

П.І. Янчук, О.М. Пасічніченко, В.І. Комаренко, Т.П.Приходько, В.О. Цибенко

З'ясування механізмів звужувальної дії ацетилхоліну на ворітну вену та її внутрішньопечінкові гілки

Внутрипортальное введение ацетилхолина (АХ) наркотизированным крысам вызывало эндотелийзависимое сужение воротных сосудов печени, устойчивое к атропину и существенно подавляемое фентоламином. В отличие от АХ внутрипортальное введение нитропруссиды натрия расширяло эти сосуды. На изолированном сегменте воротной вены получены аналогичные результаты; вместе с тем блокада Н-холинорецепторов никотином (в высокой концентрации), тубокурарином или тетродотоксином уменьшала сократительную реакцию воротной вены на АХ. Сделано заключение, что вазоконстрикторное действие АХ в воротном русле печени осуществляется через Н-холинорецепторы эндотелиоцитов или адренергических нейронов в стенках воротных сосудов. Эти клетки, в свою очередь, выделяют посредник, возможно, норадреналин, который, действуя на мышечный слой воротной вены, приводит к ее сужению.

ВСТУП

Майже 100 років відома судинорозширювальна дія класичного холіно-міметика ацетилхоліну (АХ). За останні 25 років вона детально, аж до молекулярного рівня, досліджена. Встановлено, що АХ стимулює виділення судинним ендотелієм речовин, деякі з них викликають розслаблення гладеньком'язових клітин артерій. Зокрема, АХ, діючи через специфічні М-холінорецептори на мембрані ендотеліальних клітин, активує фермент NO-синтазу, який, в свою чергу, синтезує з L-аргініну оксид азоту (NO), що і зумовлює розширення кровоносних судин [5, 16].

Водночас у ворітному руслі печінки АХ демонструє нетипову, судинозвужувальну дію [10, 18]. Слід зауважити, що констрикторна реакція на АХ була виявлена на печінковій, задній порожнистій і деяких інших венах [8, 19]. І хоча цей феномен привернув увагу й інших учених [2], його природа до цього часу залишається не з'ясованою.

Метою нашої роботи було дослідити механізми звужувальної дії АХ на ворітну вену та її внутрішньопечінкові гілки.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено за умов гострого експерименту *in vivo* на наркотизованих собаках (нембутал, 35 мг/кг) і щурах (уретан, 1 г/кг) – I серія дослідів, а також *in vitro* на ізольованих препаратах судин – II серія. Тиск крові в сонній або стегновій артерії, а також у ворітній і задній порожнистій венах тварин реєстрували електроманометром ЕМТ-31, швидкість кровотоку в печінковій артерії та ворітній вені – електромагнітним флоуметром РКЭ-2, зміни кровонаповнення печінки – реографічним методом у нашій модифікації [7] за допомогою реографа РГ-4-01, швидкість локального кровотоку в печінці визначали з допомогою полярографа LP-9 методом кліренсу водню з електрохімічною його генерацією [4]. Всі показники записували на реєстраторі Н071.6М. Опір судин черевних органів, ворітного та артеріального русел печінки розраховували за відношенням різниці тиску на вході та виході досліджуваних судинних русел до швидкості кровотоку у відповідних судинах.

У дослідях на щурах зазначеними вище методами реєстрували артеріальний і ворітний тиск, швидкість локального кровотоку в печінці та її кровонаповнення.

У дослідженнях використовували препарати, які вводили у ворітну вену в дозах: АХ (ФО «Мосмедпрепараты», Москва) – 0,1–1,2 мкг/кг, адреналін, норадреналін (ВАТ «Здоров'я», Харків) – 1–5 мкг/кг, атропін і дитилін («Воронежский химфарм-завод», Росія) 0,2 і 5 мг/кг; нітропрусид натрію («Pharmachim», Болгарія) 20–80 мкг/кг, фентоламін («Гугуґес пирмой», Литва) – 0,5–1 мг/кг, сапонін та індометацин („Sigma”, США) – 0,5 і 3 мг/кг відповідно.

У II серії дослідів за допомогою реєстрального пристрою, що складався із механотрона 6МХ1С, підсилювача постійного струму, осцилографа С1-64А та реєстратора Н338 записували скорочення ізольованої смужки ворітної вени щура, яку закріплювали в плексигласовій камері та перфузували підігрітим ($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) розчином Тіроде. Досліджувані речовини вводили в перфузат, що омивав препарат, зі швидкістю 2–3 мл/хв. Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали з використанням критерію *t* Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У дослідях, проведених на собаках, переконливо показано, що АХ поряд із розширенням артеріальних судин викликає звуження ворітних судин печінки. Так, при внутрішньопортальному його введенні (0,1 мкг/кг) артеріальний тиск (АТ) знижувався на 47 %, а тиск у ворітній вені, навпаки, підвищувався на 36 % ($P < 0,01$). Швидкість кровотоку у ворітній вені та у печінковій артерії збільшувалися на 19 і 60 % відповідно ($P < 0,05$). Опір внутрішньопечінкових ворітних судин при цьому підвищувався на 32 %, а опір артеріальних судин печінки та черевних судин зменшувався майже вдвічі

($P < 0,05$). Отже, АХ, розширюючи артеріальні судини організму, в тому числі й черевних органів, призводить до зростання в них кровотоку та зниження тиску. Поряд з цим відбувається звуження ворітних судин печінки, що зумовлює підвищення в них опору та тиску крові.

Подальший аналіз констрикторної дії АХ на судини ворітного русла печінки був проведений нами на щурах. Вихідні значення показників печінкового кровообігу у щурів були такі: АТ – $85,4\text{ мм рт.ст.} \pm 5,7\text{ мм рт.ст.}$, тиск у ворітній вені – $6,3\text{ мм рт.ст.} \pm 0,3\text{ мм рт.ст.}$, швидкість локального кровотоку в печінці – $99,3\text{ мл/хв} \cdot 100\text{ г} \pm 2,5\text{ мл/хв} \cdot 100\text{ г}$, кровонаповнення печінки – $23,2\text{ мл/100 г} \pm 2,4\text{ мл/100 г}$. Внутрішньопортальне введення АХ, як і в попередніх дослідях, викликало зниження АТ на 32–39 % та підвищення тиску у ворітній вені на 25–44 % ($P < 0,05$) поряд зі зменшенням кровонаповнення печінки і швидкості локального кровотоку на 23–25 % ($P < 0,05$; рис. 1). Ці зміни свідчать про судинозвужувальну дію АХ у ворітному руслі печінки щурів. Блокатор М-холінорецепторів атропін пригнічував депресорні реакції артеріальних судин на АХ, але майже не впливав на хід пресорних реакцій у ворітному руслі (рис. 2).

Деєндотелізація ворітних судин печінки сапоніном усувала підвищення тиску у ворітній вені і, відповідно, констрикторний ефект АХ у ній (див. рис. 2). Водночас пресорна реакція тиску у ворітній вені на дію норадреналіну зберігалася, що свідчить про цілісність м'язового шару ворітних судин після їхньої деєндотелізації. Отже, АХ у судинах ворітного русла, так само, як і в інших регіонах серцево-судинної системи, діє через їхній ендотелій, але, на відміну від останніх, спричиняє вазоконстрикцію. Отримані результати спонукають нас до припущення щодо можливої судинозвужувальної дії NO у ворітній системі.

Для з'ясування цього питання було проведено дослід з донором оксиду азоту

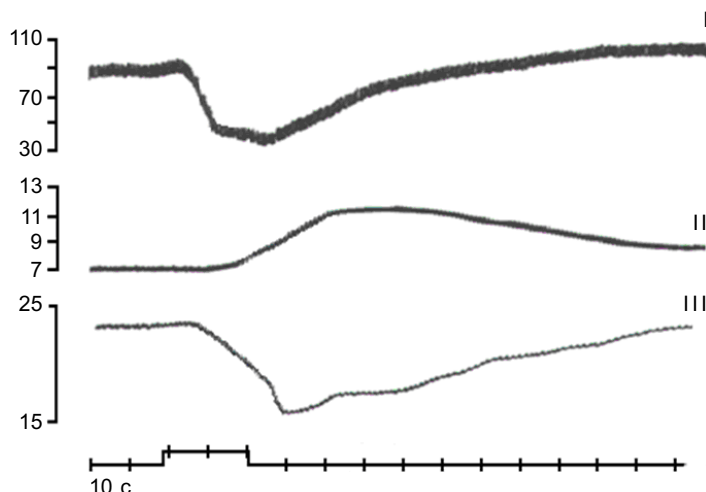


Рис. 1. Зміни системного артеріального тиску (мм рт. ст.; I), тиску у ворітній вені (мм рт. ст.; II) і кровонаповнення печінки (мл/100 г; III) у щурів, при внутрішньопортальному введенні ацетилхоліну (1,2 мкг/кг)

ендотелійнезалежним вазодилататором нітропрусидом натрію, ефект якого на судини пов'язаний з міотропною спазмолітичною дією NO [3]. Внутрішньопортальне введення цього препарату спричиняло зниження тиску у ворітній вені на 17 % ($P < 0,001$) та локального кровотоку на 23 % ($P < 0,05$). Зменшення останнього показника, ймовірно, пов'язане з різким зниженням АТ. Деендотелізація ворітних судин печінки майже не впливала на перебіг реакцій тиску у ворітній вені і швидкості локального кровотоку викликаних нітропрусидом натрію.

Таким чином, можна стверджувати, що зумовлене ацетилхоліном скорочення гладеньком'язових клітин ворітних судин печінки і звуження останніх здійснюється за участю ендотелію цих судин, а їхнім посередником не є оксид азоту. З отриманих результатів випливає також, що ендотелій ворітних судин під впливом АХ синтезує якийсь судинозвужувальний медіатор.

До судинозвужувальних речовин належить досить велика група простагландинів. Наше припущення щодо можливої їх участі у реакціях ворітних судин печінки на АХ було перевірене в дослідах із застосуванням блокатора циклооксигеназного окис-

нення арахідонової кислоти – індометацину. Виявилось, що введення його у портальне русло не змінювало характер реакцій досліджуваних показників кровообігу на АХ: тиск у ворітній вені зростав на 38 %, а кровонаповнення печінки зменшувалося на

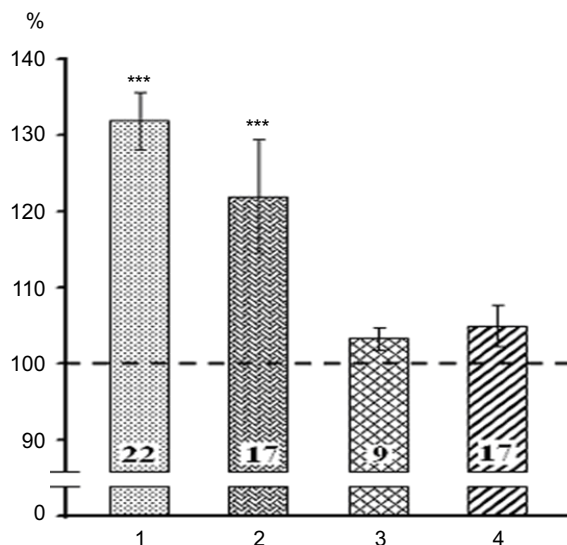


Рис. 2. Реакції тиску у ворітній вені щурів (у % від вихідного рівня) на ацетилхолін (1 мкг/кг) у контролі (1), на фоні дії атропіну (2), після деендотелізації ворітних судин сапоніном (3) та під час дії фентоламіну (4).

*** $P < 0,001$ – вірогідність реакцій відносно вихідного рівня, позначеного пунктирною лінією

28 % ($P < 0,01$). Отже, є підстави вважати, що простаноїди (простагландини H_2 , F_{26} та тромбосани A_2 і B_2) не беруть участі у судинозвужувальних реакціях ворітних судин печінки, зумовлених дією АХ.

Деякі автори [2,17] вважають, що до перебігу пресорної реакції ворітної вени на АХ також можуть бути залучені α -адренорецептори. Наші дослідження показали, що пресорні реакції ворітних судин щурів на АХ значно (на 62–86%) пригнічувалися після внутрішньопортального введення (0,5–1 мг/кг) неселективного блокатора α -адренорецепторів фентоламіну (див. рис.2), при цьому депресорна реакція системного АТ у відповідь на АХ не змінилася.

Усі відомі нині типи М-холінорецепторів є чутливими до атропіну [9]. Тому той факт, що реакції внутрішньопечінкових ворітних судин на АХ не усувались атропіном, наводить нас на думку про можливість реалізації цих реакцій через Н-холінорецептори. До речі, такі рецептори були виявлені недавно на ендотеліальних клітинах кровоносних судин [13,15].

З метою перевірки можливої участі у констрикторних реакціях ворітної вени Н-холінорецепторів на ендотеліоцитах ми використали тубокурарин. У серії дослідів *in vitro* за умов перфузії ворітної вени щурів

розчином з АХ ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) спостерігали тривале тонічне скорочення ворітної вени, амплітуда якого сягала 39 % ($P < 0,05$) від вихідного натягу ($15 \text{ мН} \pm 1 \text{ мН}$). Після деендотелізації препарату сапоніном відповідь на дію АХ зникала, хоча і в цьому разі скоротлива реакція деендотелізованої смужки ворітної вени на дію норадреналіну істотно не змінювалася. Введення тубокурарину ($EC_{50} = 1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л) у перфузат, що омивав препарат ворітної вени, дозозалежно пригнічувало на 20–50 % тонічний компонент скорочувальної реакції ворітної вени, зумовленої дією АХ (рис. 3).

Враховуючи можливу неспецифічну дію тубокурарину, ми провели серію експериментів із застосуванням нікотину, який діє виключно на холінорецептори нікотинного типу [5]. Як відомо, блокувальна дія нікотину виявляється при його високій концентрації ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л і вище) [10]. Перфузія препарату розчином нікотину ($1 \cdot 10^{-4}$ моль/л) призводила до зменшення на 32 % ($P < 0,01$) амплітуди АХ-індукованого скорочення ворітної вени (з $9,04 \pm 1,08$ до $6,63 \text{ мН} \pm 0,7 \text{ мН}$).

Поряд з цим, у нас виникло припущення стосовно того, що звуження ворітних судин печінки під впливом АХ, можливо, пов'язане з активацією Н-холінорецепторів на інтрамуральних нейронах та їхніх нервових

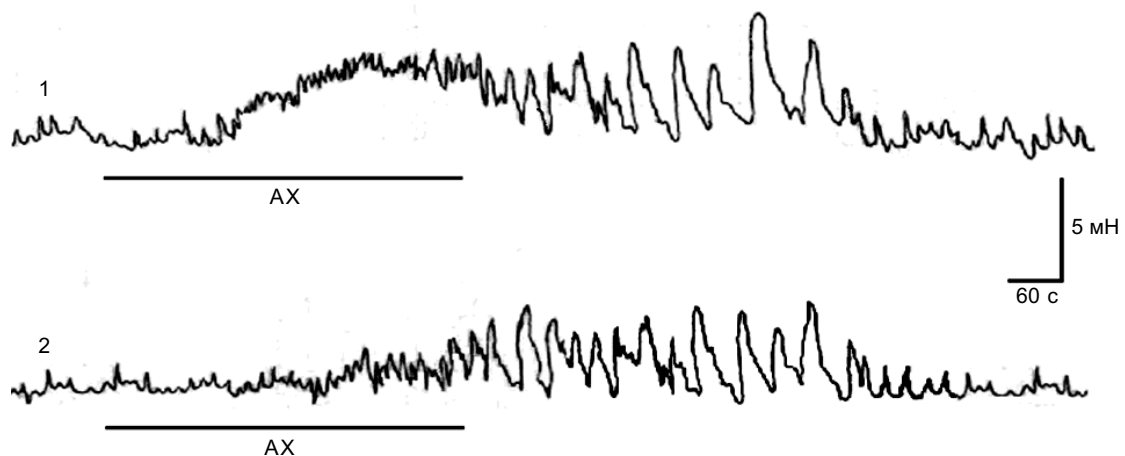


Рис. 3. Реакції ізольованої смужки ворітної вени на ацетилхолін (АХ, $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) до (1) і під час (2) перфузії тубокурарином ($1,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л)

закінченнях, які знаходяться в стінці ворітних судин [1], а також на терміналях адренергічних волокон периваскулярного нервового сплетення. Для оцінки загального можливого внеску нервових елементів ворітної вени у розвиток її скоротливих реакцій на АХ, застосовували блокаду потенціалзалежних натрієвих каналів тетродотоксином, що запобігає виникненню та поширенню збудження по нервових структурах і, відповідно, виключає їхню можливу участь у механізмі таких реакцій ворітної вени. Як засвідчили наші досліди, тетродотоксин не впливав на вихідний натяг і фонову частоту фазних скорочень смужки ворітної вени, але після 15-хвилинної перфузії розчином, що містив одночасно АХ і тетродотоксин, сила скорочення цього препарату зменшилася на 10 % ($P < 0,05$) порівняно з контролем. Це свідчить про можливу участь нервових елементів стінки ворітної вени у скоротливих реакціях її м'язового шару на АХ. Під впливом останнього закінчення адренергічних волокон, імовірно, виділяють норадреналін, який і спричиняє скорочення м'язових клітин препарату ворітної вени.

На користь цього припущення може свідчити порівняння латентних періодів вазомоторних реакцій у дослідах *in vivo*. Так, цей показник для реакцій венозних судин печінки на внутрішньопортальне введення АХ ($14,3 \text{ с} \pm 2,3 \text{ с}$) був майже втричі більшим порівняно з тривалістю латентного періоду змін АТ ($5,0 \text{ с} \pm 0,6 \text{ с}$; див. рис. 1), а також реакцій венозних судин на норадреналін і нітропрурид натрію ($3,0 \pm 0,4$ і $5,7 \text{ с} \pm 0,4 \text{ с}$ відповідно). Такий тривалий час, імовірно, витрачається на синтез ендотеліальними клітинами і вивільнення ними вазоконстрикторних факторів.

Отже, судинозвужувальна дія АХ у ворітному руслі печінки реалізується, частково, через Н-холінорецептори, локалізовані на мембрані ендотеліоцитів ворітних судин печінки або на адренергічних нейронах у

стінках цих судин. Зазначені клітини, в свою чергу, синтезують і виділяють якісь посередники, у тому числі норадреналін, які, діючи на м'язовий шар ворітної вени, призводять до її звуження.

**P.I. Yanchuk, O.M. Pasichnichenko,
V.I. Komarenko, T.P. Prikhodko, V.O. Tsybenko**

ELUCIDATING OF THE MECHANISMS OF ACETYLCHOLINE CONSTRICTOR ACTION ON THE PORTAL VESSELS

Intraportal administration of acetylcholine (Ach) to anesthetized rats evokes endothelium depended, atropine resistant and phentholamine sensitive constriction of hepatic portal vessels. On the contrary to Ach action sodium nitroprussideresulted in vasodilatation in this vessel. On the isolated segment of portal vein (PV) similar results were obtained; at the same time the blockade of nicotinic acetylcholinic receptors by nicotine (in high concentration), tubocurarine or tetradotoxine diminished constrictor reactions of PV to Ach. We concluded that described vasomotor effects of Ach in the hepatic portal bed are carried out through nicotinic Ach-receptors localized on endothelial cells and (or) adrenergic neurones in the wall of portal vessels. These cells synthesize and release mediators, possibly, noradrenaline which causes constriction of portal vessels.

Taras Shevchenko Kyiv National University, Kyiv, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кашель А. Ф. Материалы к сравнительной морфологии нервного аппарата воротной вены и ее крупных притоков: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Симферополь, 1973. – 19 с.
2. Манухин Б. Н., Нестерова Л. А., Шайымов Б. К. Особенности холинэргической реакции воротной вены печени крыс // Физиол. журн. СССР. – 1991. – 77, № 9. – С.102–107.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства. – М.: Медицина, 1986. – Т.1. – С. 445.
4. Москаленко Ю.Д., Демченко И.Т., Буров С.В., Митрофанов В.Ф. Количественная регистрация локального мозгового кровотока с помощью электрохимической генерации водорода // Физиол. журн. СССР. – 1974. – 60, №4. – С.650–660.
5. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. та ін. Роль ендотелію та біологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровообігу і діяльності серця // Фізіол. журн. – 1997. – 43, №1-2. – С.3–18.
6. Харкевич Д.А. Фармакологія. – М.: Медицина, 2000. – С.92–122.

7. Цыбенко В.А., Янчук П.И., Симоненко П.Н. Применение импедансной плетизмографии для изучения депонирующей функции печени // Физиол. журн. – 1984. – **30**, №6. – С.756–758.
8. Шуба М. Ф., Кочемасова Н.Г. Физиология сосудистых гладких мышц. –К.: Наук. думка, 1988. – 222 с.
9. Birdsall N.J.M., Buckley N.J., Caulfield M.P. et al. Muscarinic acetylcholine receptors // J. Receptor Compendium. – 1998. – P.36–45.
10. Condorelli S., Bartolo M., Ginliano G., Patane F., Gaizzi V. Ricerche sperimentali sulla farmacodinamica del circolo portale nel cane // Minerva Cardioangiol. – 1961. – **9**, №7. – P.415–418.
11. Kem W. Neuromuscular blocking agents. – Miami: University of Florida Colledge of Medicine, 1996. – P.115–118.
12. Kristova V., Kriska M., Vojtko R., Kurtansky A. Effect of indometacin and deendothelisation on vascular responses in the renal artery // Physiol. Rev. – 2000. – **49**. – P.1129–1133.
13. Macklin K.D., Maus A.D.J., Pereira E.F.R. et al. Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1998. – **287**, №1. – P.435–439.
14. Miyauchi T., Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system // Annu. Rev. Physiol. – 1999. – **61**. – P.391–415.
15. Moccia F., Frost C., Berra-Romani R. et al. Expression and function of neuronal nicotinic ACh receptors in rat microvascular endothelial cells // Amer. J. Physiol. (Heart. Circulat. Physiol.). – 2004. – **286**, №2. – P. H486–491.
16. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology // Pharmacol. Rev. – 1991. – **43**, №2. – P.102–142.
17. Reilly F. D., Dimlich R. V., Cilento E. V., McCuskey R. S. Hepatic Microvascular regulatory mechanisms. II. Cholinergic mechanisms// Hepatology. – 1982. – **2**, №2. – P.230–235.
18. Tsybenko V.A., Pasichnichenko O.M., Yanchuk P.I., Komarenko V.I. Portal venous constriction to acetylcholine and L-arginine is endothelium dependet. – In: The Biology of Vitric Oxide, part 7. London: Portland Press, 2000. – P.59.
19. Walch L., Gascard J. P., Dulmet E. et al. Evidence for a M(1) muscarinic receptor on the endothelium of human pulmonary veins// Brit. J. Pharmacol. – 2000. – **130**. – P.173–178.

Київ. нац. ун-т ім. Тараса Шевченка

Матеріал надійшов до редакції 01.03.2006