



УДК 612.35:616.36

© 2012

Н. С. Весельська, П. І. Янчук, В. А. Барановський,
М. Ю. Макарчук

Особливості жовчоутворення при зміні функціонального стану ендотелінових рецепторів

(Представлено членом-кореспондентом НАН України С. О. Костеріним)

За умов гострого дослідження на щурах вивчено вплив ендотеліну-1 та ВQ-123 на зовнішньо-секреторну функцію печінки та співвідношення вільних і кон'югованих жовчних кислот у жовчі. Виявлено гальмівну дію апробованих доз препаратів на холерез і різнонаправлений вплив на біосинтез окремих жовчних кислот. Показано, що ендотелін-1 підсилює біосинтез тригідроксихоланових кислот, а ВQ-123 сприяє зростанню рівня як вільних, так і кон'югованих дигідроксихоланових кислот у жовчі.

Ендотелінові рецептори за своєю хімічною будовою є глікопротеїдами. Гідрофобна білкова частина молекули рецептора перетинає біліпідний шар мембрани клітини 7 разів, відповідно, у внутрішньоклітинному та позаклітинному просторі залишаються петлі пептидних ділянок, які утворені переважно гідрофільними амінокислотами. Саме такі позаклітинні ланки пептидних ланцюгів разом із вуглеводневою складовою формують сайти для зв'язування з певними регуляторними чинниками, зокрема з ендотеліном. Взаємодія останнього з відповідним сайтом рецептора викликає характерні конформаційні зміни самого рецептора та ініціює за участю G-білків зрушення рівня внутрішньоклітинних посередників. Саме через них реалізуються метаболічні перебудови на дію даного регуляторного сигналу [1–3].

Ендотелінові рецептори підтипу А (ET_A) виявлені не лише на клітинах ендотелію судин печінки, але й безпосередньо на гепатоцитах та міоцитах жовчного міхура [4, 5]. Локалізація даних рецепторів вказує на широкі можливості різнопланового впливу при їх активації на перебіг фізіолого-біохімічних процесів у печінці, в тому числі і тісно пов'язаних з жовчоутворенням. Зокрема, поодинокі дані літератури свідчать про те, що взаємодія агоністів та антагоністів з ендотеліновими рецепторами викликає неоднозначні холеретичні реакції печінки. При цьому одні дослідники реєструють стимуляцію, а інші — пригнічення жовчоутворення за дії одних і тих же чинників [6, 7]. Загалом, результати таких досліджень поки що не дозволяють скласти певного уявлення щодо участі ендотелінових рецепторів у складному нейрогуморальному механізмі регуляції жовчоутворення та формуванні якісного складу жовчі.

З метою з'ясування ролі ендотелінових рецепторів у регуляції секреції жовчі нами було досліджено вплив ендотеліну-1 та блокатора ЕТ_A-рецепторів ВQ-123 на інтенсивність холерезу і органічний склад жовчі у щурів.

Дослідження проведені за умов гострого досліду на 35 білих лабораторних щурах масою 180–250 г під уретановим наркозом (1 г/кг). У тварин здійснювали лапаротомію та канюлювали жовчну протоку для реєстрації холесекреції. Ендотелін-1 (1 мкг/кг) і ВQ-123 (60 мкг/кг) вводили внутрішньопортально. Контролем були тварини, яким аналогічним чином вводили фізіологічний розчин.

Інтенсивність секреції жовчі у щурів визначали кожні 10 хв протягом 3 год. Об'ємну швидкість секреції жовчі розраховували в мкл/г маси тіла тварин (та маси печінки). За час проведення експерименту збирали шість півгодинних проб жовчі, в кожній з яких за допомогою тонкошарової хроматографії [8] визначали концентрацію вільних та кон'югованих жовчних кислот (на пластинах Silufol). Вміст окремих жовчних кислот визначали безпосередньо на хроматограмах, використовуючи денситометр ДО-1 м. Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою аналітичного пакета Statistica, використовуючи *t*-критерій Стьюдента, оскільки дані мали нормальний розподіл при перевірці їх за тестом Шапіро–Уїлка. Статистично вірогідними вважалися відмінності між контролем і дослідом при $p < 0,05$.

Проведені контрольні досліди з введенням фізіологічного розчину показали, що після півгодинної стабілізації холерезу об'ємна швидкість секреції жовчі в ході експерименту поступово зменшувалася. Так, середня величина об'ємної швидкості секреції жовчі першого 10-хвилинного проміжку становила $(0,298 \pm 0,09)$ мкл/г маси тіла, а кінцевої проби — $(0,258 \pm 0,11)$ мкл/г. Це свідчить про зниження об'ємної швидкості холесекреції у контрольних тварин на 13,4% за 3 год досліду.

Більш виразно особливості впливу досліджуваних препаратів на холерез виявляються при порівняльному аналізі даних з використанням відносних величин, за яких вихідним рівнем є середня величина перших трьох 10-хвилинних проміжків, яка приймається за 100%.

Результати дослідження показали, що жовчосекреторна функція печінки щурів досить чутлива до дії як агоністів, так і антагоністів ендотелінових рецепторів. Зокрема, при одnorазовому внутрішньопортальному введенні ендотеліну-1 в дозі 0,1 мкг/100 г, яка викликає помітні судинорухові реакції у печінці [9], спостерігалось гальмування холерезу. Максимальне зниження холерезу на 15,6% ($p < 0,05$) порівняно з контролем реєстрували на 40–50-й хвилині після введення препарату. В подальшому відбувалося поступове відновлення жовчоутворення і через 2 год експерименту його рівень сягав контрольних величин, але був нижчим за вихідний рівень на 8,6%, тоді як у контрольних дослідах холесекреція знизилася на 10,8% (рис. 1).

Хроматографічний аналіз півгодинних проб жовчі засвідчив, що ЕТ-1 неоднаково впливав на вміст окремих жовчних кислот протягом усього досліду. Так, незважаючи на те, що концентрація таурохолевої кислоти (ТХК) протягом 3-годинного досліду поступово знижувалась як у жовчі контрольних тварин, так і тих, яким вводили ЕТ-1, наприкінці експерименту її рівень у останніх був на 9,3% ($p < 0,05$) вищим і становив $(154,7 \pm 2,8)$ мкг · %, а в контрольній жовчі — $(141,5 \pm 2,3)$ мкг · %. Загальний рівень суми таурохенодезоксихолевої та тауродезоксихолевої (ТХДХК + ТДХК) кислот у більшості проб жовчі тварин, які отримували ЕТ-1, був дещо вищим, ніж у контрольних щурів.

Найістотніше при введенні ЕТ-1 змінювався вміст глікохолевої кислоти (ГХК). Так, якщо у жовчі контрольних тварин її концентрація протягом досліду поступово зменшувалась

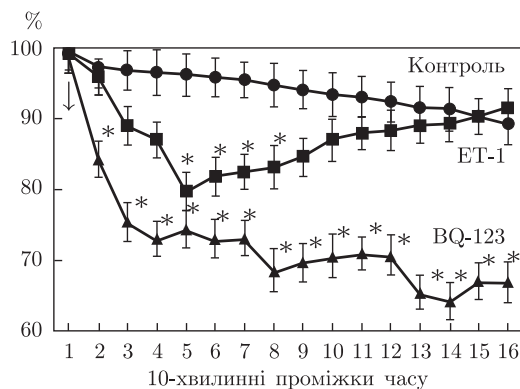


Рис. 1. Відносні зміни холерезу у щурів при дії ендотеліну-1 (0,1 мкг/100 г) та BQ-123 (6 мкг/100 г) ($M \pm m$). * — $p < 0,05$ щодо контролю (вірогідність змін розрахована за абсолютними значеннями показника); ↓ — момент введення препарату

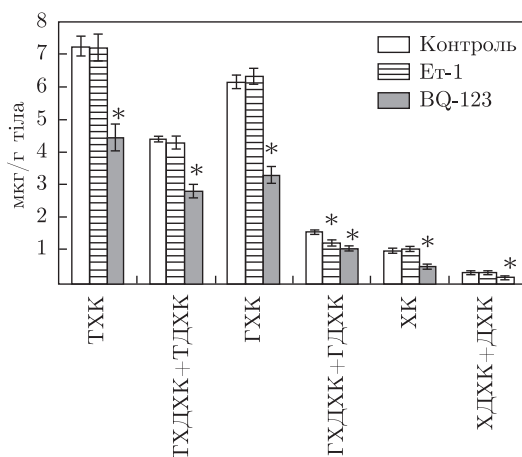


Рис. 2. Дебіт жовчних кислот у контрольних дослідках та при введенні ендотеліну-1 (0,1 мкг/100 г) і BQ-123 (6 мкг/100 г) ($M \pm m$). * — $p < 0,05$ щодо контролю

лася, то при застосуванні ET-1 вона вірогідно перевищувала контрольні значення в другій половині дослідку. Зокрема, концентрація її підвищилась у 4-й пробі на 12,3% ($p < 0,01$), у 5-й на 19,7% ($p < 0,01$) і у 6-й на 16,3% ($p < 0,01$). При цьому спостерігалась лише тенденція до зниження рівня глікоцидгидроксихоланових кислот (ГХДХК + ГДХК) у жовчі піддослідних щурів.

Ендотелін-1 зумовлював хвилеподібні зміни в бік підвищення концентрації вільної жовчої кислоти (ХК) з максимумом змін у 3-й півгодинній пробі на 20,6% та у 6-й — на 19,8% порівняно з відповідними пробами жовчі в контролі. Концентрація вільних хенодезоксиколевої та дезоксиколевої кислот (ХДХК та ДХК) у жовчі піддослідних щурів була близькою до контрольних значень (рис. 2).

Непередбачувані зміни в процесі жовчоутворення виявились за умов блокування ендотелінових рецепторів підтипу А антагоністом BQ-123, який виключає дію як ендогенних, так і екзогенних ендотелінів через даний підтип рецепторів. Така зміна стану ET_A-рецепторів призвела до більш істотного та пролонгованого в часі гальмування холерезу в піддослідних

тварин. Так, вже за перший 10-хвилинний проміжок після внутрішньопортального введення ВQ-123 (6 мкг/100 г) секреція жовчі знизилась на 15,7% ($p < 0,05$). В наступних двох 10-хвилинних проміжках спостерігалось подальше гальмування холерезу і на 30-й хвилині після введення препарату реєструвалось його зменшення на 26,9% ($p < 0,05$) порівняно з вихідним рівнем та на 24,2% ($p < 0,05$) відносно контрольних величин. Максимальне уповільнення холерезу відносно вихідного рівня було зареєстроване на 140-й хвилині після введення ВQ-123 і становило 35,6% ($p < 0,05$) (рис. 1).

Хроматографічний аналіз виявив значні зміни якісного складу і кількісного вмісту жовчних кислот у пробах жовчі, отриманих при введенні даного препарату. Зокрема, найбільш істотно підвищувалася концентрація глікодигідроксихоланових кислот (ГХДХК + ГДХК) у жовчі 5-ї та 6-ї півгодинних проб, у яких вона перевищувала контрольні значення на 56% ($p < 0,05$) і 60,6% ($p < 0,05$) відповідно. Водночас концентрація ГКХ майже не змінювалася порівняно з контролем. Рівень таурокон'югатів жовчних кислот характеризувався певними фазовими коливаннями протягом експерименту, але вірогідним було лише їх зростання. Так, концентрація ТХК зростала у 5-й та 6-й півгодинних пробах на 17,5 та 25,3% ($p < 0,05$). А рівень ТХДХК + ТДХК у ці ж часові проміжки підвищувався на 26,9% ($p < 0,05$) та 35,5% ($p < 0,05$) відносно відповідних контрольних значень. Разом з тим спостерігалася обернена залежність між рівнем таурокон'югатів і вмістом вільних жовчних кислот.

Важливим моментом для з'ясування особливостей жовчоутворення є оцінка ефективності роботи певних поліферментних систем у тканині печінки, які забезпечують гідроксилювання та кон'югацію жовчних кислот з відповідними амінокислотами, що в результаті змінює властивості колоїдної системи жовчі. Розрахунки та аналіз відмінностей коефіцієнтів гідроксилювання, кон'югації та дебіту окремих жовчних кислот за умов зміни стану ендотелінових рецепторів, викликаного ендотеліном-1 та ВQ-123, вказують на значні зрушення в процесах жовчоутворення у піддослідних тварин. Ендотелін-1 викликав підсилення біосинтезу як вільних, так і кон'югованих з гліцином тригідроксихоланових кислот, синтез яких тісно пов'язаний з активністю ферментів мікросомального окислення, так званим нейтральним шляхом, яке залежить від забезпечення тканини киснем [10, 11]. Останнє деякою мірою узгоджується з раніше встановленим фактом зниження споживання кисню тканиною печінки при введенні даної дози ендотеліну-1 [9, 12].

При дії ВQ-123 коефіцієнт гідроксилювання жовчних кислот знизився протягом досліду від 2,21 до 1,95, тоді як у контролі він підвищився від 2,2 до 2,5, що свідчить про більшу вираженість біосинтезу дигідроксихоланових кислот і знаходить своє відображення у встановленому вірогідному зростанні концентрації їх кон'югатів як з гліцином, так і з таурином. Відомо, що біосинтез первинної хенодезоксихолевої кислоти в печінці відбувається за активної участі мітохондріальних ферментів, що певною мірою підтверджується і виявленим нами значним зростанням її кон'югатів у жовчі піддослідних тварин. Отже, блокування ЕТ_A рецепторів даним препаратом вказує на важливу роль ендогенного ендотеліну-1 в нейрогуморальній регуляції процесів жовчоутворення в печінці.

Вивчення ефективності біосинтезу окремих жовчних кислот у печінці піддослідних щурів, опираючись на розрахунки дебіту даних метаболітів як в окремі півгодинні проміжки, так і, особливо, за весь період досліду, переконливо свідчить про різницю в цих характеристиках, виявлену за дії ендотеліну-1 та ВQ-123 (див. рис. 2). Так, наприклад, якщо застосована нами доза ендотеліну-1 сприяла вірогідному підвищенню продуктивних можливостей печінки щодо біосинтезу ГКХ і в сумі за дослід по більшості жовчних кислот показники були вищими, ніж у контролі, то застосування блокатора ендотелінових рецепторів ВQ-123

зумовило істотне зниження дебіту більшості жовчних кислот порівняно з контрольними величинами.

Не виключено, що виявлене нами істотне і тривале гальмування холерезу у щурів при дії ВQ-123 зумовлюється частковим виключенням жовчних кислот з осмотично-дифузних процесів при формуванні жовчі внаслідок значного зниження їх синтезу гепатоцитами.

Таким чином, активація ендотелінових рецепторів екзогенним ендотеліном-1 спричиняє короткотермінове зниження холерезу з одночасним посиленням синтезу жовчних кислот “нейтральним шляхом” за участю ферментів мікросомального окислення, про що свідчать зміни співвідношення тригідроксихоланових до дигідроксихоланових кислот і зростання рівня глікохолевої кислоти. Блокада ЕТ_A рецепторів ВQ-123, що виключає можливість регуляторної дії ендогенних ендотелінів, викликає різке і довготривале зменшення жовчоутворення з одночасною зміною синтезу жовчних кислот переважно мітохондріальними ферментами “кислим шляхом”, на що вказує зростання у жовчі як вільних, так і кон’югованих дигідроксихоланових кислот та зниження дебіту жовчних кислот.

1. Hope S. I., na Schmitta J., Rossi A. H. et al. Regulation of the neuronal norepinephrine transporter by endothelin – 1 and – 3 in the rat anterior and posterior hypothalamus // *Neurochem. Intern.* – 2008. – **53**. – P. 207–213.
2. Ballinger M. L., Ivey M. E., Osman N. et al. Endothelin-1 activates ETA receptors on human vascular smooth muscle cells to yield proteoglycans with increased binding to LDL // *Atherosclerosis.* – 2009. – **205**. – P. 451–457.
3. Shao R., Shi Z., Gotwals P. J. et al. Cell and molecular regulation of endothelin-1 production during hepatic wound healing // *Mol. Biol. Cell.* – 2003. – **14**, No 6. – P. 2327–2341.
4. Патарая С., Преображенский Д., Сидоренко Б., Масенко В. Биохимия и физиология семейства эндотелинов // *Кардиология.* – 2000. – № 6. – С. 78–85.
5. Huang S. C. Endothelin ET(A) but not ET(B) receptors mediate contraction of common bile duct // *Regul. Pept.* – 2003. – **15**. – P. 131–138.
6. Isales C. M., Nathanson M. H., Bruck R. Endothelin-1 induces cholestasis which is mediated by an increase in portal pressure // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – **191**, No 3. – P. 1244–1251.
7. Tanaka A., Katagiri K., Hoshino M. et al. Endothelin-1 stimulates bile acid secretion and vesicular transport in the isolated perfused rat liver // *Amer. J. Physiol.* – 1994. – **266**. – P. 324–329.
8. А. с. 4411066/14 СССР, МБИ G 01 № 33/50. Способ определения желчных кислот в биологической жидкости / С.П. Весельский, П.С. Лященко, И.А. Лукьяненко. – № 1624322; Заявл. 25.01.1988; Опубл. 30.01.1991, Бюл. № 4.
9. Янчук П. І., Комаренко В. І., Русінчук Я. І., Терехов А. Участь ендотеліну-1 у регуляції кровообігу, кисневого балансу та жовчосекреторної функції печінки // *Вісн. Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка: Проблеми регуляції фізіол. функцій.* – 2006. – Вип. 1. – С. 8–10.
10. Vlahcevic Z. R., Stravitz R. T., Heuman D. M. Regulation of sterol 27-hydroxylase (S27-H) and the acidic pathway of bile acid synthesis // *XIV Intern. Bile Acids Meeting. Bile Acids in Hepatobiliary Diseases – Basic Research and Clinical Application.* – Freiburg (Germany), 1996. – P. 11.
11. Hofmann A. F. Bile acids: The good, the bad, and the ugly // *News Physiol. Sci.* – 1999. – **14**. – P. 24–29.
12. Янчук П. І., Русінчук Я. І., Терехов А. А. Вплив ендотеліну-1 на кисневий баланс і теплотворення печінки // *Фізіол. журн.* – 2008. – **54**, № 6. – С. 38–41.

НДІ фізіології ім. академіка Петра Богача
ННЦ “Інститут біології” Київського
національного університету ім. Тараса Шевченка

Надійшло до редакції 18.04.2012

Н. С. Весельская, П. И. Янчук, В. А. Барановский, М. Ю. Макаrchук

Особенности желчеобразования при изменении функционального состояния эндотелиновых рецепторов

В условиях острого опыта на крысах изучено влияние эндотелина-1 и BQ-123 на внешне-секреторную функцию печени и соотношение свободных и конъюгированных желчных кислот в желчи. Обнаружено тормозное действие апробированных доз препаратов на холерез и разнонаправленное влияние на биосинтез отдельных желчных кислот. Показано, что эндотелин-1 усиливает биосинтез тригидроксихолановых кислот, а BQ-123 способствует возрастанию уровня как свободных, так и конъюгированных дигидроксихолановых кислот в желчи.

N. S. Veselska, P. I. Yanchuk, V. A. Baranovsky, M. Yu. Makarchuk

Some peculiarities of bile formation under changes of a functional of endothelin receptors

Influences of endothelin-1 and its antagonist BQ-123 on both choleresis and quantitative correlation of free and conjugated bile acids in bile have been studied in sharp experiments on rats. The inhibitory action of these preparations on choleresis at the doses tested and the differently directed influences on the biosynthesis of separate bile acids are revealed. Endothelin-1 intensifies the biosynthesis of trihydroxycholic acids, while BQ-123 promotes increasing the levels of both free and conjugated dihydroxycholic acids in bile.