

Скоротлива активність ізольованих препаратів ворітної вени печінки щурів під дією ацетилхоліну та L-аргініну

О.М. Пасічніченко, П.І. Янчук, М.Ю. Макаrchук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка; e-mail: pasichnichenko@knu.ua

У гострих експериментах на щурах, з використанням тензометричної методики було досліджено дію ацетилхоліну і L-аргініну на гладенькі м'язи ізольованих препаратів ворітної вени печінки щурів. Ацетилхолін ($1 \cdot 10^4$ моль/л) та L-аргінін ($5,6 \cdot 10^4$ моль/л) викликали скорочення ворітної вени з інтактним ендотелієм. Деендотелізація препаратів сапоніном (1 мг/мл) приводила до зменшення амплітуди скорочення під впливом досліджуваних речовин. Отримані результати свідчать про ендотелійзалежне скорочення ворітної вени під впливом ацетилхоліну та L-аргініну, а також ймовірне залучення продуктів перетворення оксиду азоту ендотеліального походження до індукції таких реакцій.

Ключові слова: ацетилхолін; L-аргінін; ворітна вена; ендотелій; оксид азоту.

ВСТУП

Нормальне кровопостачання печінки є запорукою виконання нею численних функцій. Печінка має подвійне кровопостачання, яке здійснюється по печінковій артерії та ворітній вені. Близько 80% крові надходить до печінки саме через ворітне русло, тому підтримання тиску у ворітній вені має велике значення для нормального функціонування органа і регулюється багатьма нейрогуморальними механізмами, в тому числі ендотелійзалежними факторами, а саме, монооксидом азоту та вуглецю, сірководнем, ендотеліном, простаноїдами тощо. Ендотеліальна дисфункція часто полягає у порушенні рівноваги між констрикторними і дилаторними ендотеліальними факторами і є причиною розвитку портальної гіпертензії, цирозу печінки. Знання ендотелійзалежних механізмів регуляції тону судин дає змогу проводити фармакологічну корекцію, спрямовану на профілактику патологій, пов'язаних з порушенням кровообігу у печінці.

Загальновідомо, що під впливом аце-

тилхоліну спостерігається розслаблення гладеньких м'язів (ГМ) артерій [1, 2]. За сучасними уявленнями, така дія ацетилхоліну опосередковується ендотелієм більшості кровоносних судин, клітини якого під впливом ацетилхоліну виробляють та виділяють ендотелійзалежний розслаблюючий фактор, а саме оксид азоту (NO), що синтезується з амінокислоти L-аргініну за наявності ферменту NO-синтази (NOS) [3, 4].

На відміну від артерій вени мають меншу чутливість до ацетилхоліну і на його дію відповідають меншою релаксацією, або ж зовсім не розслаблюються [5], а судини ворітної системи печінки взагалі звужуються [6, 7]. Якщо така дія ацетилхоліну на ГМ ворітної вени опосередковується ендотеліальним NO, подібно до артерій, то цілком закономірно виникає гіпотеза про можливу констрикторну роль NO.

Дані робіт, присвячених з'ясуванню справжнього значення NO у регуляції тону судин ворітної системи печінки, вказують на те, що ендотеліальний NO може відігравати роль констрикторного фактора. Показано, що

попередник NO, амінокислота L-аргінін, викликає релаксацію артерій [8], але зумовлює підвищення тиску у ворітній системі печінки щурів [9]. Цікаво, що й венозні судини легень на аплікацію L-аргініну теж реагують скороченням [10].

Але водночас є дані, хоча й непрямі, про судинорозширювальну роль NO у порталному руслі: введення блокатора синтезу NO підвищувало тиск у ворітній вені щура [11], а, отже, питання про значення NO у ворітному руслі печінки остаточно ще не вирішено.

Метою нашого дослідження було подальше з'ясування фізіологічної ролі ендотеліального NO у здійсненні судиннорухових реакцій у ворітній системі печінки, для чого вивчали вплив ацетилхоліну та L-аргініну на скоротливу активність ізольованих препаратів ворітної вени печінки щурів з видаленим ендотелієм.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили згідно з чинними міжнародними вимогами та нормами гуманного ставлення до тварин (Страсбург, 1986 р., Закон України від 21 лютого 2006 р. № 3447-IV), відповідно до рішення Комітету з біологічної етики Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3 від 9 квітня 2009 р.).

Дослідження здійснено на білих лабораторних щурах обох статей масою 300–380 г в умовах гострого досліду. Після евтаназії тварин із застосуванням парів хлороформу з подальшим кровопусканням, хірургічними методами відкривали черевну порожнину та видаляли ворітну вену. Відпрепаровану її ділянку нарізали кільцями шириною 2–3 мм, які фіксували у плексигласовій камері з проточним (2–2,5 мл/хв) розчином Тіроде звичайного складу, підігрітим до 37°C, де вони підлягали початковому розтягненню з силою 10–12 мН впродовж 20–30 хв.

За допомогою тензометричної установки реєстрували скорочення ізольованого судинного препарату. Як реєстраційний датчик використовували ємнісний механоелектричний перетворювач, створений дослідно-конструкторським відділом Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Для підсилення його сигналу застосовували підсилювач постійного струму, змонтований на мікросхемі 140 ЧД8. Далі аналоговий сигнал відцифровували за допомогою аналого-цифрового перетворювача (АЦП) та виводили на жорсткий диск і водночас на монітор персонального комп'ютера. Для реєстрації результатів використовували програму «PowerGraph ver. 2.1». Як АЦП слугувала стандартна звукова карта AWE64 виробництва фірми «Creative» (США) разом з стереотрактом, який дає змогу проводити одночасний запис електричних сигналів з двох незалежних датчиків. Усі виміри змін тонічного напруження гладком'язових препаратів ворітної вени здійснювали в міліньютонках.

Для статистичних розрахунків використовували також відносну амплітуду скорочення судинних препаратів, яку визначали як відсоток від сили вихідного натягу, яку розвиває кільце ворітної вени після застосування початкового навантаження.

Хід експериментів передбачав дослідження впливу ацетилхоліну та L-аргініну (по 30 спроб) на 22 препарати ворітної вени з інтактним ендотелієм та після деендотелізації сапоніном (1 мг/мл) протягом 10 хв. У роботі було використано L-аргінін («Sigma», США), ацетилхолін (БАТ «Здоров'я», Україна) та сапонін («Merk», Німеччина).

Для проведення статистичної обробки отриманих результатів використовували аналітичний пакет Statistica 6.0. Перевірку на нормальність виконували за критерієм Шапіро-Уїлка. Статистичну обробку здійснювали з використанням критерію t Стьюдента. Результати представлено у вигляді $M \pm m$ (середнє значення $\pm$ помилка середнього).

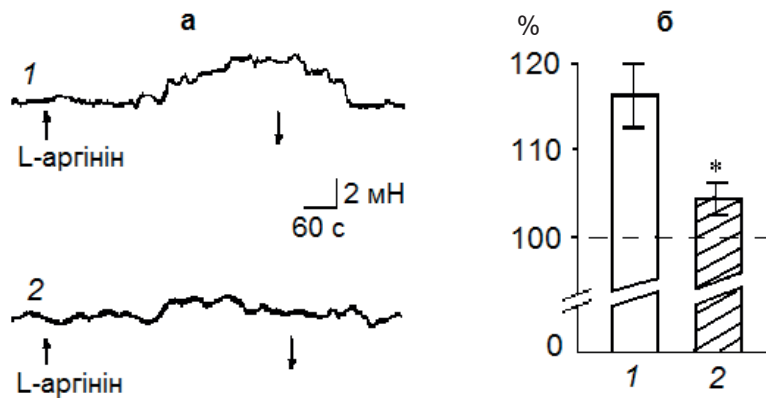
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У серії експериментів дослідили реакції ізольованих препаратів ворітної вени на аплікацію ацетилхоліну в концентраціях $1 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-8}$ моль/л. У всіх застосованих концентраціях ацетилхолін викликав концентраційнозалежне скорочення м'язових препаратів щодо сили вихідного натягу препаратів. У концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л він спричиняв максимальне скорочення ворітної вени, яке сягало $39,5 \pm 1,5\%$ ($n = 9$) від сили вихідного натягу препаратів ($10,2 \pm 1,4$ мН). Видалення ендотеліального шару сапоніном (1 мг·мл/хв) значно пригнічувало відповіді ворітної вени на дію ацетилхоліну, які становили $8,3 \pm 0,4\%$ ($n = 9$).

У наступній серії експериментів вивчали реакції препаратів ворітної вени на аплікацію L-аргініну в концентраціях $1 \cdot 10^{-3} - 1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. У всіх застосованих концентраціях L-аргінін викликав залежне від концентрації скорочення ворітної вени щодо сили вихідного натягу ізольованих препаратів. Так, амплітуда скорочення під дією L-аргініну у дозі $5,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л становила $17,2 \pm 4,1\%$ ($n = 10$; рисунок). Після деендотелізації препаратів відповідь на введення L-аргініну ($5,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л) зменшувалася до $3,7 \pm 0,7\%$ ($n = 10$; див. рисунок).

Таким чином, ацетилхолін та попередник синтезу оксиду азоту L-аргінін, які є відомими вазодилаторами [5, 8, 10], викликали в наших експериментах скорочення ворітної вени щурів, діючи через ендотелій, що підтверджують досліди з деендотелізацією сапоніном. Розглядалося припущення, що ендотеліальним фактором, який опосередковує скорочення ворітної вени під дією ацетилхоліну та L-аргініну, є оксид азоту, оскільки блокатор NOS N-монометил-L-аргінін (N-MMLA) усуває підвищення тиску у ворітній вені, зумовленого внутрішньопортальним введенням ацетилхоліну та L-аргініну [12]. Але в дослідях на ізольованих препаратах ворітної вени інший блокатор NOS метиловий ефір NG-нітро-L-аргінін (L-NAME) не впливає на тонічне скорочення кільцевих препаратів ворітної вени. Можливим поясненням констрикторної дії ацетилхоліну і L-аргініну на ворітну вену може бути припущення про активацію синтезу ендотеліальних констрикторних факторів, зокрема таких, як ендотелін [13], пероксид водню і пероксинітрит [8] та супероксидний аніон [10, 14], який до того ж здатний інактивувати NO [11].

Таким чином, існує можливість різних механізмів, які зумовлюють скорочення ворітної вени під впливом ацетилхоліну і



Вплив L-аргініну на скоротливу активність ворітної вени до (1) та після (2) деендотелізації сапоніном: а – запис скорочення одного препарату ворітної вени; стрілочками показано початок (↑) та припинення (↓) аплікації L-аргініну; б – відносна амплітуда скорочення (% від вихідного натягу; $M \pm m$; $n = 10$). * $P < 0,05$ порівняно з контрольною реакцією до деендотелізації

L-аргініну, однак з'ясування цих механізмів потребує додаткових досліджень.

ВИСНОВКИ

1. Ацетилхолін та попередник синтезу оксиду азоту L-аргінін викликають ендотелійзалежне скорочення ізольованих гладком'язових препаратів ворітної вени печінки щурів.

2. Продукти перетворення оксиду азоту, ймовірно, ендотеліального походження, залучені у опосередкування констрикторної дії ацетилхоліну та L-аргініну на ворітну вену.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**O.M. Pasichnichenko, P.I. Yanchuk,
M.Yu. Makarchuk**

CONTRACTILE ACTIVITY OF ISOLATED PREPARATIONS OF THE RAT LIVER PORTAL VEIN UNDER THE ACTION OF ACETYLCHOLINE AND L-ARGININE

*Taras Shevchenko National University of Kyiv;
e-mail: pasichnichenko@knu.ua*

In acute experiments on rats, using the strain gauge method, the effect of acetylcholine and L-arginine on the smooth muscles of isolated preparations of the portal vein (PV) of the rat liver were investigated. Acetylcholine ($1 \cdot 10^{-4}$ M) and L-arginine ($5.6 \cdot 10^{-4}$ M) caused contraction of PV with intact endothelium. De-endothelization of the preparations by saponin (1 mg/ml) led to decrease in the amplitude of contraction under the influence of the studied substances. The results obtained indicate an endothelium-dependent contraction of PV under the influence of acetylcholine and L-arginine, as well as the probable involvement of nitric oxide transformation products of endothelial origin in inducing such reaction.

Key words: acetylcholine; L-arginine; portal vein; endothelium; nitric oxide.

REFERENCES

1. Furchgott R, Zawadzki S. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 228: 373-6.
2. Matsumoto T, Kudo M, Osada T, Taguchi K, Kobayashi T. Methylglyoxal impairs ATP- and UTP-induced relaxation in the rat carotid arteries. *Eur J Pharmacol*. 2022; 933:175259.
3. Sokolova LK, Pushkar'ov VM, Tron'ko MD. L-arginine is normal and pathological. *Endokrynolohiia*. 2019; 24(4):373-85. [Ukrainian].
4. Sudar-Milovanovic E, Obradovic M, Jovanovic A, Zaric B, Zafirovic S, Panic A, et al. Benefits of L-arginine on cardiovascular system. *Mini Rev Med Chem*. 2016; 16(2): 94-103.
5. Feletou M, Hoefner U, Vanhutte P. Endothelium dependent relaxing factor do not affect the smooth muscle of portal veins. *Blood Vessels*. 1989; 26 (1): 21-32.
6. Rothe CF, Maass-Moreno R. Hepatic venular resistance responses to norepinephrine, isoproterenol, adenosine, histamine, and ACh in rabbits. *Am J Physiol*. 1998; 274(3):H777-85.
7. Chuman H, Sugimoto T, Nao-I, Graefes N. Vasodilatory effect of L-arginine on isolated rabbit and human posterior ciliary arteries in vitro and increased optic disc blood flow in vivo. *Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2017; 255(12):2381-8.
8. Tsybenko VO, Komarenko VI, Yanchuk PI. Nitric oxide participation in vasomotor reactions the hepatic portal system. *Fisiol Zh*. 1998; 44(3): 125-6. [Ukrainian].
9. Sudar-Milovanovic E, Obradovic M, Jovanovic A, Zaric B, Zafirovic S, Panic A, et al. Benefits of L-arginine on cardiovascular system. *Mini Rev Med Chem*. 2016; 16(2):94-103.
10. Biletskyi SV. Nitric oxide role in pathogenesis and treatment of cardio-vascular diseases. *Bukov Med Herald*. 2021; 25 (2):130-4.
11. Yanchuk PI, Pasichnichenko OM, Komarenko VI, Prichodko TP, Tsybenko VO. Elucidating of the mechanisms of acetylcholine constrictor action on the portal vessels. *Fisiol Zh*. 2006; 52(5): 28-33. [Ukrainian].
12. Zanten V. The endothelium and its role in regulating vascular tone / a sandoo. *Open Cardiovasc Med J*. 2010; 4: 302-12.
13. Katunich ZS, Vangutte PM. Superoxide anion is an endothelium-derived contracting factor. *Am J Physiol*. 1989; 257: H33-7.

*Матеріал надійшов
до редакції 12.03.2025*