotatria is in hierdie eksperimente gebruik (sien hoofstuk 3.4.1.1.). Om vergelykbare resultate te verkry is die herhaalbaarheid van choliensuur dosis-responskurwes t.o.v. hartspoed ondersoek.

Die volgende metode het herhaalbare resultate gegee:

- i) die atria is aanvanklik vir 50 minute in die Tyrode in die orgaanbad gelaat;
- ii) die ou badvloeistof is daarna twee maal uitgespoel en met vars Tyrode vervang;
- iii) nadat 10 minute vir ekwilibrasie toegelaat is, is begin met die kumulatiewe choliensuur-toevoegings;
- iv) die preparaat is hierna gespoel en die bad met vars Tyrode gevul.

Hierdie proses is in die daaropvolgende uur elke 15 minute herhaal.

v) Die tweede dosis-respons studie is 10 minute later begin.

Dieselfde tegniek is gebruik om die effek van choliensuur in gewone Tyrode-oplossing te vergelyk met dié in Tyrode-oplossing met veranderde kalium- en kalsiumkonsentrasies.

In die helfte van die eksperimente is die gewysigde Tyrode eerste gebruik en in die ander helfte, laaste.

3.5.2.2. Resultate

In figuur 3.5.2.2.a word die herhaalbaarheid van die effek van choliensuur op hartspoed getoon. Dit is duidelik dat die twee kurwes feitlik identies is.

3.5.2.2.1. Veranderde kaliumkonsentrasies

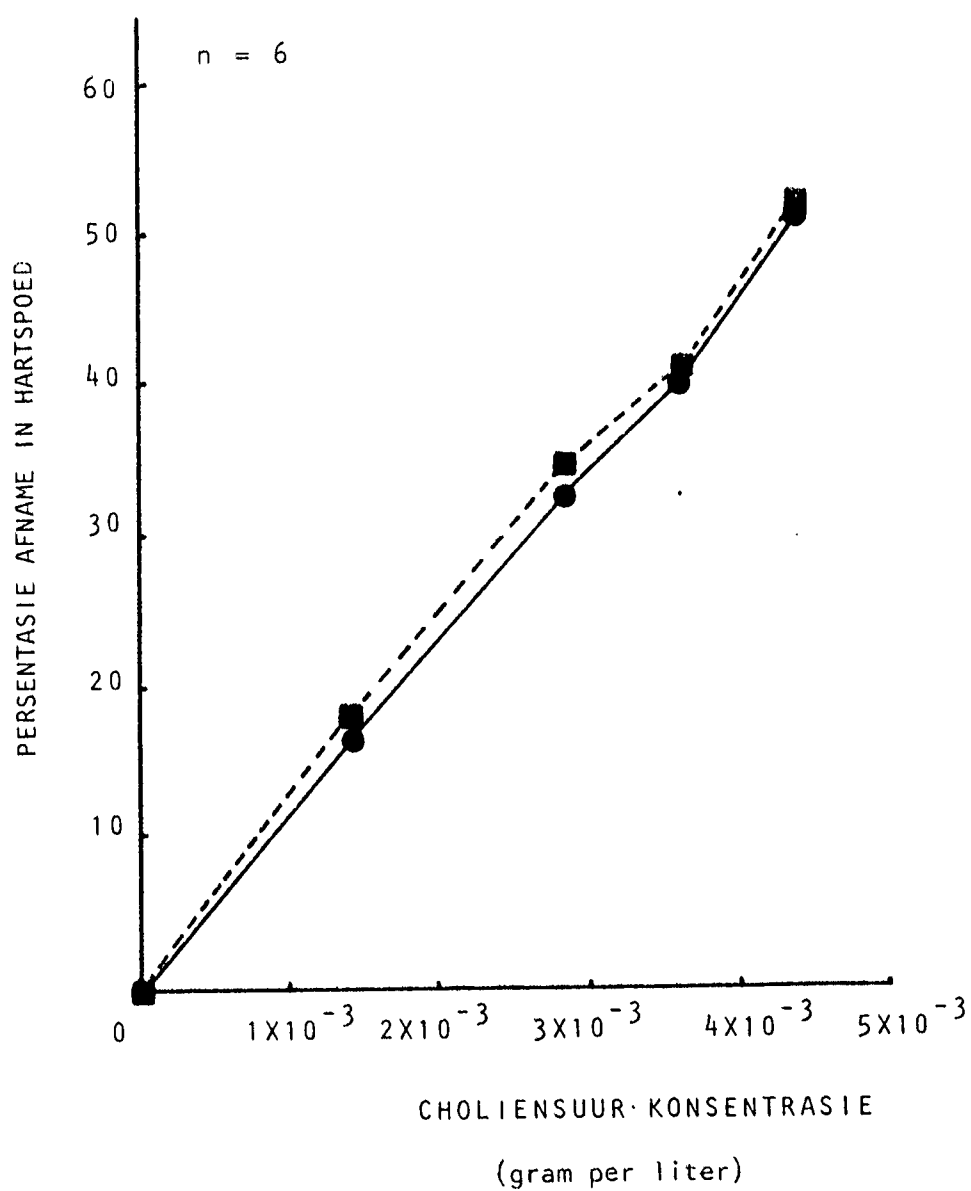
Die resultate van hierdie eksperimente word in figuur 3.5.2.2.1.a weergegee. 'n Verlagings van 50% in die badkonsentrasie van kalium het geen konstante invloed op die effek van choliensuur gehad nie en geen van die punte op die grafieke het statisties betekenisvol van mekaar verskil nie. 'n Verdubbeling van die kaliumkonsentrasie in die bad het deurgaans 'n neiging getoon om die negatief-chronotrope effek van choliensuur te potensieer, maar die verskil was nie statisties betekenisvol nie.

3.5.2.2.2. Effek van kalsium

Die effek van veranderings in kalsiumkonsentrasie in die bad (halvering en verdubbeling) word in figuur 3.5.2.2.2.a aangetoon. In beide gevalle kon geen konstante tendens of statisties betekenisvolle effekte aangetoon word nie.

3.5.2.3. Bespreking

Op grond van hierdie eksperiment kan geen spesifieke effek van choliensuur t.o.v. kalium- of kalsium-



Figuur 3.5.2.2.a Effek van herhaling op die in vitro choliensuur dosis-responskurwe.

(● — ● eerste kurve; ■ — ■ herhaling)

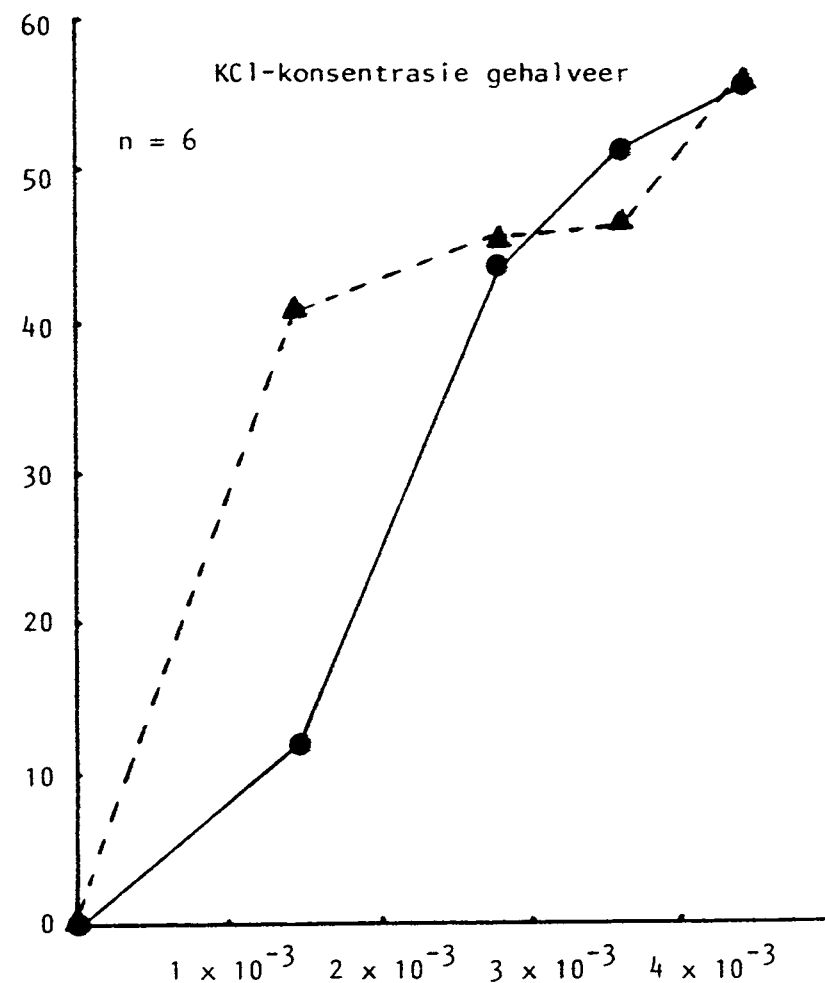
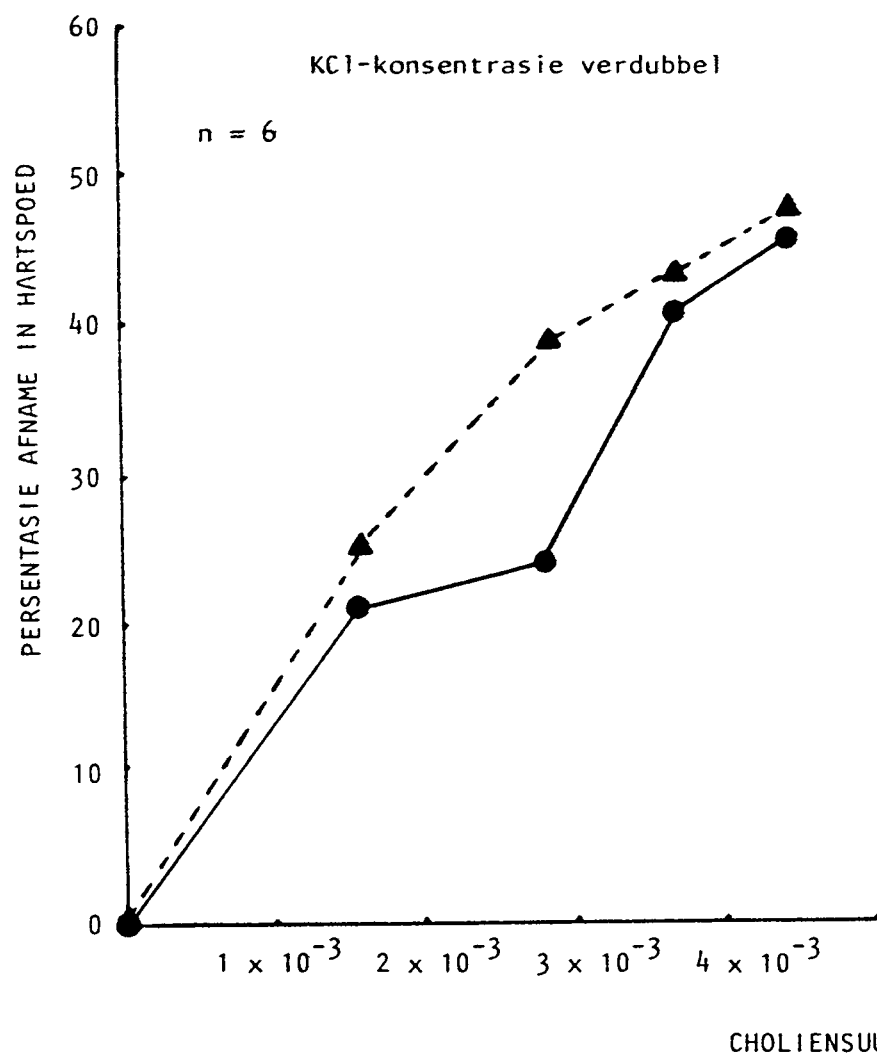


Fig. 3.5.2.2.1.a Effek van veranderde KCl-konsentrasie op die negatief chronotrope effek van choliensuur (●—● kontrol, ▲---▲ veranderde KCl-konsentrasie).

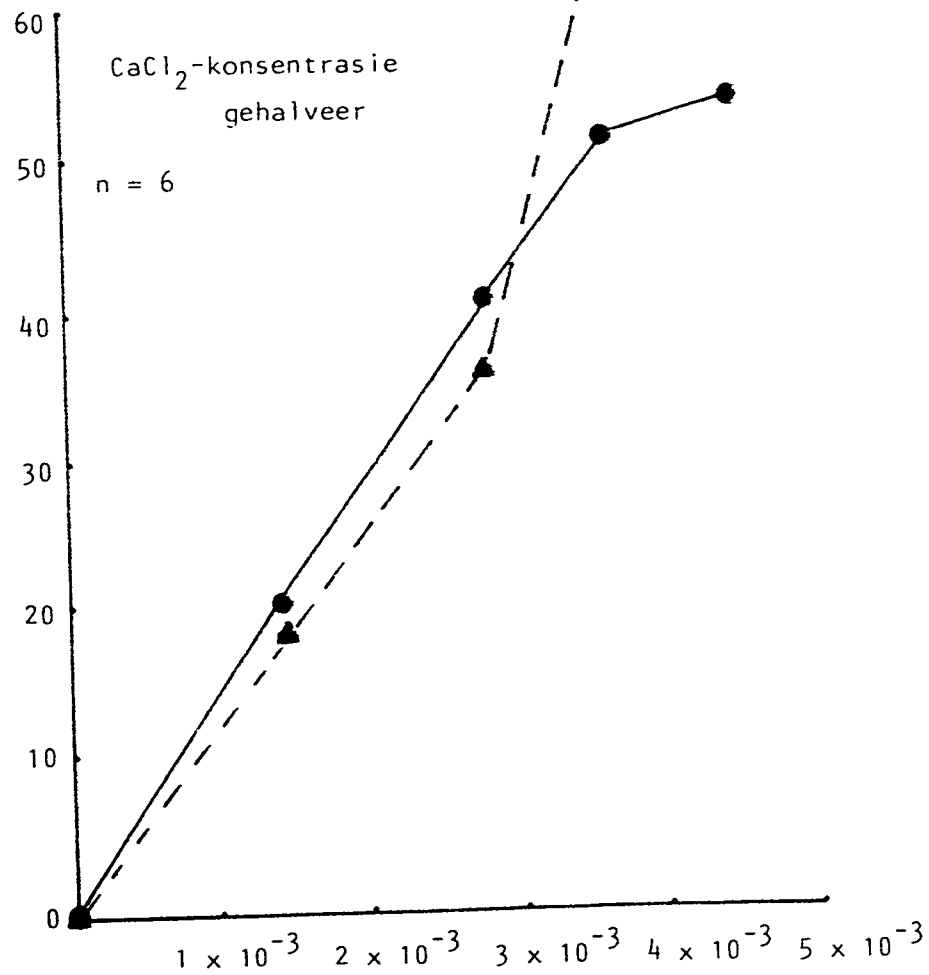
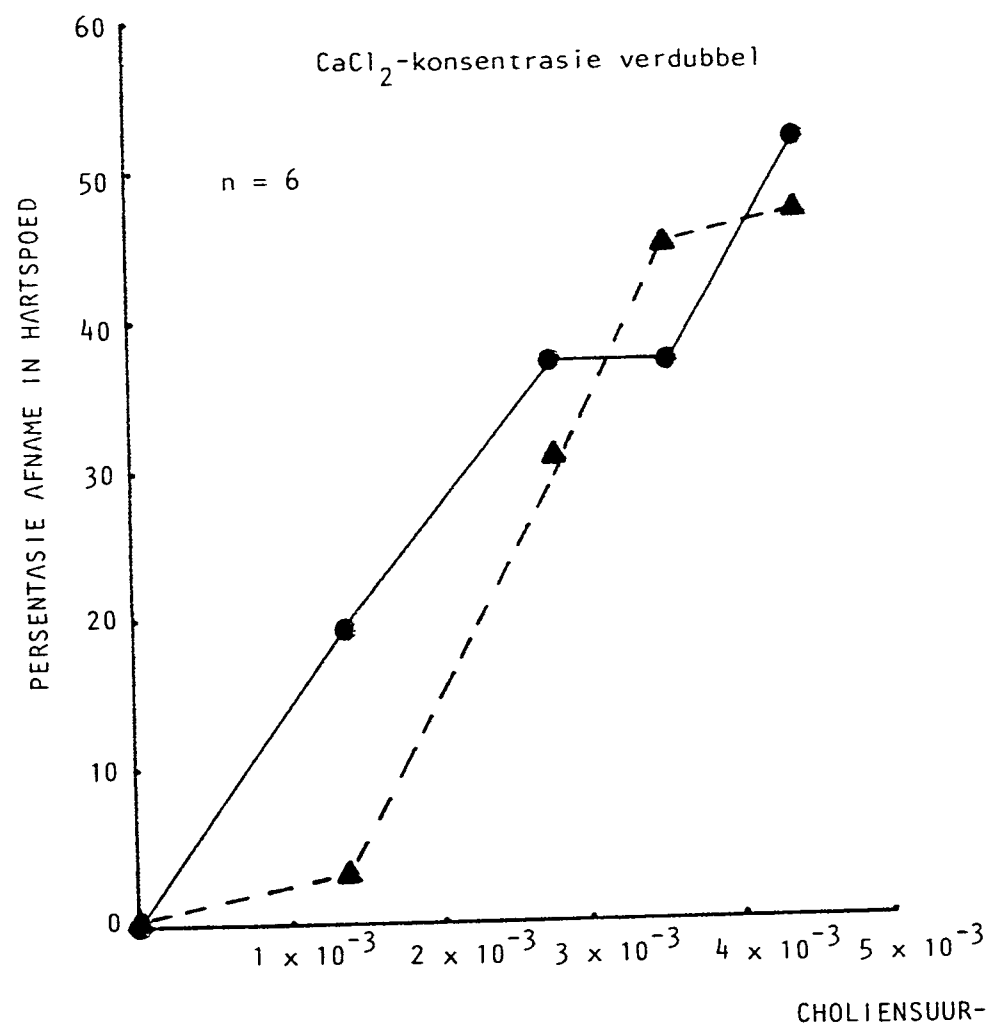


Fig. 3.5.2.2.2.a Effek van veranderde CaCl_2 -konsentrasies op die negatief chronotrope effek van choliensuur
 (●—● kontrolle, ▲---▲ veranderde CaCl_2 -konsentrasie).

vloei oor die selmembraan gepostuleer word nie. Die moontlike potensiërende effek van kalium ten opsigte van die negatief chronotrope effek van choliensuur, kan waarskynlik op grond van sinergisme verklaar word as gevolg van die feit dat kalium as sulks outomatisiteit en geleiding onderdruk³¹. Dit is in ooreenstemming met die moontlikheid van potensiëring a.g.v. die membraanstabiliserende effek van atropien (sien hoofstuk 3.5.3.3.).

3.5.3. Outonome oordragstowwe

Die doel van hierdie reeks eksperimente was eerstens om vas te stel of die direkte (in vitro) negatief chronotrope effek van choliensuur verband mag hou met stimulasie van muskariene reseptore en tweedens om te sien of choliensuur enige simpatolitiese effekte in vitro toon.

Op grond van die in vivo eksperimente sou verwag word dat choliensuur geen muskariene effek t.o.v. chronotropie sou hê nie aangesien die effek van vagotomie en atropien-toediening feitlik identiese gevolge gehad het. Ook het 'n simpatolitiese effek onwaarskynlik gelyk aangesien uitputting van adrenerge oordragstowwe met reserprien-toediening, nie die negatief chronotrope effek van choliensuur verminder het nie.

3.5.3.1. Eksperimentele tegnieke

Spontaan-kloppende geïsoleerde rotatria (soos reeds in hoofstuk 3.4.1.1. beskryf is) is deurgans gebruik.

Om moontlike muskariene eienskappe te ondersoek, is die effek van choliensuur in die teenwoordigheid van atropiensulfaat (2 µg per ml in die badvloeistof) in 8 preparate bestudeer. Ten opsigte van moontlike simpatolitiese effekte is die dosis-

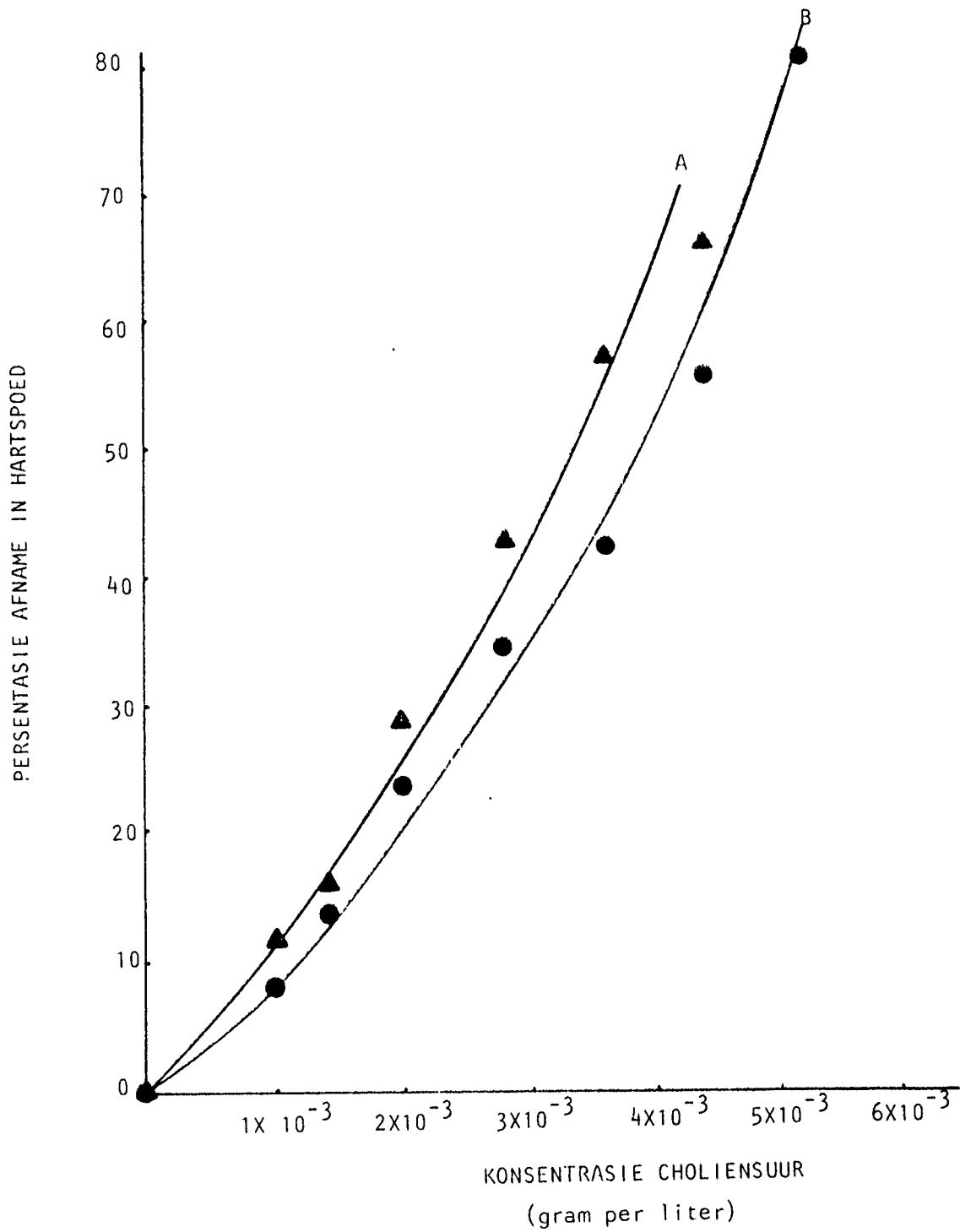


Fig. 3.5.3.2.a Effek van choliensuur op hartspoed (geïsoleerde atria) in die afwesigheid (B) en die teenwoordigheid (A) van atropien ($2 \mu\text{g}$ per ml)

effek verwantskap van isoprenalien in terme van chronotropie in die teenwoordigheid van $3,0 \times 10^{-3}$ gram per liter choliensuur in 6 preparate, ondersoek. Elke preparaat het as sy eie kontrole gedien.

3.5.3.2. Resultate

Atropien het nie die negatief chronotrope effek van choliensuur geïnhipeer nie. Inteendeel, daar was 'n neiging om die effek van choliensuur te potensieër. Hierdie resultate (die gemiddelde van 8 eksperimente) word in figuur 3.5.3.2.a uitgebeeld. Op geen konsentrasie-vlak was daar 'n statisties-betekenisvolle verskil tussen die punte op die twee kurwes nie.

In figuur 3.5.3.2.b word 'n verteenwoordigende voorbeeld van 'n isoprenalien dosis-respons kurwe in die afwesigheid, asook in die teenwoordigheid van choliensuur, getoon. Daar is 'n duidelike verskuiwing na onder en na regs wat ooreenstem met die feit dat daar na choliensuur-toediening 'n afname in hartspoed was, wat deurgans behou is. Indien hierdie afname buite rekening gelaat word, is die kurwes feitlik identies.

3.5.3.3. Bespreking

Uit die voorafgaande gegewens is dit dus duidelik dat daar geen aanduiding is dat choliensuur muskariene eienskappe het nie. Die moontlike potensieëring van die negatief chronotrope effek van choliensuur deur atropien, mag te wyte wees aan die membraan-stabiliserende effekte van

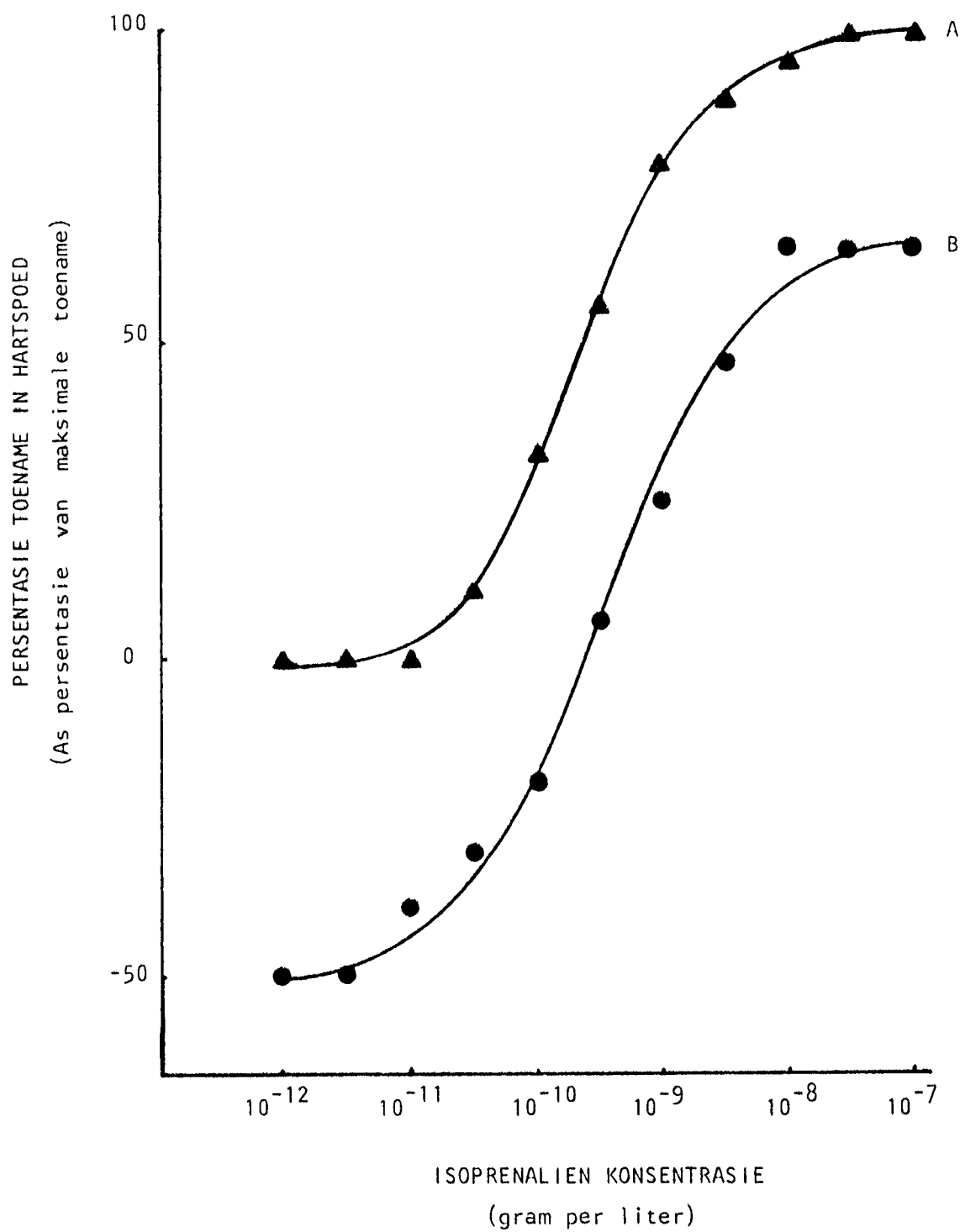


Fig. 3.5.3.2.b Effek van isoprenaliën op hartspoed (geïsoleerde atria) sonder (A) en met (B) 3×10^{-3} gram per liter choliensuur in die orgaanbad.

hoë atropien-konsentrasies³².

Choliensuur het ook geen direkte simpatolitiese effekte getoon nie. Die effek op die isoprenalinen dosis-respons kurwe dui op 'n fisiologiese antagonisme.

Hierdie bevindings is dus in ooreenstemming met wat op grond van die in vivo eksperimente verwag is.

3.5.4. Sel-morfologie

Soos reeds gemeld is 'n afname in glikogeen-inhoud en erge mitochondriale swelling met histologiese ondersoek van die rotatrium na blootstelling aan deoksiecholiensuur beskryf²¹. In hierdie eksperimente is baie hoë konsentrasies van dië galsuur gebruik (2×10^{-2} gram per liter tot $1,2 \times 10^{-1}$ gram per liter) en is van 'n lang blootstellingstyd (20 minute tot 3 uur) gebruik gemaak. Aangesien die negatief chronotrope effek van choliensuur in vitro binne enkele sekondes en by veel laer konsentrasies plaasvind, is besluit om rotatria histochemies en elektronmikroskopies na kort blootstelling aan "farmakologiese" en "toksiese" konsentrasies choliensuur te ondersoek.

3.5.4.1. Eksperimentele tegnieke

Nege rotatrium-preparate is voorberei soos in die in vitro eksperimente beskryf (sien hoofstuk 3.4.1.1.). Drie preparate het as kontroles gedien en is slegs aan die Tyrode in die orgaanbad, sonder choliensuurtoevoeging, blootgestel. Drie preparate is vir 2 minute aan $2,8 \times 10^{-3}$ gram per liter choliensuur in Tyrode blootgestel en 3 preparate aan $5,6 \times 10^{-3}$ gram per liter choliensuur. Hierdie konsentrasies is gekies weens die feit dat

eersgenoemde 'n duidelike hartspoedafname van $\pm 25\%$ uitlok, terwyl laasgenoemde in die meeste gevalle hartstilstand veroorsaak. Die preparate is hierna onmiddelik uit die orgaanbaddens verwyder en weefsel is met isopentaaan wat in vloeibare stikstof afgekoel is vir histochemiese ondersoek gevries en vir elektronmikroskopie in glutaaraldehyd gefikseer volgens die roetine-metodes wat deur die departement Anatomiese Patologie van die Universiteit van die O.V.S. gebruik word.

Histochemies is die weefsel vir miosien-ATP-ase-aktiwiteit, NADH-diaforase-aktiwiteit (as indikator van mitochondriale ensiem-aktiwiteit) en glikogeen gekleur.

3.5.4.2. Resultate

Histochemies is geen verskille tussen die kontrole-weefsel en die wat aan choliensuur blootgestel is, gevind nie, buiten dat daar met die hoër choliensuurkonsentrasie ($5,6 \times 10^{-3}$ gram per liter) 'n geringe afname in glikogeen-inhoud van die weefsel waargeneem is. Elektronmikroskopies was daar met die hoër konsentrasie fokale areas van mitochondriale swelling gevind, alhoewel die meeste dele van die weefsel heeltemal normaal voorgekom het (figuur 3.5.4.2.a).

3.5.4.3. Bespreking

Die opvallendste aspek van hierdie ondersoek was die gebrek aan uitgesproke histochemiese en elektronmikroskopiese veranderinge. Alhoewel

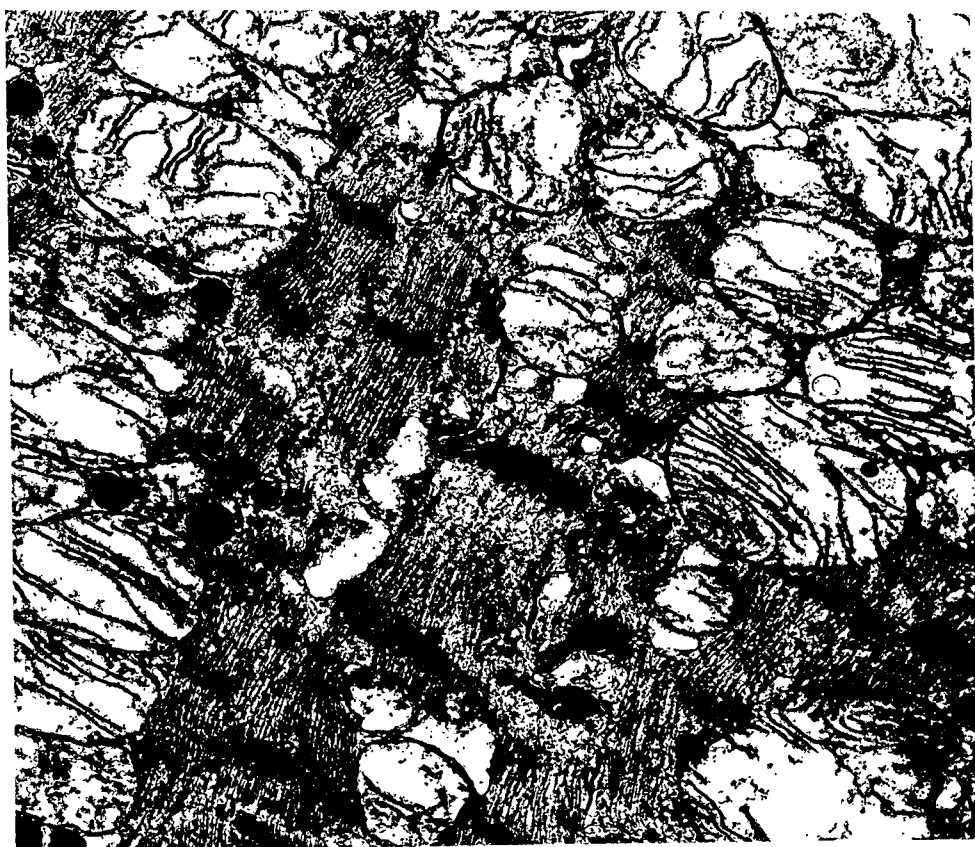
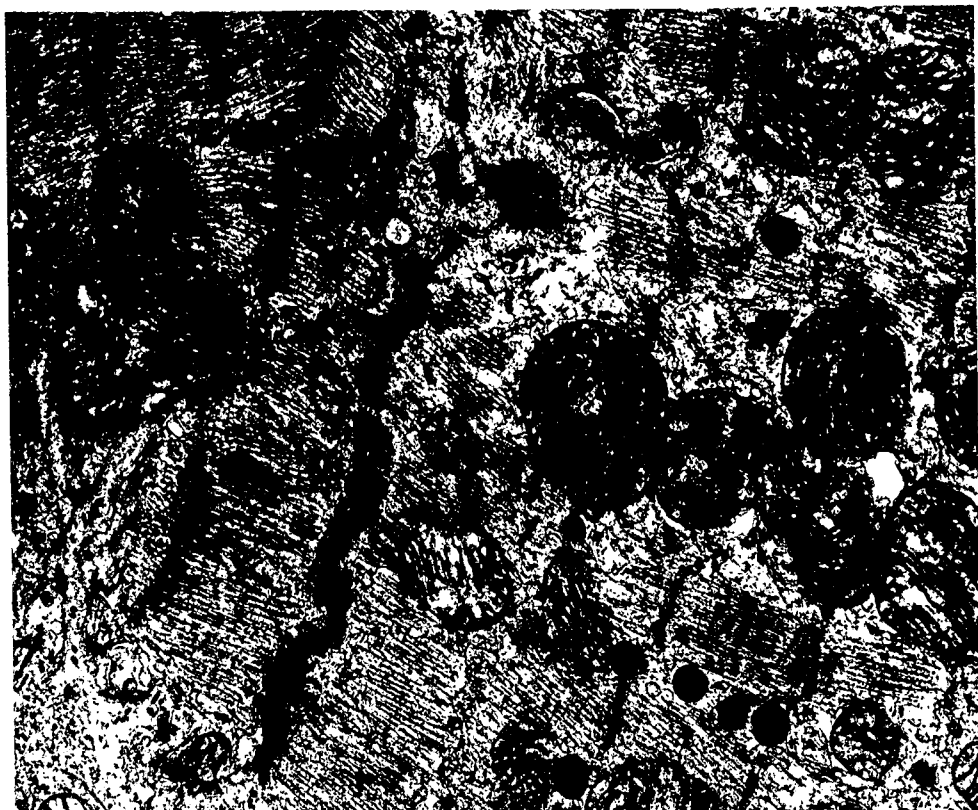


Fig. 3.5.4.2.a Voorbeeld van die normale voorkoms van die mitochondria in die atriale weefsel van 'n kontrole rot (bo) en 'n voorbeeld van 'n area van mitochondriale swelling (onder) in een van die atria wat aan $5,6 \times 10^{-3}$ gram per liter choliensuur blootgestel was (vergroting x 100 000).

"toksiese" konsentrasies deoksiecholiensuur uitgesproke effekte toon²¹, is daar geen veranderinge met die $2,8 \times 10^{-3}$ gram per liter choliensuurkonsentrasie nie, alhoewel hierdie konsentrasie 'n 25% afname in hartspoed uitlok (figuur 3.4.1.2.b). Met die hoër choliensuurkonsentrasie ($5,6 \times 10^{-3}$ gram per liter) is fokale areas van mitochondriale swelling waargeneem, alhoewel die weefsel in die meeste gebiede normaal voorgekom het.

Dit wil dus voorkom asof die omkeerbare "farmakologiese" effek van choliensuur plaasvind sonder enige waarneembare histochemiese of elektronmikroskopiese afwykings, alhoewel daar 'n verband tussen die "toksiese" effek (erge bradikardie en hartstilstand) en histologiese veranderinge soos mitochondriale swelling en 'n afname in glikogeen-inhoud mag wees.

3.6 CHOLIENSUUR EN HEMOLISE

Galsure asook ander steroïede, het hemolitiese eienskappe wat waarskynlik te wyte is aan die verband tussen hulle chemiese struktuur en hulle reaksie met selmembrane⁹. Geneesmiddels met membraan-stabiliserende eienskappe daarenteen, het 'n beskermende effek op rooiselle t.o.v. hemolise wat deur hipotoniese oplossings uitgelok word³³.

Aangesien choliensuur 'n galsuur is en gevolglik hemolitiese eienskappe behoort te hê, maar terselfdertyd ook effekte toon wat op membraan-stabilisasie dui, is besluit om enkele aspekte met betrekking tot hemolise, te ondersoek.

Eerstens is 'n reeks in vivo eksperimente uitgevoer om uit te vind of intravaskulêre hemolise moontlik 'n faktor in die kardiaale effekte en kardiotoxisiteit van choliensuur mag wees. Tweedens is die hemolitiese effek van choliensuur in vitro ondersoek.

3.6.1. Eksperimentele tegnieke

3.6.1.1. In vivo hemolise

Rotte onder uretaan-narkose (sien hoofstuk 3.2.1.) het die volgende as 'n enkeldosis intraveneus ontvang (3 rotte per dosis): choliensuur 15 mg per kg; choliensuur 30 mg per kg; choliensuur 60 mg per kg; 'n volume 0,05 N NaCl* ekwivalent aan die volume choliensuur wat met die

* Aangesien 'n 0,1 N oplossing van choliensuur deurgans gebruik is, is die 0,05 N NaCl-oplossing gebruik omdat dit isosmoties sou wees.

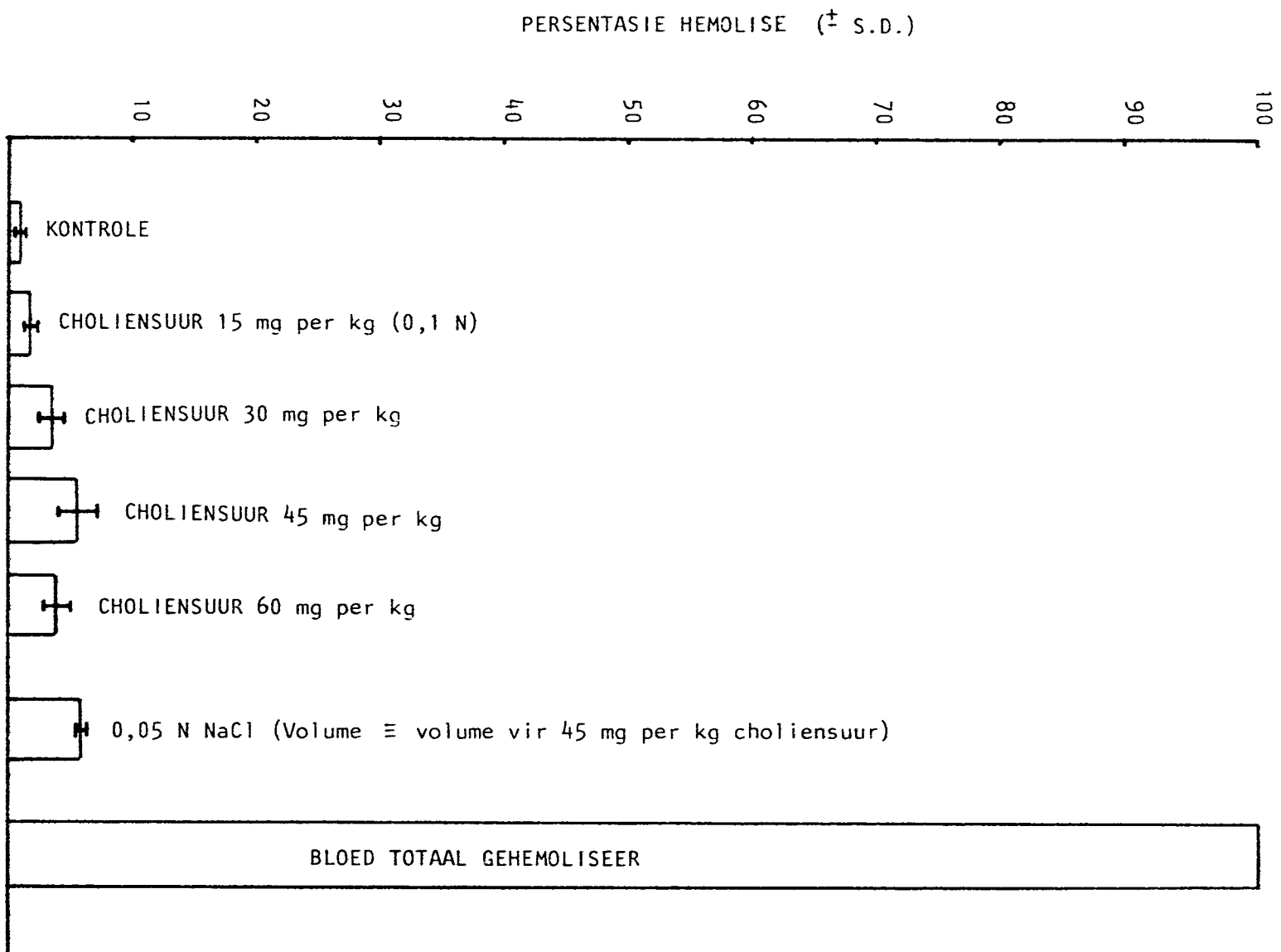


Fig. 3.6.2.1.a Hemolise waargeneem onder verskillende
in vivo omstandighede

45 mg per kg dosering toegedien is. 'n Minuut later is monsters gehepariniseerde bloed uit die linker ventrikel verkry, afgeswaai en 0,2 ml plasma by 4,8 ml gedistilleerde water gevoeg. Bloed is ook van drie kontrole rotte, onder uretaan-narkose, sonder choliensuurtoediening, verkry. Die hemoglobien-absorpsiepiek is met 'n Perkin-Elmer 124 U.V.-spektrofotometer gemeet met gedistilleerde water in die verwysingskuwet (golflengte 540 nm).

Die U.V.-absorpsie in bloed waarvan die rooiselle volledig met gedistilleerde water gehemoliseer is, is ook bepaal. Laasgenoemde absorpsie is as 100% hemolise aanvaar en die ander waardes as persentasies hiervan uitgedruk.

3.6.1.2. In vitro hemolise

In hierdie reeks eksperimente is van gehepariniseerde menslike bloed as bron van eritrosiete gebruik gemaak.

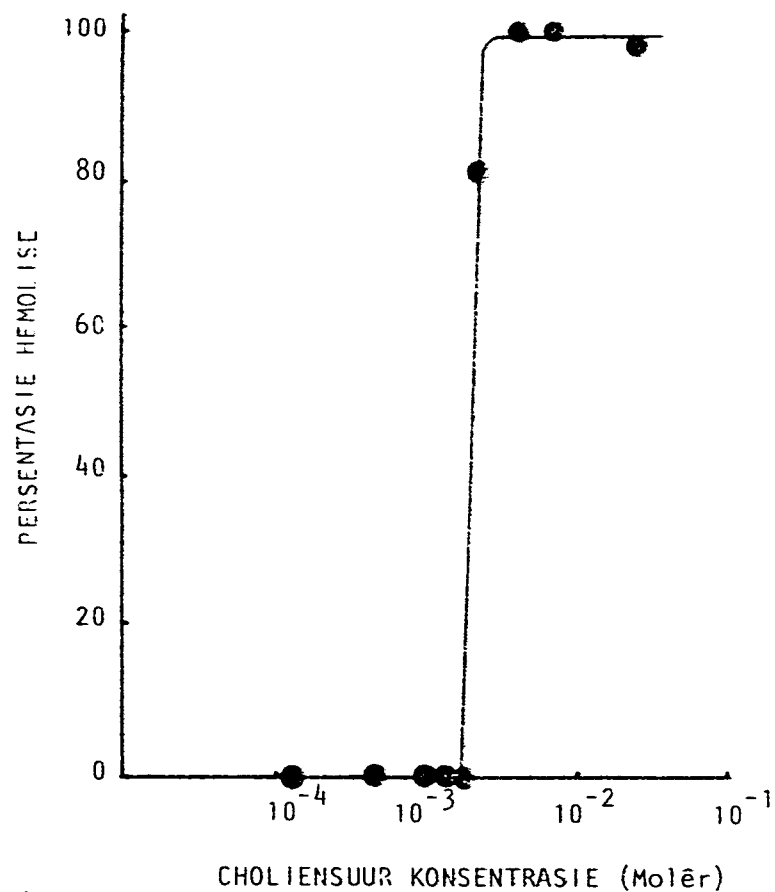
Die bloed is afgeswaai en die plasma met 'n Pasteur-pipet afgesuig en met 'n gelyke volume isotoniese NaCl-oplossing vervang. Hierdie proses is 5 maal herhaal om 'n suspensie gewaste eritrosiete te verkry. Van hierdie suspensie is 50 μ l by 6 ml 0,9% NaCl gevoeg en daarna is verskillende konsentrasies choliensuur bygevoeg, almal opgemaak tot 'n volume van 0,5 ml met 0,9% NaCl. Absorpsie is spektrofotometries teenoor 'n 0,9% NaCl standaard by 'n golflengte van 540 nm bepaal.

3.6.2. Resultate

3.6.2.1. In vivo

In figuur 3.6.2.1.a word die persentasie hemolise onder verskillende omstandighede getoon

i)



ii)

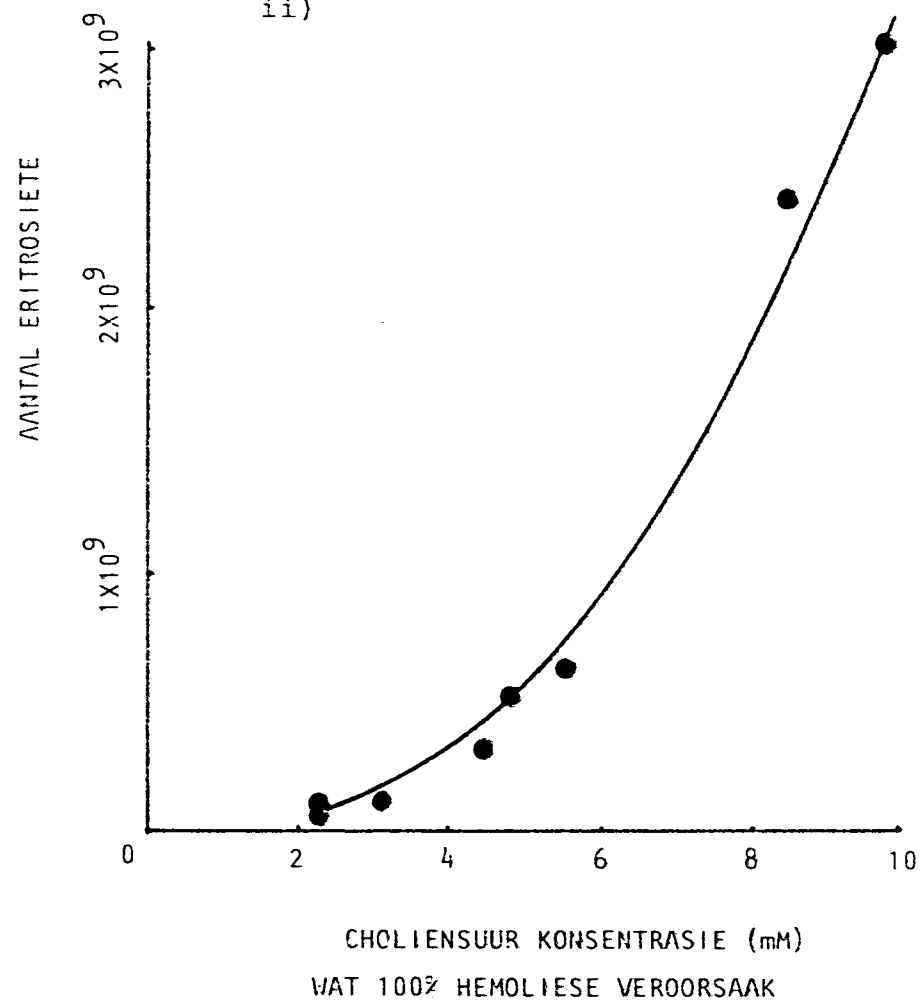


Fig. 3.6.2.2.a i) Verband tussen choliensuur-konsentrasie en hemolise (konstante hoeveelheid eritrosiete).

ii) Verband tussen choliensuur-konsentrasie wat totale hemolise veroorsaak en die aantal rooiselle.

(duplikaat-bepalings in drie rotte elk). Choliensuur het 'n geringe maar progressiewe hemolise met toenemende doserings tot en met 45 mg per kg uitgelok, terwyl daar met die 60 mg per kg dosering 'n afname t.o.v. die vorige dosering was. Choliensuur het dieselfde graad van hemolise as dieselfde volume isosmotiese NaCl veroorsaak.

3.6.2.2. In vitro

Hemolise in vitro was soos reeds deur ander werkers beskryf⁹, streng dosis-afhanklik (figuur 3.6.2.2.a) met 'n baie skerp oorgang van geen tot feitlik totale hemolise van al die rooiselle. 'n Interessante waarneming was egter dat die hemolise-kurwe na links verskuif is as die aantal eritrosiete per volume-eenheid verminder is en na regs as hulle vermeerder is. In figuur 3.6.2.2.a word die verband tussen die aantal rooiselle en die konsentrasie choliensuur wat nodig is om totale hemolise teweeg te bring, getoon.

3.6.3. Bespreking

Die intraveneuse toediening van toenemende dosisse choliensuur het 'n geringe, maar toenemende graad van intravaskulêre hemolise veroorsaak. Hierdie waarneming kan in sy geheel op grond van die hipotoniese aard van die choliensuur-oplossing verklaar word, aangesien isosmotiese NaCl presies dieselfde hemolitiese effek getoon het (figuur 3.6.2.1.a) sonder dat dit negatief-chronotrope eienskappe openbaar het (tabel 3.6.3.a).

	GEMIDDELDE GEWIG VAN ROTTE ($\pm$ S.D.)	KONTROLE HARTSPOED ($\pm$ S.D.)	HARTSPOED 1 MINUUT NA NaCl-TOEDIENING ($\pm$ S.D.)
<u>GROEP I</u>			
0,1 ml NaCl	320 $\pm$ 46 gram	291 $\pm$ 32	293 $\pm$ 33
<u>GROEP II</u>			
0,3 ml NaCl	309 $\pm$ 62	306 $\pm$ 55	318 $\pm$ 59

Tabel 3.6.3.a Effek van NaCl-oplossing (isosmoties t.o.v. die choliensuur-oplossing wat deurgans gebruik is) op hartspoed. Die 0,1 ml NaCl-oplossing is t.o.v. volume ekwivalent aan 25 mg, en die 0,3 ml ekwivalent aan 40 mg per kg choliensuur (n = 5 in elke groep).

Dit is gevolglik duidelik dat alhoewel hemolise in vivo plaasvind, dit geen rol in die kardiaale effekte van choliensuur speel nie. Die verminderde hemolise met die 60 mg per kg dosis choliensuur kan deur die feitlik onmiddellike hartstilstand wat met hierdie dosis uitgelok word, wat vermenging van die gehemoliseerde bloed verhoed het, verklaar word.

Die in vitro hemolise was vanuit verskillende oogpunte besonder interessant. Eerstens was daar die byna "alles-of-niks" aard van die hemolitiese effek van choliensuur en tweedens die verband tussen die aantal rooiselle in suspensie en die konsentrasie choliensuur wat nodig was om hemolise te veroorsaak. Hemolise het oor sekere dele van die kurwe feitlik liniêr verloop. Dit dui daarop dat 'n sekere aantal choliensuurmolekule per eritrosiet nodig is om hemolise uit te lok en dat die hemolitiese werking waarskynlik nie op streng fisiologies-farmakologiese beginsels berus nie, maar moontlik op 'n meganiese effek a.g.v. die oriëntasie van die choliensuurmolekule by die lipied-water aansluiting by die seloppervlak⁹. Die feit dat die verband tussen die aantal rooiselle en choliensuurkonsentrasie nie absoluut liniêr was nie, kan moontlik verklaar word deur die feit dat die totale volumes in hierdie eksperiment konstant was, alhoewel die rooisel-volume toegeneem het. M.a.w. die volume van die waterige fase het relatief tot die rooiselmasse verminder, sodat die gedeelte van die waterige fase wat in oppervlakte-kontak met die rooiselle is persentasiegewys groter is, en meer choliensuurmolekule vir binding aan die selmembraan, beskikbaar is.

Weens die feit dat die choliensuur-molekuul 'n hidrofobe asook 'n hidrofiele kant het (figuur 2.2.a), is dit waarskynlik dat die choliensuurmolekule met hulle hidrofobe gedeeltes aan die rooïselmembraan bind, terwyl die hidrofiele gedeeltes reghoekig tot, en weg van, die seloppervlak in die waterige fase georiënteer is. 'n Mens kan dus postuleer dat wanneer 'n kritieke area van die seloppervlak deur die choliensuurmolekule bedek is, daar tot so 'n mate fisies met die selwand ingemeng word, dat die integriteit daarvan nie meer behou kan word nie en hemolise plaasvind.

Dit is interessant om te spekulêr dat dieselfde beginsels vir die pasaangeër- en geleidingsweefsel van die hart geld. Aangesien 'n rooïsel slegs intakt of gehemoliseer kan wees, sonder enige waarneembare tussenstadium (m.b.t. hemoglobien-vrystelling), is die effek t.o.v. hemolise 'n "alles-of-niks" tipe reaksie. Met pasaangeërweefsel kan verskillende grade van inmenging met selwandfunksie en integriteit as 'n progressiewe afname in die tempo van spontane depolarisasie (d.w.s. hartspoed) tot by die kritieke konsentrasie waar geen spontane depolarisasie meer plaasvind nie, waargeneem word. Alhoewel hemolise en negatiewe chronotropie oënskynlik twee wyduiteenlopende effekte van choliensuur is, lyk dit egter of eersgenoemde effek 'n leidraad tot die werkingsmeganisme van choliensuur t.o.v. hartspoed is. Dit is ook duidelik dat choliensuur streng-gesproke nie 'n membraan-stabiliseerder is soos die begrip t.o.v. ander middels gebruik word nie.

3.7. CHOLIENSUUR EN ARITMIE

Gedurende die in vivo asook die in vitro eksperimente, is as toevallige waarneming opgelet dat wanneer daar aritmieë teenwoordig was vóór choliensuur-toediening of toevoeging, dit dikwels in die teenwoordigheid van choliensuur opgeklaar het (fig. 3.7.a).

Alhoewel 'n studie van 'n moontlike anti-aritmiese effek van choliensuur nie die doel van hierdie verhandeling was nie, is tog besluit om hierdie waarneming in 'n kort steekproef te ondersoek.

3.7.1. Eksperimentele tegnieke

Twintig manlike Wistarrotte wat elk ongeveer 250 g geweeg het is in hierdie eksperiment gebruik. Die helfte van die rotte het 25 mg/kg choliensuur intraveneus ontvang en die ander helfte 'n ekwivalente volume 0,9% NaCl-oplossing. Een minuut later is 0,05 ml van 'n 25% CaCl_2 -oplossing intraveneus aan hulle toegedien.

Elektrokardiogramme is voortdurend geregistreer. Die duur van enige aritmie is gemeet en daar is ook genoteer of die rotte die kalsiumchloried-toediening oorleef het.

3.7.2. Resultate

Toediening van CaCl_2 het in al die kontrole rotte ernstige aritmieë uitgelok, terwyl dit in 9 uit 10 rotte wat vooraf met choliensuur behandel is gebeur het.

In tabel 3.7.2.a word die mortaliteit asook die duur van aritmieë in rotte wat die CaCl_2 -toediening oorleef het, getoon.

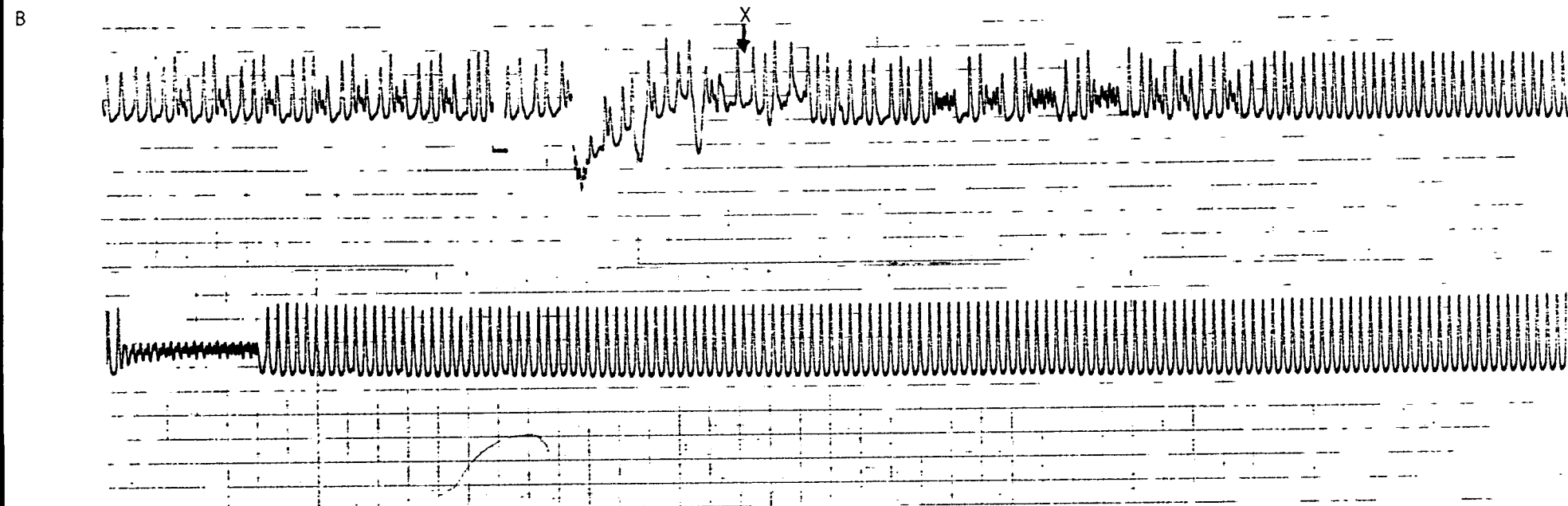
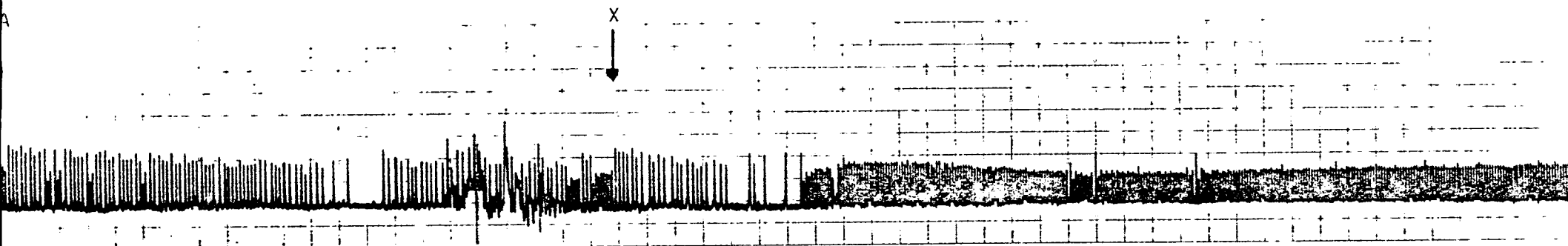


Fig. 3.7.a Voorbeeld van twee geïsoleerde atria-eksperimente waar aritmieë opgeklaar het na choliensuur-toevoeging (X).

	Kontrole groep	Voorbehandeling met choliensuur
Gewig ($\pm$ S.F.)	250 $\pm$ 16 g	241 $\pm$ 14 g
Voorkoms van aritmieë	10/10 (100%)	9/10 (90%)
Mortaliteit	4/10 (40%)	2/10 (20%)
Duur van aritmieë ($\pm$ S.F.)	138 $\pm$ 24 sekondes	76 $\pm$ 30 sekondes

Tabel 3.7.2.a Vergelyking tussen die effek van CaCl_2 -toediening
aan kontrole-rotte en na choliensuur-toediening (6 mg per kg)

Alhoewel die mortaliteit laer en die duur van die aritmieë korter was in die rotte wat choliensuur ontvang het, was die verskille nie statisties betekenisvol nie.

3.7.3. Resultate

Alhoewel hierdie slegs 'n steekproef was en die getalle moontlik te klein was om statisties betekenisvolle resultate te verkry, was dit nogtans interessant om waar te neem dat al die resultate dieselfde tendens getoon het as die toevallige waarnemings gedurende die ander eksperimente. Die opklaring van aritmieë na choliensuur-toediening is in ooreenstemming met die verminderde voorkoms van aritmieë, die laer mortaliteit en die korter duur van ritme-stoornisse na CaCl_2 -toediening.

Hierdie resultate dui daarop dat hierdie aspek van die effek van choliensuur op die hart, verdere en noukeuriger ondersoek mag regverdig.

4. SUMMARY / OPSOMMING

4.1 THE CARDIOVASCULAR EFFECTS OF CHOLIC ACID IN THE WISTAR RAT:

4.1.1. Bradycardia associated with obstructive jaundice is a well recognised clinical observation. Although this phenomenon is usually attributed to increased concentrations of circulating bile salts, the literature on the cardiovascular effects of bile salts is sparse, contradictory and confusing.

The object of this investigation was therefore to study the effects of a specific bile acid (cholic acid) on the cardiovascular system of a specific species (the Wistar rat). Three aspects received particular attention, namely

- i) to ascertain whether cholic acid does in fact elicit negative chronotropism,
- ii) to ascertain whether negative chronitropism is dose dependent,
- iii) to study the possible mechanism or mechanisms responsible for negative chronotropism.

4.1.2. Experimentally produced obstructive jaundice causes a statistically significant decrease in resting heart rate in the Wistar rat.

4.1.3. Cholic acid administration in vivo elicits a dose-dependent negative chronotropic effect, which at lower doses is the result of an uncomplicated sinus bradycardia. Progressive impairment of conduction occurs with higher doses and extreme toxicity is manifested as cessation of electrical

activity in the heart. A dose-dependent hypotensive effect, which probably results from a decreased cardiac output, also occurs.

4.1.4. An investigation into the role of the autonomic nervous system, revealed that cholic acid causes bradycardia by a direct, as well as by a vagotonic mechanism. This results in a moderate degree of reflex sympathetic compensation. The vagotonic effect of cholic acid probably results from an effect on afferent vagal nerve endings in the aortic arch.

4.1.5. A clearcut negative chronotropic effect was elicited in response to cholic acid in vitro, utilizing isolated rat atrium preparations. A concomitant positive inotropism was observed which was related to the decrease in heart rate and which could be eliminated by electrical pacing at a constant rate.

4.1.6. In vitro negative chronotropism is not directly related to the decrease in surface tension and is not substantially influenced by changes in potassium or sodium concentrations. Atropine does not significantly influence in vitro negative chronotropism, but cholic acid shows physiological antagonism of the positive chronotropic effect of isoprenaline.

4.1.7. The in vitro "pharmacological" effect of cholic acid (i.e. negative chronotropism) can not be attributed to any histochemical or electron microscipical changes. The effect of higher concentrations of cholic acid may however be related to mitochondrial swelling and a decrease in glycogen content of the cells.

4.1.8. Although haemolysis occurs in vivo, it does not contribute to negative chronotropism. Haemolysis probably occurs because of a mechanical monolayer effect on the cell membrane. Although this effect is concentration-dependent, the number of red cells in suspension is also a critical factor. This mechanical effect probably also occurs in cardiac pacemaker and conducting tissues inhibiting ionic flow in a non-specific way.

4.1.9. Observations during some of the experiments and the results of a short study, suggest the cholic acid has anti-arrhythmic properties.

4.2 KARDIOVASKULÊRE EFFEKTE VAN CHOLIENSUUR IN DIE WISTARROT

4.2.1. Bradikardie tydens obstruktiwe geëlsug is 'n welbekende kliniese waarneming. Alhoewel hierdie verskynsel gewoonlik aan verhoogde sistemiese galsoutkonsentrasies toegeskryf word, is daar verbasend min literatuur oor die kardiovaskulêre effekte van galsoute beskikbaar en is die bestaande publikasies teenstrydig en verwarrend.

Die doel van hierdie verhandeling was dus om die effek van 'n spesifieke galsuur (choliensuur) op die kardiovaskulêre stelsel van 'n spesifieke spesie (die Wistarrot) te ondersoek om veral helderheid oor drie aspekte te verkry, nl.:

- i) om vas te stel of choliensuur wel negatief chronotrope eienskappe openbaar,
- ii) om vas te stel of 'n dosis-effek verwantskap vir so 'n effek bestaan,

- iii) om die moontlike meganisme of meganismes wat by so 'n effek betrokke is, te ondersoek.

4.2.2. Eksperimentele obstruktiwe geelsug lok 'n duidelike en statisties-betekenisvolle afname in die rustende hartspoed van Wistarrotte uit.

4.2.3. In vivo toediening van choliensuur veroorsaak 'n dosisafhanklike negatief chronotrope effek, wat by lae doserings die gevolg van 'n ongekompliseerde, dosisafhanklike sinusbradikardie is. Met hoër doserings is daar 'n progressiewe vertraging van geleiding en met ekstreme toksisiteit 'n algehele afwesigheid van elektriese aktiwiteit in die hart. 'n Dosisafhanklike bloeddrukdaling, waarskynlik as gevolg van 'n verlaagde kardiaale uitwerp, vind ook plaas.

4.2.4. Toe die rol van die outonome senuweestelsel in vivo ondersoek is, is gevind dat choliensuur op grond van 'n direkte, asook 'n vagotoniese meganisme, bradikardie uitlok. As gevolg hiervan vind 'n sekere mate van refleks kompensasie deur die simpatikus plaas. Die vagotoniese effek van choliensuur is waarskynlik te wyte aan 'n effek op afferente vagale senu-eindes in die aortaboog.

4.2.5. Choliensuur lok 'n duidelike negatief chronotrope effek met gepaardgaande positiewe inotropie in geïsoleerde rotatria uit. Laasgenoemde effek is van die afname in hartspoed afhanklik en kan, deur 'n konstante hartspoed met elektriese stimulasie te handhaaf, opgehef word.

4.2.6. Die negatiewe chronotrope effek wat in vitro waargeneem is, is nie duidelik aan die afname in oppervlakte-spanning gekoppel nie en word ook nie betekenisvol deur veranderinge in ekstrasellulêre kalium- en kalsiumkonsentrasies beïnvloed nie. Atropien het geen duidelike effek op die in vitro negatiewe chronotropie nie, maar choliensuur tree as fisiologiese antagonis van isoprenalïen op.

4.2.7. Die "farmakologiese" effek van choliensuur in vitro ('n duidelike negatiewe chronotropie) kan nie aan enige histochemiese of elektronmikroskopiese veranderinge gekoppel word nie, alhoewel die effek van hoër choliensuurkonsentrasies verband kan hou met mitochondriale swelling en 'n afname in glikogeen-inhoud van die selle.

4.2.8. Alhoewel choliensuur in vivo hemolise veroorsaak, dra dit nie tot die negatiewe chronotropie by nie. Hemolise vind waarskynlik as gevolg van 'n meganiese monolaag-effek op die selwand plaas. Hierdie effek is konsentrasie-afhanklik, maar die aantal rooiselle in suspensie is ook van uiterste belang. Hierdie meganiese effek vind waarskynlik ook op kardiaale pasaangeër en geleidingsweefsel plaas, waardeur ioonvloei nie-spesifiek gedemp word.

4.2.9. Toevallige waarnemings tydens sommige eksperimente, asook die resultate van 'n kort steekproef, dui daarop dat choliensuur anti-aritmiese eienskappe besit.

5. BIBLIOGRAFIE

1. Van Itallie, T.B. en Hashim, S.A. (1963): Clinical and Experimental Aspects of Bile Acid Metabolism.
Med. Clin. N. Am., 47: 629-648.
2. Hofmann, A.F. en Kern, F., (1971): The Significance of Bile Acids in Gastrointestinal and Hepatic Disease.
Disease.a.month, November, 1-38.
3. Bogdonoff, M.D., (1972): Bile acid symposium.
Arch. Int. Med., 130: 473-656.
4. Danzinger, R.G., Hofmann, A.F. en Schoenfeld, L.J., (1972):
Dissolution of Cholesterol Gallstones by Chenodeoxycholic acid.
New Eng. J. Med., 286, 1-42.
5. Admirand, W.H. en Way, L.W., (1972): Medical Treatment of Retained Gallstones.
Clin. Res., 20: 625-628.
6. Bell, G.D., Whitney, G., Dowling, R.H., (1972): Gallstone Dissolution in Man using Chenodeoxycholic Acid.
Lancet, 2: 1213-1216.
7. Mosbach, E.H., (1972): Hepatic Synthesis of Bile Acids.
Biochemical Steps and Mechanisms of Rate Control.
Arch. Intern. Med., 130: 478-487.
8. Nemesánszky, E. en Hegyváry, Cs., (1967): Effect of Bile Acids and Detergents on the Function of the Isolated Heart.
Acta Physiologica Academiae Scientiarum Hungariae Tomus, 32: 355-363.

9. Weissmann, G. en Keiser, H., (1965): Hemolysis and Augmentation of Hemolysis by Neutral Steroids and Bile Acids.
Biochem. Pharmacol., 14: 537-546.
10. Palmer, R.H., (1972): Bile Acids, Liver Injury, and Liver Disease.
Arch. Intern. Med., 130: 606-617.
11. Herndon, J.H., (1972): Pathophysiology of Pruritus Associated With Elevated Bile Acid Levels in Serum.
Arch. Intern. Med., 130: 632-637.
12. Schamroth, L., (1971): In: An Introduction to Electrocardiography, 4th Ed., bl. 112.
Blackwell Scientific Publications, Oxford.
13. Davidson, S., (1972): In: The Principles and Practice of Medicine, bl. 968.
E.S. Livingstone Ltd., Edinburgh & London.
14. Landois, L., (1863): "Über den Einfluss der Galle auf die Herzbewegung."
Deutsche Klin., 46: 449.
15. Röhrig, A., (1863): "Über den Einfluss der Galle auf die Herztätigkeit."
Arch. d. Heilk., 4: 385.
16. Wakim, K.G., Essex, H.E. en Mann, F.C., (1939): The Effects of Whole Bile and Bile Salts on the Perfused Heart.
Amer. Heart J., 18: 171-175.

17. Wakim, K.G., Essex, H.E. en Mann, F.C., (1940): The Effects of Whole Bile and Bile Salts on the Innervated and the Denervated Heart.
Amer. Heart J., 20: 486-491.
18. Loynes, J.S. en Gowdey, C.W., (1952): Cardiotonic Activity of Certain Steroids and Bile Salts.
Can. J. Med. Sci., 30: 325-332.
19. Erdmann, W.D. en Rohr, H., (1954): Analyse der Gallensäurewirkungen auf die Herzfrequenz (Ikterusbradykardie).
Arch. int. Pharmacodyn., 98: 81-96.
20. Güth, V. en Held, K. (1963): Wirkung der Desoxycholsäure auf das Aktionspotential und Mechanogram des Warmblüterherzens.
Pflügers Archiv., 276: 579-592.
21. Blümeke, S., Güth, V. en Themann, H., (1966): Die Wirkung von Gallensäure (Desoxycholat) auf das isolierte Herzohr der Ratte. (Physiologische, lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen).
Beitr. Path. Anat., 133: 125-155.
22. Huang, T.F. (1969): Effect of Sodium Desoxylate on the Cellular Potential of the Sinoatrial Node of the Rabbit Heart.
Jap. J. Phys., 19: 663-669.
23. Van Petten, G.R., Evans, J.A. en Salem, F.A., (1970): A Simple Method for Chronic Measurement of the Electrocardiogram and Blood Pressure in the Conscious Rat.
J. Pharm. Pharmac. 22: 467-469.

24. Mason, D.T., (1969): Usefulness and Limitations of the Rate of Rise of Intraventricular Pressure (dp/dt) in the Evaluation of Myocardial Contractility in Man.
Amer. J. Cardiol., 23: 516-527.
25. Barnes, D.C. en Eltherington, L.G., (1973): In: Drug Dosage in Laboratory Animals. A Handbook. bl. 42, 170 en 215.
Univ. of Calif. Press., Los Angeles.
26. Best, C.H. en Taylor, N.B., (1966): In: The Physiological Basis of Medical Practice. bl. 752.
The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
27. Quest, J.A. en Gillis, R.A., (1971): Carotid Sinus Reflex Changes Produced by Digitalis.
J. Pharmacol. & Exp. Therap. 177: 650-661.
28. Domer, Floyd R., (1971): In: Animal Experiments in Pharmacological Analysis. bl. 573.
Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A.
29. Guyton, A.C., (1966): In: Textbook of Medical Physiology. bl. 242.
W.B. Saunders Co., Philadelphia & London.
30. Allen, H.S. en Moore, H., (1960): In: A Text-book of Practical Physics. Bl. 155.
Macmillan & Co. Ltd., New York, St. Martin's Press.

31. Gettes, L.S., (1971): The Electrophysiologic Effects of Antiarrhythmic Drugs.
Amer. J. Cardiol., 28: 526-535.
32. Viana, A.P. en Osswald, W., (1971): Antiarrhythmic Action of Atropine.
Arch. Int. Pharmacodyn., 192: 238-246.
33. Olaisen, B. en Øye, I., (1973): Interaction of Membrane Stabilizing Drugs Affecting Human Erythrocytes In Vivo.
Eur. J. Pharmacol., 22: 112-116.

BEDANKINGS

My dank moet ten eerste aan my Skepper betuig word wat in Sy liefde en alvermoë my die nodige verstand, insig en die normale gebruik van my sintuie gegee het, sodat dit moontlik was om hierdie projek aan te pak en deur te voer.

Aan my departementshoof, prof. F.O. Müller wil ek graag baie dankie sê vir sy hulp en raad met die eksperimentele werk, asook vir sy bekwame leiding en opbouende kritiek tydens die verwerking van die resultate en die samestelling en afronding van die verhandeling.

Ek wil almal in ons departement wat met verskillende aspekte van die werk gehelp en raad gegee het bedank, spesifiek vir Bernice vir haar leeuue-aandeel in die eksperimentele werk en vir Sannie en Ina vir die tikwerk. Baie dankie ook aan dr. P.N. Badenhorst en die ander lede van die departement Anatomiese Patologie wat met die mikroskopiese werk behulpsaam was.

Laastens, my dank aan my ouers wat dit vir my moontlik gemaak het om my aanvanklike universiteitsopleiding te ondergaan en aan Moekie en die kleingoed wat belanggestel het en geduldig was terwyl ek met hierdie projek besig was.

