

О.Я. Склярів, Ю.В. Мандрик

Кровотік слизової оболонки шлунка та секреторна функція при блокуванні M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів

В острых экспериментах на крысах под уретановым наркозом методом перфузии исследовалась желудочная секреция, а также скорость кровотока в слизистой оболочке желудка (СОЖ) методом водородного клиренса. Для блокирования M_1 -холинорецепторов использовали внутривенное введение гастропепина (3 мг/кг), L-кальциевых каналов – верапамила гидрохлорида (1,25 мг/кг), совместного блокирования – те же вещества в указанных дозах. Одновременное блокирование M_1 -холинорецепторов и L-кальциевых каналов усиливало их тормозное влияние на секрецию соляной кислоты, которое превосходило изолированное влияние гастропепина и верапамила на 57,3 и 18,6 % соответственно. Пепсиновыделение снижалось на 32 % и существенно не отличалось от соответствующих показателей при самостоятельном действии верапамила. Изменения секреции сопровождалась значительным снижением скорости кровотока в СОЖ. Таким образом, роль M_1 -холинорецепторов в регуляции базальной желудочной секреции при их блокировании гастропепином незначительная, но они проявляют модулирующий эффект в условиях торможения кислотообразования связано с одновременным угнетением передачи возбуждения в ганглионарных нейронах и выделением ацетилхолина с постганглионарных нейронов блуждающего нерва. Снижение скорости кровотока в этих условиях связано с синергическим блокированием M_1 -холинорецепторов и L-кальциевых каналов гладких мышц сосудов.

ВСТУП

У регуляції шлункової секреції провідне місце займає блукаючий нерв. За участю його аферентних закінчень нормалізується стан мікрогемодинаміки [3], центральні та гангліонарні холінорецептори забезпечують модулювання тонічної активності еферентних холінергічних волокон, а за участю холінорецепторів секреторних та ендокринних клітин реалізуються процеси секреції, моторики та цитопротекції [4]. Молекулярним клонуванням було ідентифіковано п'ять мускаринових ацетилхолінових рецепторних (mAChR) генів, що позначені як m1-m5 [9], а відповідні рецептори – M_1 - M_5 [17]. Вважається, що на поверхні базолатеральної

мембрани парієтальних клітин знаходяться M_3 -холінорецептори [11], а M_1 -холінорецептори розташовані на мембранах гангліонарних нейронів [6]. Нещодавно було встановлено, що блокатор M_1 -холінорецепторів пірензепін (гастропепін) зменшував вивільнення гістаміну з ентохромафінних клітин [23] і гастрину із G-клітин [28]. Секреція бікарбонатів і муцину у шлунку зменшувалася при дії пірензепіну у дослідженнях на щурах [14].

Особливу роль у регуляції секреторної функції шлункових залоз займають іони кальцію. При дії нервово-гуморальних факторів через потенціалзалежні або хемочутливі кальцієві канали Ca^{2+} потрапляє до клітини. L-кальцієві канали локалі-

© О.Я. Склярів, Ю.В. Мандрик

зуються на мембранах нервових [21], ендокринних (ECL- і D-клітинах) [15, 29] і гладеньком'язових клітинах [25] слизової оболонки шлунка (СОШ).

Між секрецією шлункових залоз і кровотоком у СОШ існує тісний зв'язок. Так, при дії ацетилхоліну, гістаміну та карбахоліну підвищується секреція шлункових залоз і швидкість кровотоку [12, 27].

Таким чином, наявність M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів на мембранах нейронів метасимпатичної нервової системи, ендокринних клітинах СОШ і гладеньком'язових клітинах судин визначає необхідність з'ясування їх ролі в регуляції шлункової секреції та кровотоку.

МЕТОДИКА

Дослідження секреторної функції шлункових залоз проводили в гострих дослідах під уретановим наркозом (1,1 мг/кг) на 62 статевозрілих самцях щурів лінії Вістар. Секрецію досліджували за допомогою перфузії шлунка фізіологічним розчином [2]. Після лапаротомії шлунок катетеризували: вхідний катетер вводили через передшлунок, де його фіксували кисетним швом, а вихідний – через проксимальний відділ дванадцятипалої кишки, де його фіксували лігатурою на рівні пілоричного сфінктера. Фізіологічний розчин (37°C) зі швидкістю 0,4 мл/хв подавали перистальтичним насосом, під'єднаним до вхідного катетера. Перед збором першої проби базальної секреції шлунок перфузували, як описано вище, впродовж 45 хв з метою стабілізації його секреції. Після цього вводили один з указаних блокаторів і досліджували кислотопродукуючу (рН, дебіт іонів водню) та пепсиновидільну функцію шлункових залоз у зібраних 15-хвилинних пробах перфузату впродовж 2 год.

Визначення швидкості кровотоку у СОШ проводили методом водневого кліренсу [18], реєструючи криву насичення та очищення СОШ від водню, який вводили

за допомогою інгаляції. Для цього наркотизованій дослідній тварині (1,1 мг/кг) у слизову оболонку фундальної частини шлунка вживляли платиновий електрод ("Medicor", Угорщина) з діаметром активної поверхні 10 мкм, інший – індіферентний, срібний, фіксували під шкірою на передній групі м'язів стегна. Для реєстрації сигналів використовували полярограф РА-2 (Чехія). Перед введенням відповідних блокаторів здійснювали запис вихідного рівня кровотоку. Пізніше реєстрацію проводили на 5, 15, 30, 45 та 60-й хвилині з моменту введення речовин. Зміни швидкості кровотоку під дією препаратів розраховували у відсотках порівняно з показниками у групі тварин, яким вводили відповідний об'єм фізіологічного розчину (контроль).

Для блокування M_1 -холінорецепторів застосовували гастроцепін ("Boehringer Ingelheim", Німеччина) у дозі 3 мг/кг [24], L-кальцієвих каналів – верапаміл гідрохлорид ("Дарниця", Україна) в дозі 1,25 мг/кг [4]. При спільному блокуванні ці речовини застосовували одноразово у наведених вище дозах. Усі речовини вводили в стегнову вену через попередньо зроблений доступ, а об'єм кожної з них не перевищував 0,1 мл.

Одержані результати піддавали обробці комп'ютерним тестом ANOVA із застосуванням непараметричних методів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У разі застосування гастроцепіну кислото-виділення суттєво не змінювалося, а блокування L-кальцієвих каналів верапамілом призводило до вираженого зниження виділення кислоти впродовж двох годин. Порівнюючи динаміку секреції H^+ за умов спільного блокування M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів з їх ізольованою дією у контрольних тварин, було виявлено посилення гальмування секреції кислоти до 35 % впродовж двогодинного спостереження (рис. 1). Так, концентрація H^+ на

60-й хвилині була на 35 % меншою порівняно з самостійним блокуванням M_1 -холінорецепторів гастроцепіном та на 23 % – при блокуванні L-кальцієвих каналів верапаміном. Більш виражене блокування секреції спостерігалось при порівнянні дебіту соляної кислоти. Так, за першу годину досліду дебіт H^+ був меншим на 114 % ($P<0,05$) порівняно з дією самого гастроцепіну та на 77 % ($P<0,05$) за умов дії верапамілу. Подібні зміни спостерігання і впродовж другої години.

Пепсиновиділення при самостійному блокуванні M_1 -холінорецепторів суттєво не змінювалося, натомість блокування L-кальцієвих каналів викликало значне зменшення

концентрації пепсину у перфузаті. Спільне блокування M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів на 60-й хвилині ($38,5 \text{ мкг/мл} \pm 3,49 \text{ мкг/мл}$) пригнічувало пепсиновидільну функцію головних клітин на 32 % порівняно з контролем. Ефект гальмування був на 21 % ($P<0,05$) більш вираженим, ніж при блокуванні лише M_1 -холінорецепторів та на 16 % ($P<0,05$) – порівняно з дією верапамілу. Дебіт пепсину за першу годину був на 52 % нижчим від значень показників у групі з ізольованим впливом гастроцепіну і на 49 % – порівняно з самостійним блокуванням L-кальцієвих каналів (рис. 2). На 120-й хвилині експерименту концентрація пепсину в одержаному перфузаті ($25,38 \text{ мкг/мл} \pm$

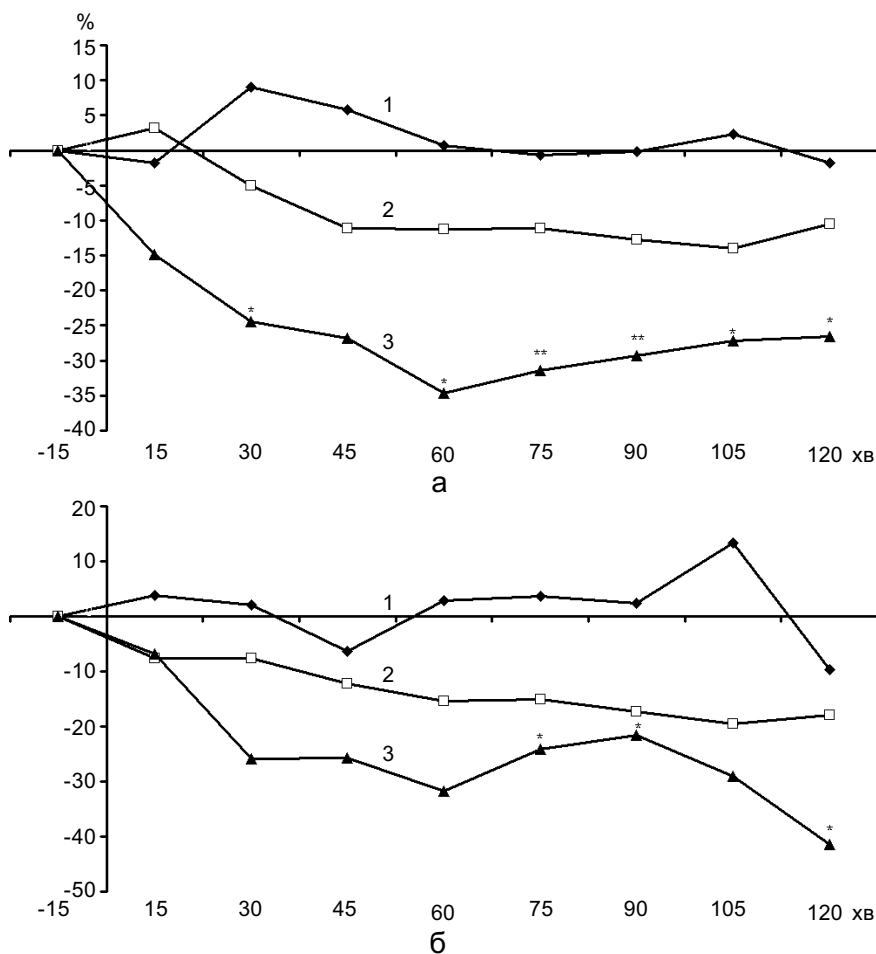


Рис. 1. Динаміка кислотопродукуючої (а) та пепсиновидільної (б) функцій шлункових залоз при блокуванні M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів: 1 – гастроцепін, 2 – верапаміл, 3 – гастроцепін і верапаміл.

* $P<0,05$, ** $P<0,01$ порівняно з контролем (тут і на рис. 2, 3)

3,60 мкг/мл) однаково відрізнялася від такої при блокуванні лише L-кальцієвих (24 %, $P<0,05$) та M_1 -холінорецепторів гастроцепіном (24 %, $P<0,05$).

Самостійне блокування як M_1 -холінорецепторів, так і L-кальцієвих каналів призвело до зменшення швидкості кровотоку у СОШ внаслідок вазодилатації. Показники кровотоку при спільному блокуванні мали свої особливості (рис. 3). Найбільш суттєве їх зменшення спостерігалось на 5-й хвилині, коли швидкість кровотоку зменшилася на 90 % ($P<0,01$) порівняно з контролем. На 30-й хвилині швидкість кровотоку поступово відновилася на 22 % ($P=0,006$), а на 60-й хвилині становила 60,2 % ($P=0,001$) від свого вихідного рівня. Зниження швидкості кровотоку на 5-й хвилині було на 56 % більшим, ніж при дії гастроцепіну та на 17 % порівняно з дією лише верапамілу. Подібна

закономірність спостерігалась до кінця експерименту, що свідчить про різний механізм впливу верапамілу та гастроцепіну на процеси мікрогемодинаміки у СОШ.

При порівнянні динаміки секреції шлункових залоз і показників швидкості кровотоку було виявлено, що найбільш виражені зміни мікрогемодинаміки відбуваються впродовж перших 5 хв, тоді як блокування секреції кислоти проявлялося в кінці першої години.

Зіставляючи отримані нами результати з даними літератури, слід відмітити, що в попередніх дослідженнях показано гальмування гастроцепіном стимульованої шлункової секреції в дослідках на собаках [1] та у людей, хворих на виразкову хворобу шлунка [26]. За цих умов зменшення кислотовиділення пов'язують з блокуванням M_1 -холінорецепторів гастроцепіном ентерохрома-

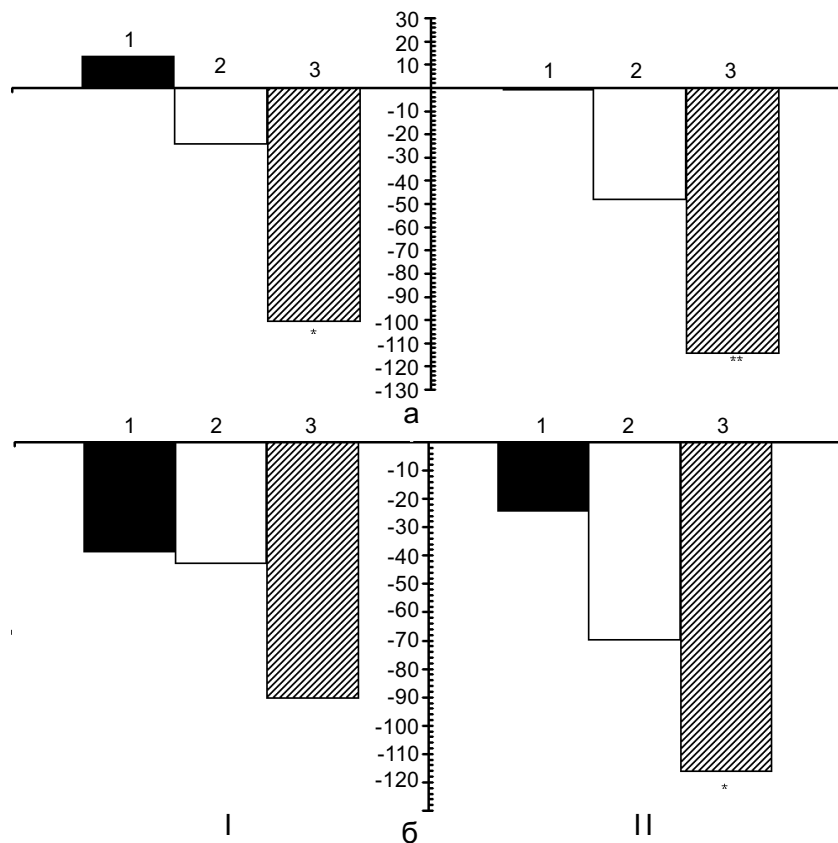


Рис. 2. Динаміка дебіту іонів водню (а) та пепсину (б) при блокуванні M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів за першу (I) та другу (II) годину: 1 – гастроцепін, 2 – верапаміл, 3 – гастроцепін і верапаміл

фінних клітин і нейронів метасимпатичної нервової системи, що призводить до пригнічення виділення гістаміну та блокування передачі нервових імпульсів по нейронах [6, 23].

Отримані нами результати щодо блокування M_1 -холінорецепторів гастроцепіном (3 мг/кг) свідчать про їх незначну роль у регуляції базальної секреції кислоти та пепсину шлунковими залозами. Це пов'язано з високим рівнем базальної секреції у щурів, яка підтримується ендogenousними стимуляторами, та незначним пригніченням за допомогою гастроцепіну еферентної імпульсації блукаючого нерва (23 %) [22].

Здатність гастроцепіну змінювати швидкість кровотоку у СОШ дискутується. Блокування M_1 -холінорецепторів у наших дослідженнях викликало істотне зменшення цього показника, що свідчить про їх участь у реалізації судинної відповіді, яка, можливо, модулюється нейронами метасимпатичної нервової системи. Підґрунтям для пояснення цих змін є дані щодо прямої холінергічної іннервації дрібних судин слизової та підслизової оболонок шлунка [20, 27], що пов'язують з вазодилатацією у СОШ при введенні гастроцепіну у дозах 5, 10, 20 мг/кг [13].

Згідно з нашими результатами, введення верапамілу (1,25 мг/кг) призводило до

помірно наростаючого гальмування кислото- та пепсиновиділення базальної секреції у щурів. Попередніми дослідженнями *in vivo* було показано зниження кислотовиділення базальної секреції у щурів під впливом ніфедипіну та верапамілу [7]. У досліджах *in vitro* на ізольованих парієтальних клітинах морських свинок і кролів, а також на ізольованих шлункових мембранах свиней блокування кислотопродукції при дії верапамілу пов'язують з пригніченням H^+ , K^+ -АТФазної активності внаслідок високої ліпофільності верапамілу [8, 10, 19]. В умовах цілісного організму зменшення секреції шлункових залоз при застосуванні останнього пов'язано зі зменшенням виділення гістаміну з ентерохроматинних клітин, на мембранах яких ідентифіковані L- і N-кальцієві канали [30], а також внаслідок блокування виділення ацетилхоліну з постгангліонарних холінергічних нейронів [21]. Блокування L-кальцієвих каналів призводило до характерної вазодилатації судин шлунка [5] та зменшення швидкості кровотоку у СОШ [16].

Спільне блокування M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів характеризується посиленням гальмування кислото- та пепсиновидільної функції шлункових залоз та різким зниженням швидкості кровотоку,

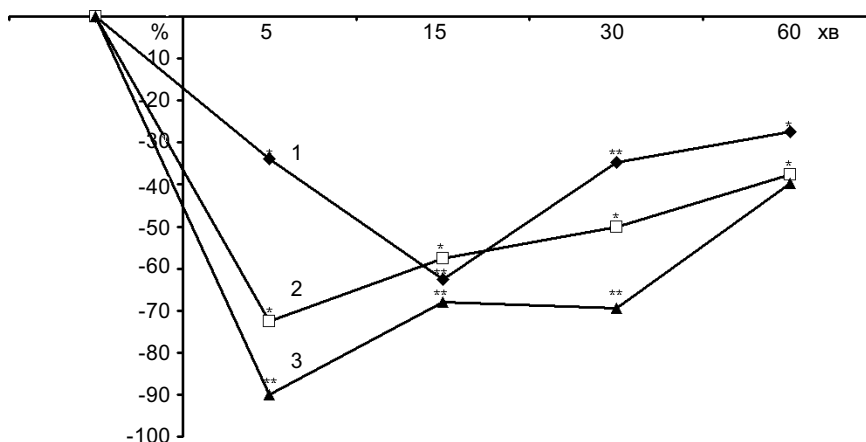


Рис. 3. Динаміка швидкості кровотоку у слизовій оболонці шлунка при блокуванні L-кальцієвих каналів і M_1 -холінорецепторів: 1 – гастроцепін, 2 – верапаміл, 3 – гастроцепін і верапаміл

особливо впродовж перших 5 хв. Посилення гальмування кислотовидільної функції парієтальних клітин, можливо, пов'язано з одночасним пригніченням передачі збудження в гангліонарних нейронах та виділенням ацетилхоліну з постгангліонарних нейронів блукаючого нерва.

Зменшення швидкості кровотоку за цих умов пов'язано з синергічним блокуванням M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів гладеньких м'язів судин. Слід відзначити, що секреторна функція шлункових залоз і кровотік у СОШ змінюються неоднозначно: наростає посилення гальмування виділення кислоти впродовж досліду супроводжувалося гіперемією у СОШ, що свідчить про особливості регуляції секреції та кровотоку M_1 -холінорецепторами та L-кальцієвими каналами.

Отримані результати щодо спільної дії верапамілу та гастроцепіну з одного боку показують значення та взаємовідносини M_1 -холінорецепторів і L-кальцієвих каналів внаслідок шлункової секреції та кровотоку, а з іншого – дають змогу їх застосувати в клінічній практиці для стимуляції гастропротективних процесів у СОШ за допомогою посилення інгібування секреції та збільшення швидкості кровотоку.

A. Sklyarov Y. Mandryk

GASTRIC SECRETION AND MUCOSAL BLOOD FLOW DURING SIMULTANEOUS INHIBITION OF M_1 -CHOLINERGIC RECEPTORS AND L-Ca²⁺-CHANNELS IN ANAESTHETIZED RATS

The gastric secretion and gastric mucosal blood flow (GMBF) under simultaneous action of M_1 -cholinergic antagonist gastrocepine (3 mg/kg i.v.) and L-Ca²⁺-channels blocker verapamil (1.25 mg/kg i.v.) were investigated in urethane-anaesthetized rats. The stomach was perfused with saline, and GMBF was measured by using hydrogen gas clearance technique. The acid production under combined action of both blockers was lower by 57.3 % and 18.6 %, than in case of separate action of gastrocepine and verapamil accordingly. Pepsin concentration decreased by 32 %, which did not differ from verapamil action alone. The above changes of gastric secretion was accompanied by significant decrease of GMBF. Inhibition of M_1 -cholinergic receptors by gastrocepine did not

show their key role in basal gastric secretion in rats, but they exacerbate L-Ca²⁺-channels blocker action. We conclude, that enhance of acid output inhibition is related to the simultaneous depression of nervous impulses in ganglionic neurons and acetylcholine release from parasympathetic postganglionic neurons. Synchronous block of M_1 -cholinergic receptors and L-Ca²⁺-channels of smooth muscles stomach vessels resulted in reducing of gastric mucosal blood flow.

Lviv National Medical University named after Danylo Galatsky

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Берегова Т.В. Роль блукаючих нервів у центральному гальмуванні шлункової секреції: Автореф. ... дис. д-ра біол.наук. – К., 2001. – 35 с.
2. Гройсман С.Д., Губкин В.А., Береговая Т.В. Полуавтоматическая электрометрическая установка для титрования желудочного сока // Лаб. дело. – 1988. – №9. – С.66–67.
3. Золотарев В.А., Ноздрачев А.Д. Капсаицинчувствительные эффекты блуждающего нерва // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2001. – **87**, №2. – С.182–196.
4. Al-Dohayan A.D. al-Tuwaijri A.S. The potential synergic effect of calcium channel blockers and alpha-tocopherol on gastric mucosal injury induced by ischaemia-reperfusion // Eur. J. Gastroenterol. and Hepatol. – 1996. – **8**, №11. – P.1107–1110.
5. Ali A.T., Montgomery W.D., Santamore W.P., Spence P.A. Preventing gastroepiploic artery spasm: papaverine vs calcium channel blockade // J. Surg. Res. – 1997. – **71**, №1. – P.41–48.
6. Del Tacca M., Danesi R., Blandizzi C., Bernardini M.C. A selective antimuscarinic agent: pirenzepine. Review of its pharmacologic and clinical properties // Minerva Dietol. Gastroenterol. – 1989. – **35**, №3. – P.175–189.
7. Glavin G.B. Verapamil and nifedipine effects on gastric acid secretion and ulcer formation in rats // J. Pharm. Pharmacol. – 1988. – **40**, №7. – P.514–515.
8. Herling A.W., Ljungstrom M. Effects of verapamil on gastric acid secretion in vitro and vivo // Eur. J. Pharmacol. – 1988. – **156**, №3. – P.341–350.
9. Hulme E.C., Birdsall N.J.M., Buckley N.J. Muscarinic receptor subtypes // Ann. Rev. Physiol. – 1990. – **30**. – P.633–673.
10. Im W.B., Blakeman D.P., Mendlein J., Sachs G. Inhibition of (H⁺, K⁺)-ATPase and H⁺ accumulation in hog gastric membranes by trifluoperazine, verapamil and 8-(N,N-diethylamino)octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate // Biochim. and Biophys. Acta. – 1984. – **770**, №1. – P.65–72.
11. Kajimura M., Reuben M.A., Sachs G. The muscarinic receptor gene expressed in rabbit parietal cells is the M_3 subtype // Gastroenterology. – 1992. – **23**. –

- P.1049–1056.
12. Kato S., Okabe S., Takeuchi K. Pathways mediating pentagastrin-induced mucosal blood flow response in rat stomachs // *Dig. Diseases and Sci.* – 1996. – **41**, №3. – P.485–491.
 13. Ko J.K., Cho C.H., Ogle C.W. The vagus nerve and its non-cholinergic mechanism in the modulation of ethanol-induced gastric mucosal damage in rats // *J. Pharm. Pharmacol.* – 1994. – **46**, №1. – P.29–33.
 14. Kojima Y., Ishihara K., Komuro Y. et al. Effects of the muscarinic receptor agonist carbachol and/or antagonist pirenzepine on gastric mucus secretion in rats // *Scand J. Gastroenterol.* – 1993. – **28**, №7. – P.647–651.
 15. Lindstrom E., Eliasson L., Bjorkqvist M., Hakanson R. Gastric and neuropeptide PACAP evoke secretion from rat stomach histamine-containing (ECL) cells by stimulating influx through different Ca^{2+} channels // *J. Physiol.* – 2001. – **535**, №3. – P.663–677.
 16. Lio X.G., Cho C.H., Ko J.K. Felodipine- and ethanol-induced gastric mucosal damage in rats // *Pharmacology.* – 1995. – **51**, №6. – P.391–397.
 17. Malcom P., Caulfield M.P., Birdsall N.J.M. International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors // *Pharmacol. Rev.* – 1998. – **50**. – P.279–290.
 18. Murakami M., Moriga M., Miyake T., Uchino H. Contact Electrode Method in Hydrogen Gas Clearance Technique: A new Method for Determination of Regional Gastric Mucosal Blood Flow in Animals and Humans // *Gastroenterology.* – 1982. – **82**, №3. – P.458–466.
 19. Muto N. Changes in cytosolic free Ca^{2+} by histamine stimulation in isolated guinea-pig parietal cells (second report) // *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi.* – 1989. – **86**, №6. – P.1246–1253.
 20. Oda M., Nakamura, Honda K. et al. Alterations in gastric mucosal microvascular endothelium in a stressed condition-relevance to gastric ulcerogenesis // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1998. – **242**. – P.161–175.
 21. Parkman H.P., Pagano A.P., Martin J.S., Ryan J.P. Electric field stimulation-induced guinea pig gallbladder contractions: role of calcium channels in acetylcholine release // *Dig. Dis. Sci.* – 1997. – **42**. – P.1919–1925.
 22. Partosoedarso E.R., Blackshaw L.A. Roles of central glutamate, acetylcholine and CGRP receptors in gastrointestinal afferent inputs to vagal preganglionic neurones // *Auton Neurosci.* – 2000. – **83**, №1–2. – P.37–48.
 23. Sandor A., Kidd M., Lawton G. et al. Neurohormonal modulation of rat enterochromaffin-like cell histamine secretion // *Gastroenterology.* – 1996. – **110**. – P.1084–1092.
 24. Sigman H.H., Poleski M.H., Gillich A. Effect of pirenzepine on acute mucosal erosions, gastric acid and mucosal blood flow in the spinal rat stomach // *Digestion.* – 1991. – **49**, №4. – P.185–191.
 25. Sims S.M. Calcium and potassium currents in canine gastric smooth muscle cells // *Amer. J. Physiol.* – 1992. – **262**. – P.859–867.
 26. Tari A., Kuruhara Y., Yamanuchi R., Okahara S., Sumii K., Kajiyama G. Effects of omeprazole and pirenzepine on enterochromaffin-like cells and parietal cells in rat stomach // *J. Gastroenterol.* – 2001. – **36**, № 6. – P.436–437.
 27. Urakawa T., Nagahata Y., Kawakita N. Effect of pirenzepine on postoperative gastric secretion // *Kobe. J. Med. Sci.* – 1993. – **39**, №2. – P.69–79.
 28. Vanner S., Surprenant A. Neural reflexes controlling intestinal microcirculation // *Amer. J. Physiol.* – 1996. – **271**, №2, Pt 1. – P.223–230.
 29. Yokotani K., DelValle J., Park J., Yamada T. Muscarinic M3 receptor-mediated release of gastrin from canine antral G cells in primary culture // *Digestion.* – 1995. – **56**, №1. – P.31–34.
 30. Zeng N., Athmann C., Kang T. et al. Role of neuropeptide-sensitive L-type Ca^{2+} channels in histamine release in gastric enterochromaffin-like cells // *Amer. J. Physiol.* – 1999. – **277**, №6, Pt 1. – P.1268–1280.