

Włodzimierz Buczko, Barbara Malinowska,  
Ewa Chabielska, Dariusz Pawlak, Michał Pietraszak

## UDZIAŁ MECHANIZMÓW SEROTONINERGICZNYCH W DZIAŁANIU ALKOHOLU ETYLOWEGO NA UKŁAD KRAŻENIA U SZCZURÓW.

### Wstęp

Liczne dane literaturowe opisują wpływ alkoholu etylowego na układ krążenia. Doniesienia te są jednak niejednorodne, wskazują bowiem, że związek ten może zarówno stymulować, jak też hamować czynność serca, kurczyć lub rozkurczać mięśniówkę naczyń krwionośnych (15, 22, 24, 27, 28). Do chwili obecnej nieznany jest również mechanizm działania odpowiedzialny za powyższe efekty. Przypuszcza się, że dominującą rolę odgrywają w nim aminy katecholowe (2, 8). Vanhoutte (30, 31) sugeruje, iż istotnym czynnikiem biorącym udział w regulacji krążenia, a także w patomechanizmie nadciśnienia tętniczego jest serotonina. Lingjaerde (18) wykazał, że alkohol etylowy zaburza procesy transportu i magazynowania serotoniny w płytkach krwi.

Biorąc powyższe pod uwagę celem pracy była ocena udziału mechanizmów serotoninowych w działaniu alkoholu etylowego na układ krążenia.

### Materiał i metody.

Doświadczenia przeprowadzono na szczurach samcach rasy Wistar. Zwierzęta otrzymywały alkohol etylowy doustnie sondą dożołądkową w dawce 2 g/kg 30 min. przed eksperymentem (doświadczenia ostre) lub codziennie w dawce 6 g/kg przez 2 tygodnie (doświadczenia chroniczne).

Zastosowano następujące metody:

- ocena stężenia alkoholu etylowego we krwi wg Curry i wsp. (7),
- ocena ciśnienia krwi oraz częstości akcji serca u szczurów uśpionych, czuwających i odrdzienionych (20),
- ocena skurczu izolowanej tętnicy ogonowej wg Nicholasa (23),
- agregacja płytek krwi wg Borna i Crossa (5),
- poziom serotoniny w płytkach krwi (10),
- wychwyt i uwalnianie znakowanej serotoniny (12, 18).

Wyniki poddano analizie statystycznej wg testu t-Studenta.

## Wyniki

Wykazano, iż alkohol etylowy podany dożołądkowo w dawce 2 g/kg przenikał szybko do krwi osiągając maksymalne stężenie  $2.05 \pm 0.27$  mg/ml (50 mM) w 30 minucie od chwili jego podania. Następnie jego stężenie ulegało powolnemu obniżeniu i w 120 min. wyniosło  $0.73 \pm 0.08$  mg/kg. (Tab 1).

Tabela 1

Kinetyka etanolu we krwi podanego dożołądkowo w dawce 2g/kg

czas (min)	n = 5	stężenie etanolu (mg/ml)
0		$0.06 \pm 0.01$
15		$1.86 \pm 0.20$
30		$2.05 \pm 0.27$
45		$1.83 \pm 0.19$
60		$1.10 \pm 0.12$
90		$0.96 \pm 0.12$
120		$0.73 \pm 0.08$

Biorąc powyższe pod uwagę w doświadczeniach ostrych działanie alkoholu etylowego na układ krążenia i udział w nim mechanizmów serotoninowych oceniano w przedziale czasowym 30-60 min. tj. w okresie największego stężenia tego związku we krwi. Już wstępne wyniki badań wykazały, iż działanie etanolu na układ krążenia szczura w dużej mierze zależy od rodzaju eksperymentu i tak

u zwierząt nie uśpionych etanol wywoływał obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Spadek ten w 30 min. od chwili podania etanolu wynosił  $10.0 \pm 6.7$  mmHg (Tab 2).

**Tabela 2**

Wpływ etanolu, 2g/kg p.o., na ciśnienie krwi

	Bezwzględna wartość RR	0 min.	30 min.
$\Delta$ RR szczur czuwający n=8			
kontrola	$124.2 \pm 4.2$	0	$4.4 \pm 7.0$
etanol	$110.1 \pm 11.3$		$-10.0 \pm 6.7^{**}$
$\Delta$ RR szczur uśpiony n=10			
kontrola	$105.3 \pm 18.0$	0	$2.6 \pm 6.1$
etanol	$101.3 \pm 11.4$		$-15.0 \pm 4.5^{**}$
$\Delta$ RR szczur odrdzieniony n=8			
kontrola	$52.5 \pm 5.7$	0	$-0.2 \pm 1.9$
etanol	$46.6 \pm 3.4$		$-4.6 \pm 5.1$

Zmiany istotne statystycznie w porównaniu z kontrolą  $^{**}p < 0.01$

Znacznie silniejszy efekt hipotensyjny wykazano w doświadczeniach przeprowadzonych na zwierzętach uśpionych Vetbutalem, gdzie w 30 min. odserwowano obniżenie ciśnienia tętniczego krwi o  $15.0 \pm 4.5$  mmHg. U szczurów odrdzienionych, a więc pozbawionych regulacji ze strony ośrodkowego układu nerwowego, obniżenie ciśnienia tętniczego krwi po obciążeniu etanolem było niewielkie i w 30 min. wyniosło  $4.6 \pm 5.1$  mmHg (Tab 2). W grupie szczurów uśpionych zarejestrowano wzrost czynności akcji serca (w 30 min.) o  $37.4 \pm 22.2$  uderzeń/min. (Tab 3). Natomiast całkowicie odmienną odpowiedź uzyskano ze strony mięśnia sercowego zwierząt odrdzienionych. Szczury odrdzienione reagowały zmniejszeniem ilości uderzeń mięśnia sercowego ( $-10.7 \pm 22.8$  uderzeń/min. w 30 min.).

Tabela 3

Wpływ etanolu, 2g/kg p.o., na czynność serca (HR)

	Bezwzględna wartość HR	0 min.	30 min.
$\Delta$ HR (uderzeń/min)		szczury	uśpione n = 10
kontrola	390.0 $\pm$ 38.7	0	5.9 $\pm$ 18.2
etanol	387.0 $\pm$ 33.6	0	37.4 $\pm$ 22.2**
		szczury	odrdzenione n = 8
kontrola	331.7 $\pm$ 16.7	0	-11.7 $\pm$ 18.9
etanol	320.3 $\pm$ 15.5	0	-10.7 $\pm$ 22.8" "

Zmiany istotne statystycznie w porównaniu z grupą kontrolną

\*\* p &lt; 0.01

Zmiany istotne statystycznie pomiędzy grupą szczurów uśpionych i odrdzienionych " " p 0.01

Można zatem przypuszczać, że w mechanizmie działania alkoholu etylowego na układ krążenia szczura istotną rolę odgrywa ośrodkowy układ nerwowy. W dalszych badaniach wykazano, że etanol wywołuje skurcz izolowanej aorty i tętnicy ogonowej szczura. Związek ten w stężeniach 0.03; 0.1; 0.3; 1.0; 3.0 i 10 M/l powodował zależny od dawki wzrost napięcia tych fragmentów naczyń. Należy jednak podkreślić, że wrażliwość aorty na działanie alkoholu była mniejsza niż tętnicy ogonowej oraz to, że stężenia wywołujące skurcz praktycznie nigdy nie występują w ustroju żywym. Dalsze badania wykazały, że w doświadczeniach ostrych alkohol etylowy osłabiał kurczące działanie serotoniny zarówno w doświadczeniach in vivo (zwierzęta odrdzienione), jak też w eksperymentach in vitro (izolowane tętnice szczurów). Wyniki badań wykonanych na krwinkach płytkowych wskazują, że alkohol etylowy w dawce 2 g/kg zmniejszał zawartość serotoniny w tych komórkach z  $0.9 \pm 0.2$  do  $0.5 \pm 0.1$  ug/10<sup>9</sup> płytek. Ponadto stwierdzono, iż związek ten modyfikował procesy transportu serotoniny przez błony komórkowe. Hamował

bowiem wychwyty znakowanej 5HT o około 19 %. W badaniach in vitro wykazano także, iż etanol w sposób zależny od stężenia zwiększał uwalnianie zmagazynowanej serotoniny z płytek krwi oraz hamował jej wychwyty (Tab 4).

Tabela 4

Wpływ etanolu na wychwyty i uwalniania znakowanej 5HT w płytkach krwi

stężenia etanolu (mM)	wychwyty pM/10 <sup>9</sup> /min.	uwalnianie %
0	144.9 ± 23.1	2.0 ± 0.5
50	105.9 ± 11.5**	10.8 ± 3.2**
100	92.8 ± 8.3**	13.3 ± 4.5***
150	81.2 ± 9.5**	17.5 ± 5.2***
200	72.5 ± 11.2**	27.3 ± 8.5***
250	66.7 ± 10.4**	34.0 ± 9.1***
300	58.1 ± 6.7***	39.9 ± 9.7***

Istotność statystyczna w porównaniu z wartością kontroli\*\*p < 0.01.  
\*\*\*p < 0.001

$$\% \text{ uwalniania} = \frac{\text{cpm kontroli po 30 min.} - \text{cpm z etanolem}}{\text{cpm w czasie 0}} \cdot 100\%$$

W badaniach nad wpływem etanolu na agregację płytek krwi stosowano go także w dawkach 0.5 i 4 g/kg. Stwierdzono, że agregacja płytek indukowana podaniem ADP była hamowana przez wszystkie stężenia etanolu. Natomiast związek ten zmieniał potęgujące działanie serotoniny z wyjątkiem dawki 2 g/kg (Tab 5). Ponadto wykazano, że ketanseryna i ritanseryna - antagoniści receptorów 5HT<sub>2</sub> całkowicie znoszą potęgujące działanie serotoniny zarówno w obecności jak też i bez etanolu.

#### Omówienie wyników

Uzyskane wyniki wskazują, że alkohol etylowy wpływa na układ krążenia. Stwierdzono bowiem, iż zarówno u zwierząt uśpionych jak

Tabela 5

Wpływ etanolu na agregację płytek krwi i potęgujące działanie serotoniny

dawka etanolu g/kg	agregacja płytek, (cm)				n = 12
	ADP (4uM)	ADP + 5HT (10 <sup>-6</sup> M)	ADP + 5HT + ketanseryna (10 <sup>-5</sup> M)	ADP + 5HT + ritanseryna (10 <sup>-5</sup> M)	
0	7.5 ± 2.3	9.9 ± 2.7	7.6 ± 1.9	10.1 ± 2.3	
0.5	6.6 ± 1.9	9.9 ± 2.8 <sup>***</sup>	6.7 ± 2.0	6.6 ± 1.9	
1.0	3.9 ± 1.9 <sup>***</sup>	8.2 ± 2.6 <sup>****</sup>	3.8 ± 2.1	3.8 ± 1.7	
2.0	3.5 ± 1.8 <sup>***</sup>	4.6 ± 1.7	3.6 ± 1.7	3.4 ± 1.5	
4.0	3.0 ± 1.1 <sup>***</sup>	10.7 ± 3.0 <sup>****</sup>	3.1 ± 1.3	2.9 ± 1.4	

Istotność statystyczna w porównaniu z kontrolą przy <sup>\*\*\*</sup>p < 0.001 i pomiędzy wpływem potęgującym serotoniny w kontroli i w poszczególnych grupach doświadczalnych przy <sup>\*\*\*</sup> p < 0.01, <sup>\*\*\*\*</sup>p < 0.001

również czuwających etanol podany jednorazowo w dawce 2 g/kg powodował obniżenie ciśnienia tętniczego krwi. Jednocześnie wykazano, iż etanol podany zwierzętom uśpionym stymuluje mięsień sercowy, czego wyrazem jest przyśpieszenie akcji serca. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy (1.14), należy jednak podkreślić, że stosowali oni o połowę mniejszą dawkę tego związku. Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian ciśnienia krwi i spadku częstości skurczów serca u szczurów odrdzienionych poddanych działaniu etanolu. Należałoby zatem przypuszczać, iż w obserwowanym spadku ciśnienia w początkowej fazie zatrucia tym związkiem istotną rolę odgrywa ośrodkowy układ nerwowy. Poddając naczynia izolowane działaniu etanolu stwierdzono, iż związek ten powodował zależny od dawki wzrost napięcia mięśniówki izolowanej aorty i tętnicy ogonowej szczura. Należy zaznaczyć, że stężenia alkoholu wywołujące skurcz nigdy nie występują w organizmie. Uzyskane wyniki dotyczące kurczącego wpływu etanolu na izolowaną tętnicę ogonową i aortę szczura potwierdzają dane zamieszczone w innych pracach (3, 8, 16, 29). Występujące różnice dotyczą jedynie wrażliwo-

ści poszczególnych naczyń pochodzących od tego samego lub różnych gatunków zwierząt.

Wyniki dotychczasowych badań zwracają uwagę na istotną rolę mechanizmów serotonergiczných w regulacji układu krążenia (13, 32). Amina ta może bowiem bezpośrednio wywierać swoje działanie na naczynia, bądź też w sposób pośredni modyfikować działanie innych substancji naczyniokurczących (33). Do oceny wpływu etanolu na presyjną odpowiedź 5HT konieczne było zastosowanie modelu szczura odrodzonego, w którym amina ta, proporcjonalnie do zastosowanej dawki, wywiera efekt presyjny (6). Stwierdzono, że 5HT zwiększa w sposób zależny od dawki ciśnienie krwi u szczurów odrdzienionych. Wykazano także, że jednorazowo podany etanol obniża presyjną odpowiedź po 5HT, natomiast u zwierząt chronicznie zatrutowanych nie zaobserwowano powyższego efektu. Ponadto stwierdzono, że mniejsze stężenia alkoholu, które same nie zmieniały ciśnienia perfuzyjnego w izolowanych naczyniach, potęgowały kurczące działanie 5HT, natomiast większe wpływały hamująco. Toda i wsp. (29) donoszą, iż etanol w stężeniach 0.1-0.3 M potęgował indukowaną 5HT odpowiedź skurczową izolowanej tętnicy krezkowej psa i szczura. Z kolei Altura i Altura (2) stosując wyższe stężenia etanolu stwierdzili osłabienie kurczącego działania 5HT na ludzką tętnicę pępowinową, a Dalske (8) doniósł o braku wpływu etanolu (50 mM) na wywołany skurcz bydłeczych naczyń mózgowych. Powyższym efektom odpowiadają uzyskane przez nas wyniki, dotyczące wpływu różnych stężeń etanolu na indukowany serotoniną skurcz izolowanej tętnicy ogonowej i aorty szczura.

Prostym i czułym modelem do oceny obwodowych mechanizmów serotonergiczných jest płytka krwi (25). W wykonanych na tym modelu badaniach stwierdzono, że etanol modyfikuje procesy transportu serotoniny przez błony komórkowe. Wywołuje on bowiem obniżenie poziomu tej aminy w krwinkach płytkowych. Podobnie jak Kent (17) wykazano także, że hamuje on wychwyt serotoniny przez płytki. Stwierdzono również, że alkohol jest induktorem uwalniania jej przez trombocyty a efekt tego działania jest zależny od dawki. Wydaje się zatem, że spadek zawartości 5HT w płytkach pod wpływem etanolu jest wypadkową obserwowanych zmian. Obok wpływu etanolu na procesy transportu 5HT jak wykazują dane literaturowe zmienia on również proces agregacji ludzkich i zwierzę-

cych płytek krwi (4, 11, 19, 21, 26). W doświadczeniach *ex vivo* wykazano, że etanol posiadał zdolność hamowania agregacji płytek krwi szczura indukowanej ADP. Należy zaznaczyć, że efekt zahamowania agregacji oraz wielkość tego zjawiska zależy od takich czynników jak stężenie alkoholu, substancja agregująca, czas ekspozycji płytek na etanol oraz różnic gatunkowych. Serotonina posiada zdolność agregacji ludzkich płytek krwi oraz potęgowania agregacji zwierzęcych trombocytów (9). Jak wykazano w powyższych badaniach etanol nasilał potęgujące agregację działanie 5HT. Wzmocnienie agregacji płytek blokują ketanseryna i ritanseryna sugerując tym samym, że działanie etanolu może być związane również z aktywacją znajdującego się w błonie płytkowej specyficznego dla serotoniny receptora 5HT<sub>2</sub>.

Z doświadczeń tych wynika, że alkohol etylowy hamuje kurczące działanie serotoniny oraz mechanizmy transportowe płytek krwi szczura. Działanie to obserwuje się jednak w stężeniach bardzo dużych. Z drugiej jednak strony etanol może nasilać potęgujące działanie serotoniny na płytki krwi. Reasumując należy podkreślić, że działanie alkoholu etylowego na układ krążenia jest złożone. W efektach tego związku oprócz niewątpliwego udziału układu wegetatywnego oraz ośrodkowego układu nerwowego istotną rolę spełnia serotoninowy układ obwodowy.

### Summary

Wistar male rats were treated chronically and acutely with ethanol (2 g/kg per day). The results revealed potentiating action of ethanol on serotonin (5-HT) - induced platelet aggregation and vasoconstriction. On the other hand ethanol attenuated platelet aggregation induced by ADP. The data indicates the complex mechanism of ethanol action upon blood and vascular system.

### Bibliografia

-1. Abdel-Rahman A. R. A., Russ R., Stricland J. A.: *Acute effects of ethanol on baroreceptor reflex control of heart rate and pressor and depressor*



- responsiveness in rat.* Can. J. Physiol. Pharmacol. 1987, 65, 834-840;
- 2. Altura B. M., Altura B. T.: *Pheripheral vascular actions of ethanol and its interaction with neurohumoral substances.* Neurobehav. Toxicol. Teratol., 1983, 5, 211-220; -3. Altura B. M., Edgarian H., Altura B. T.: *Differential effects of ethanol and mannitol on contraction of arterial smooth muscle.* J. Pharmacol. Exp. Ther., 1987, 197, 352-361. -4. Bengmark S., Elmer O., Garansson G.: *In vitro effects of ethanol on ADP and collagen-induce platelet aggregation.* Thromb. Haemost., 1984, 46, 673-675; -5. Born B. V. R., Cross M. J.: *The aggregation of blood platelets.* J. Physiol. 1983, 168, 178-195; -6. Cavero J., Latevre-Borg F., Roach A. G.: *Effects of mianserin, desipramine and maprotiline on blood pressure responses evoked by acetylcholine, histamine and 5-hydroxytryptamine in rats.* Br. J. Pharmacol. 1981, 74, 143-148; -7. Curry A. S., Walker G. W., Simpson G. S.: *Determination of ethanol in blood by gas chromatography.* Analyst, 1986, 91, 742-745; -8. Dalske H. F.: *Effects of ethanol and its interaction with vasoactive agents in bovine vascular smooth muscle.* Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1975, 218, 54-65; -9. De Clerck F., Herman A. G.: *5-hydroxytryptamine and platelet aggregation.* Fed. Proc., 1983, 42, 228-230; -10. Drummond A. H., Gordon J. L.: *Rapid sensitive microassay for platelet 5HT.* Thromb. Diathes. Haemorrh., 1974, 31, 366-367.
- 11. Fenn G. C., Littleton J. M.: *The human blood platelet as a method for studying interactions of ethanol with membrane lipids.* Alcoholism, 1983, 7, 59-64; -12. Gordon J. L., Olverman H. J.: *5-hydroxytryptamine and dopamine transport by rat and human blood platelets.* Br. J. Pharmacol., 1978, 62, 219-226; -13. Gothert M.: *Serotonin receptors in the circulatory system.* Prog. Pharmacol., 1986, 155-172; -14. Hellstrom E., Totmar O.: *Acute effects of ethanol and acetaldehyde on blood pressure and heart rate in disulfiram-treated and control rats.* Pharmacol. Biochem. Behav., 1982, 17, 1103-1110; -15. Howe P. R. C., Rogers P. F., Smith R. M.: *Retarded development of hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats following chronic alcohol consumption.* Clin. Exp. Pharmacol. 1985, 12, 273-277; -16. Karanian J. W., salem N.: *Effect of acute and chronic ethanol exposure on the response of rat aorta to a thromboxane mimic, U 46 619.* Alcohol. Clin. Exp. Res. 1986, 10, 171-176; -17. Kent T. A., Campbell J. L., Pazdernik T. L., Hunter R., Gunn W. H., Goodwin D.: *Blood platelet uptake of serotonin in men alcoholics.* J. Stud. Alcohol. 1985, 357-359; -18. Lindjaerde O.: *Inhibitory effects of ethanol on 5-hydroxytryptamine (serotonin) uptake in human blood platelets in vitro.* Acta Pharmacol. toxicol. 1979, 45, 394-398; -19. Littleton J. M., Fenn G. G., Umney N. D., Yazdanbockhsh M.: *Effect of ethanol administration on platelet function in the rat.* Alcoholism 1982, 6, 512-519; -20. Malinowska B., Pawlak D., Buczko W.: *Cardiovascular effects of ethanol in anaesthetized, conscious and pithed rats.* Drug Alcohol Depend. 1989, 24, 51-56;
- 21. Mikhailidis D. P., Jeremy J. Y., Barradas M. A.: *Effect of ethanol on vascular prostacyclin (prostaglandin I ) synthesis, platelet aggregation and*

platelet thromboxane release. *Br. Med. J.* 1983, 287, 1495-1498; -22. Nakano J., Kessinger J.: *Cardiovascular effects of ethanol, its congeners and synthetic bourbon in dogs.* *Eur. J. Pharmacol.* 1972, 17, 195-201; -23. Nicholas T. E.: *A perfused tail artery preparation from the rat.* *J. Pharm. Pharmacol.* 1969, 21, 826-832; -24. Penna M., Brugere S., Canas M., Saavedra A.: *Cardiorespiratory reflex effects induced by intravenous administration of ethanol in rats.* *Alcohol* 1985, 2, 603-609; -25. Pletscher A.: *Platelets as models for monoaminergic neurons.* In *M. B. H. Youdim (Ed.) Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology*, Vol 3, Wiley London, 1978, 49-101; -26. Renaud S., Mc. Gregor L., Martin J. L.: *Influence of alcohol on platelet functions in relation to atherosclerosis.* In: *Diet, Diabetes and Atherosclerosis* (Ed. G. Poza) Raven Press. 1984, 177-187; -27. Sparrow M. G., Roggendorf H., Vogel W. H.: *Effect of ethanol on heart rate and blood pressure in nonstressed and stressed rats.* *Life Sci.* 1987, 40, 2551-2559; -28. Stokes G. S.: *Hypertension and alcohol: Is there a link?* *J. Chron. Dis.* 1982, 35, 759-763; -29. Toda N., Konishi M., Miyazaki M., Komura S.: *The effects of ethanol and acetylaldehyde on dog arterial smooth muscle.* *J. Stud. Alcohol* 1983, 44, 1-16; -30. Vanhoutte P. M.: *Does 5-hydroxytryptamine play a role in hypertension?* *Trends. Pharmacol. Sci.* 1982, 3, 370-379.

-31. Vanhoutte P. M.: *5-hydroxytryptamine, vasospasm and hypertension. 5-hydroxytryptamine in Pheripheral Reactions.* Raven Press, New York, 1983, 68-75; -32. Van Nueten J. M., Janssens J., Vanhoutte P. M.: *Serotonin and vascular reactivity.* *Pharmacol. Res. Commun.* 1985, 17, 585-608; -33. Van Nueten J. M., Janssens W. J., Vanhoutte P. M.: *Serotonin and vascular smooth muscle. Serotonin and the Cardiovascular System,* Raven Press, New York, 1985, 95-100.