

УДК 612.36+591.132.5

ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНОЙ И ЭКСКРЕТОРНОЙ ФУНКЦИЙ ПЕЧЕНИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ВАЗОПРЕССИНА

Янчук П.И., Весельский С.П., Парчами Газее С., Горенко З.А., Спивак Л.С.

В последние десятилетия знания о нейро-гуморальной регуляции физиологических функций организма существенно пополнились данными о роли нейропептидов в этом процессе. В зависимости от места их высвобождения нейропептиды могут модулировать реактивность определенных групп нейронов, стимулировать или тормозить синтез и выделение гормонов, регулировать тканевой метаболизм, осуществлять медиаторную функцию. Кроме того, в отличие от полипептидных цепей гормонов белковой природы, нейропептиды легко проникают через гемато-энцефалический барьер, поэтому многие из них широко используются в терапевтических целях.

Одним из первых идентифицированных нейропептидов был вазопрессин (или антидиуретический гормон) – гормон, секретруемый нейронами супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса, и накапливающийся в задней доле гипофиза. В организме человека и животных вазопрессин оказывает прессорный и гипогликемический эффекты, но наиболее важным является антидиуретический. Механизм антидиуретического действия вазопрессина состоит в усилении обратного всасывания воды в почечных канальцах в ответ на возбуждение осморорецепторов мозга и печени. В литературных источниках есть сведения о влиянии антидиуретического гормона на деятельность различных органов желудочно-кишечного тракта [1 – 5], а также кровообращение в печени [6], однако желчеобразовательная и экскреторная функции печени при действии вазопрессина изучались мало. Поэтому целью данного исследования было изучить влияние вазопрессина на внешнесекреторную функцию печени у собак, а также исследовать изменения содержания билирубина и белка в полученной желчи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проведены в хроническом эксперименте на голодных (спустя 18-20 ч после кормления) беспородных собаках с вживленной по методике П.С. Лященко [7] холецисто-дуоденальной фистульной трубкой. В опытах учитывали количество отделяемой печенью желчи (мл/кг массы животного) за каждые 30 минут в течение 4 часов секреции. Вазопрессин (адиупресин, Амеда-фарма, Пвт.Лтд, Индия), в дозах 0,1 и 0,2 нг/кг вводили внутримышечно (в/м) в 1 мл физиологического раствора,

после чего желчь собирали в течение 3-х часов. Контролем были опыты с в/м введением животным 1 мл физиологического раствора (спонтанный холерез). В каждой полученной пробе желчи определяли содержание общего белка по методу Мирошниченко и Савельева [8], билирубина по методу Ендрашека-Гроффа в модификации Чевари-Эртла [9] и рассчитывали в мг/кг массы тела животного. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistika, используя t-критерий Стьюдента для данных, которые были нормально распределены. Достоверными считались отличия между контролем и опытом при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты наших исследований показали, что интенсивность секреции желчи при внутримышечном введении вазопрессина изменялась в зависимости от дозы вводимого препарата. Вазопрессин в дозе 0,1 нг/кг в третьем получасе опыта достоверно увеличивал объем отделяемой желчи на 138,9% ($p < 0,01$) по сравнению со спонтанным холерезом, тогда как в остальных полученных пробах разница между контролем и опытом не была статистически значимой (рис.1). В сумме за 3 часа наблюдения желчи секретировалось на 57,6% больше ($2,19 \pm 0,44$ мл/кг; $p < 0,05$), чем в контрольных опытах ($1,39 \pm 0,09$ мл/кг).

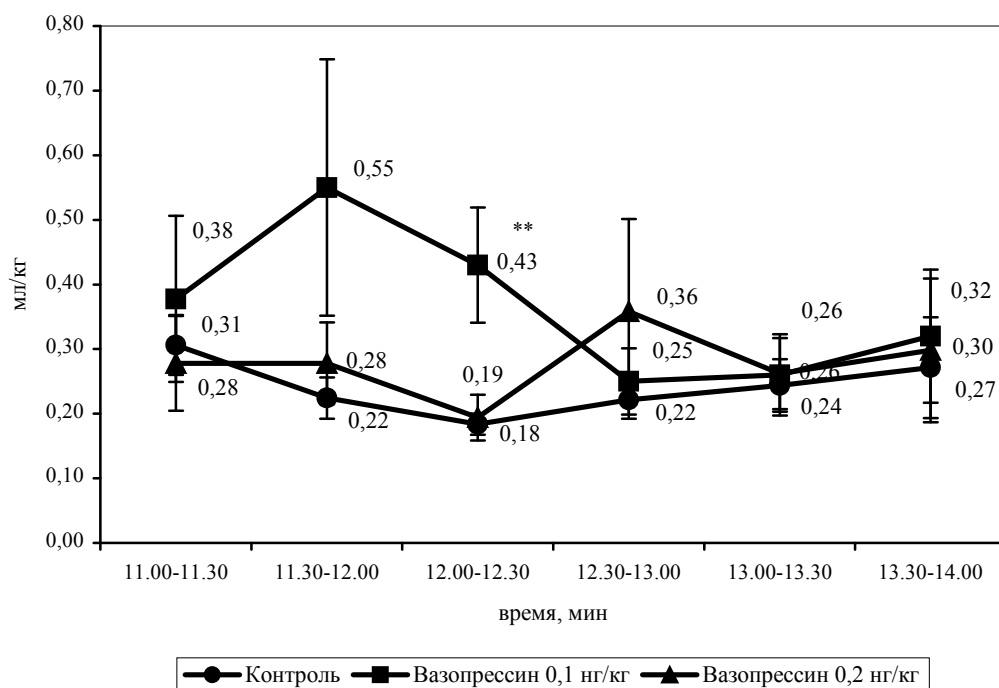


Рис.1. Изменения объема секретируемой желчи у собак при внутримышечном введении вазопрессина в дозах 0,1 и 0,2 нг/кг.

Сравнение данных контрольных опытов и опытов с введением вазопрессина в дозе 0,2 нг/кг свидетельствует, что показатели объема секретироваемой желчи в течение всего периода наблюдения под влиянием пептида были близки к контрольным значениям. Статистически достоверными эти изменения не были (рис. 1).

Данные литературы свидетельствуют, что на гепатоцитах расположены V1a вазопрессиновые рецепторы, которые локализованы исключительно на базолатеральном домене плазматической мембраны [10] и биологический эффект вазопрессина осуществляется с участием вторичного посредника. По данным Schiff [11] взаимодействие вазопрессина с V1a рецепторами гепатоцитов приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($Ca^{2+}_{вн}$) и активации протеинкиназы C (PKC) путем гидролиза фосфоинозитолбисфосфата и образования инозитолтрифосфата, а также диацилглицерола. Согласно данным литературы $Ca^{2+}_{вн}$ и PKC влияют на секрецию желчи тремя путями. Во-первых, $Ca^{2+}_{вн}$ стимулирует каналкулярные сокращения, что приводит к перистальтическому выделению желчи [12]. По данным Nathanson [13] V1a вазопрессиновые рецепторы преимущественно локализованы на гепатоцитах прицентральной области печеночной доли. Поскольку известно, что Ca^{2+} -волны в гепатоцитах распространяются в направлении от центральной вены к портальным областям, возможно, Ca^{2+} -волны, двигаясь по концентрационному градиенту, образуют периодическое движение желчи в холангиолах. Во-вторых, агонисты $Ca^{2+}_{вн}$ и PKC стимулируют апикальный экзоцитоз, хотя эффекты $Ca^{2+}_{вн}$ опосредованы PKC [14]. В-третьих, протеинкиназа C стимулирует транспорт органических компонентов желчи через каналкулярный мультиспецифический переносчик органических анионов (canalicular multispecific organic anion transporter - mrp2) [15].

Кроме того, описаны эффекты $Ca^{2+}_{вн}$ и PKC, угнетающие желчеотделение. Так, по данным Liu [16] $Ca^{2+}_{вн}$ повышает проницаемость плотных контактов гепатоцитов. Другими авторами [17] установлено, что PKC уменьшает выделение липидов, угнетая как трансцитозольный, так и каналкулярный транспорт последних. К тому же, непосредственным эффектом агонистов $Ca^{2+}_{вн}$ и активаторов протеинкиназы C является угнетение секреции неорганических ионов [18]. Также согласно данным литературы величина секреторного ответа гепатоцитов может зависеть от дозы введенного пептида [19]. Возможно, в наших опытах мы наблюдали именно такой эффект, поскольку под влиянием меньшей дозы гормона наблюдалось статистически значимое увеличение количества отделяемой желчи.

О комплексном влиянии вазопрессина на различные процессы в паренхиме печени, связанные с желчеобразованием, свидетельствуют также изменения содержания общего белка в желчи, составляющими которого являются различные пептиды, аминокислоты и продукты их обмена – мочевиная кислота и мочевина. Хотя концентрация белков в желчи невелика, спектр их довольно широк. Это и протеины плазмы (альбумин, иммуноглобулин А, гептоглобин), и лизосомальные ферменты (кислая фосфатаза, β -глюкуронидаза, β -галактозидаза), и ферментативные белки каналкулярной мембраны (щелочная фосфатаза, 5'-нуклеотидаза), а также многие другие, влияющие на интенсивность желчеотделения [20].

ИЗМЕНЕНИЯ СЕКРЕТОРНОЙ И ЭКСКРЕТОРНОЙ ФУНКЦИЙ ПЕЧЕНИ

В наших исследованиях мы определяли содержание в желчи общего белка. Результаты опытов показали, что под влиянием вазопрессина (0,1 нг/кг) дебит белка в первом получасе опыта увеличился на 194,9% ($p < 0,05$), во втором на 344,3% ($p < 0,05$), в третьем на 318,8% ($p < 0,001$) и в четвертом на 100,6% ($p < 0,01$), а в пятом и шестом соответственно на 66,5% ($p > 0,05$) и 97,6% ($p > 0,05$) по сравнению со спонтанным холерезом. Всего за три часа опыта печень собак секретировала на 188,1% ($p < 0,001$) общего белка больше, чем в контроле (табл.1).

В опытах под действием вазопрессина в дозе 0,2 нг/кг дебит общего белка в первой пробе желчи увеличился на 132,6% ($p < 0,05$), во второй на 109,7% ($p < 0,05$), в третьей на 126,6% ($p < 0,01$), в четвертой на 194,2% ($p > 0,05$), в пятой на 50% ($p > 0,05$) и в шестой на 107,3% ($p > 0,05$) по сравнению с контролем. В сумме за опыт выделилось на 129,3% ($p < 0,001$) общего белка больше, чем в контроле (табл.1).

Таблица 1.

Влияние вазопрессина на содержание белка в желчи собак
(мг/кг массы животного)

№ пробы	Время	Контроль	Вазопрессин (0,1 нг/кг)	Вазопрессин (0,2 нг/кг)
1	11,00-11,30	1,75±0,30	5,16±1,53*	4,07±1,07*
2	11,30-12,00	1,76±0,50	7,82±2,96*	3,69±0,52*
3	12,00-12,30	1,28±0,17	5,36±0,73***	2,90±0,49**
4	12,30-13,00	1,70±0,17	3,41±0,64**	5,00±2,01
5	13,00-13,30	2,24±0,45	3,73±0,73	3,36±0,19
6	13,30-14,00	2,48±0,68	4,90±1,30	5,14±1,80
Сумма	11,00-14,00	10,54±1,27	30,37±4,83***	24,17±1,80***

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Установлено, что белки выделяются в желчь из лизосом гепатоцитов, каналикулярной мембраной, вследствие трансцитоза пузырьков или из плазмы путем парацеллюлярной диффузии. Выделение белка этими путями регулируется отдельными механизмами. Известно, что протеинкиназа С в гепатоцитах повышает парацеллюлярную проницаемость и экзоцитоз, увеличивая секрецию белка с желчью [11], поэтому можно предположить, что индуцируемый вазопрессином $Ca^{2+}_{вн}$ активирует протеинкиназу С и таким образом повышает уровень секреции белка с желчью.

Результаты наших исследований показали, что как для объема отделяемой желчи, так и для содержания в ней общего белка меньшая доза вазопрессина оказалась более эффективной. Это может быть связано с феноменом резервных рецепторов, поскольку максимальный ответ клетки может наблюдаться при концентрациях гормона, обеспечивающих занятость всего 5-10% общего числа специфических участков связывания [21].

Одним из компонентов желчи, определяющим ее качественное своеобразие, является билирубин. Он не принимает участия в пищеварении и выделение его

печенью в составе желчи – сугубо экскреторный процесс. Поэтому состояние выделительной функции печени характеризуется количеством билирубина, который выделяется в составе печеночной желчи.

Согласно результатов наших исследований применение вазопрессина в дозе 0,1 нг/кг сопровождалось мало заметными и незакономерными изменениями содержания билирубина в желчи (табл.2), тогда как при введении большей дозы пептида (0,2 нг/кг) наблюдалось стабильное и статистически достоверное увеличение показателей дебита данного компонента в секрете (табл.2). Так, содержание билирубина в первом получасе опыта увеличилось на 45,5% ($p < 0,05$), во втором на 114,9% ($p < 0,01$), в третьем на 71,4% ($p < 0,05$), в четвертом на 195,9% ($p > 0,05$), в пятом на 92,2% ($p < 0,01$), в шестом на 62% ($p > 0,05$). Всего за опыт с желчью экскретировалось на 107,7% ($p < 0,001$) билирубина больше, чем в контроле (табл.2).

Таблица 2.

**Влияние вазопрессина на содержание билирубина в желчи собак
(мг/кг массы животного)**

№ пробы	Время	Контроль	Вазопрессин (0,1 нг/кг)	Вазопрессин (0,2 нг/кг)
1	11,00-11,30	0,099±0,013	0,078±0,021	0,144±0,014*
2	11,30-12,00	0,067±0,011	0,113±0,032	0,144±0,017**
3	12,00-12,30	0,063±0,005	0,108±0,014	0,108±0,018*
4	12,30-13,00	0,073±0,010	0,065±0,010	0,216±0,087
5	13,00-13,30	0,077±0,011	0,080±0,009	0,148±0,017**
6	13,30-14,00	0,100±0,032	0,100±0,021	0,162±0,046
Сумма	11,00-14,00	0,444±0,026	0,543±0,064	0,922±0,089***

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ по сравнению с контролем.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что достоверное увеличение экскреции билирубина с желчью наблюдалось после применения вазопрессина в дозе 0,2 нг/кг. Такой эффект может быть связан с тем, что, согласно данных литературы [3], активность внутриклеточной протеинкиназы С играет важную роль в функциональных свойствах Ah рецептора (aryl hydrocarbon receptor). Так автором было показано, что протеинкиназа С вызывает аккумуляцию Ah рецептора на ядре и этот эффект является следствием добавочных сигналов, которые вызывают лиганд-связанный захват рецептора. То есть протеинкиназа С вовлечена в клеточные и молекулярные процессы, которые влияют на способность рецептора запускать транскрипцию. Кроме того, согласно данным Huang [22] активация Ah рецептора билирубином приводит к повышению экспрессии UGT1A1-изоформы UGT1 гена, участвующей в глюкуронизации билирубина [23].

ВЫВОДЫ

1. Вазопрессин оказывает модулирующее действие на желчеобразовательную функцию печени. В дозе 0,1 нг/кг этот пептид увеличивает как объем отделяемой желчи, так и секрецию белка, но не влияет на экскрецию билирубина.

2. При введении вазопрессина в дозе 0,2 нг/кг его эффект на секреторные процессы в печени не проявляется, однако пептид активирует экскреторную функцию железы.

Список литературы

1. Bridges RJ, Nell G, Rummel W. Influence of vasopressin and calcium on electrolyte transport across isolated colonic mucosa of the rat // *J.Physiol.* – 2004. – Vol. 338. – P. 463–75.
2. Bridges RJ, Rummel W, Wollenberg P. Effects of vasopressin on electrolyte transport across isolated colon from normal and dexamethasone-treated rats // *J.Physiol.* – 2004. – Vol. 355. – P. 11–23.
3. Morgan E.T., Sewer M.B., Iber H. et al. Physiological and pathophysiological regulation of cytochrome P450 // *Drug metabolism and disposition.* – 1998. – Vol. 26. – Is. 12. – P.1232–1240.
4. Gao Z. Y., Henquin J. C. Argenic vasopressin and oxytocin effects on mouse pancreatic beta-cells receptor involved in stimulation of insulin release // *Diabetes.* – 1999. – Vol. 42. – P. 914–921.
5. Кожевникова Л.А., Косенко А.Ф. О влиянии вазопрессина на желудочную секрецию, стимулированную гистамином // Республик.межвед.науч.сборник «Проблемы физиологии гипоталамуса». – К.: Изд-во при КГУ. – 1985. – Вып. 19. – С. 52–57.
6. Янчук П.И., Цыбенко В.А., Егорова Л.С. и др. Изменения кровообращения и напряжения кислорода в печени под влиянием вазопрессина и окситоцина // Республик. межвед. науч. сборник «Проблемы физиологии гипоталамуса». – К.: Изд-во при КГУ. – 1988. – Вып. 22. – С. 12–17.
7. Лященко П.С. К методике исследования внешнесекреторной функции печени у собак // *Физиол.журн. СССР.* – 1975. – Т. 61, № 12. – С. 1891–1893.
8. Мирошниченко В.П., Савельев В.Г. Фотометрическое определение общего белка желчи // *Лабор.дело.* – 1989. – Т. 1. – С. 56–61.
9. Чевари С., Чаба И., Эртл Т. Модифицированный метод Ендрашика-Грофа для определения концентрации конъюгированного билирубина в сыворотке крови // *Лабор.дело.* – 1983. – Т. 12. – С. 24.
10. Trana D., Stellya N., Tordjman T. et al. Visualization of Cell Surface Vasopressin V1a Receptors in Rat Hepatocytes with a Fluorescent Linear Antagonist // *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* – 1999. – Vol. 47. – P. 401–410.
11. Schiff E.R., Sorrel F., Maddrey W.C. // *Schiff's disease of the liver.* – 8th ed. – Lippincott – Raven publisher, Philadelphia. – 1999. – 1783 p.
12. Nicous A., Serriere V., Prigent S. et al. Hypothalamic vasopressin release and hepatocyte Ca²⁺ signaling during liver regeneration: an interplay stimulating liver growth and bile flow // *The FASEB Journal.* – 2003. – Vol. 17. – P. 1901–1903.
13. Nathanson M.H., Burgstahler A.D., Mennone A. et al. Ca²⁺ waves are organized among hepatocytes in the intact organ // *Am. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 269. – P. G167–171.
14. Roma M.G., Ahmed C.J., Coleman R. The protein kinase inhibitor 1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2-methyl-piperazine (H-7) prevents and reverses Ca(2+)-mediated injury in isolated rat hepatocyte couplets // *Toxicol.Appl.Pharmacol.* – 1999. – Vol. 161. – P. 192–200.
15. Guo G.L., Klaassen C.D. Protein Kinase C Suppresses Rat Organic Anion Transporting Polypeptide 1- and 2-Mediated Uptake // *Pharmacology.* – 2001. – Vol. 299, № 2. – P. 551–557.
16. Liu X., LeCluyse E.L., Brouwer K.R. et al. Use of Ca²⁺ Modulation to Evaluate Biliary Excretion in Sandwich-Cultured Rat Hepatocytes // *J.Pharmacology.Exp.Ther.* – 1999. – Vol. 289. – № 3. – P. 1592–1599.
17. Kubitz R., Saha N., Kuhlkamp T. et al. Ca²⁺-dependent protein kinase C isoforms induce cholestasis in rat liver // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, № 11. – P. 10323–10330.
18. Sato Y, Hanai H, Nogaki A, Hirasawa K, Kaneko E, Hayashi H, Suzuki Y. Role of the vasopressin V(1) receptor in regulating the epithelial functions of the guinea pig distal colon // *Am.J.Physiol.* – 1999. – Vol. 277. – P. G819–828.

19. Serriere V., Berthon B., Boucherie S., Acquemin E. J., Guillon G., Claret M. T. Vasopressin receptor distribution in the liver controls calcium wave propagation and bile flow // The FASEB Journal.– 2001.– Vol. 15.–P. 1484–1486.
20. Baynes J., Dominiczak M.H. Medical biochemistry. – Mosby, 1999. – 696 p.
21. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. – М.: Мир, 1989. – 656 с.
22. Wendong H., Zhang J. , Moore D.D. A traditional herbal medicine enhances bilirubin clearance by activating the nuclear receptor CAR // Clin. Invest. – 2004. – Vol. 113. – P. 137–143.
23. Wells P.G., Mackenzie P.I., Chowdhury J.R. et all. Glucuronidation and the UDP–glucuronosyltransferases in health and disease // Drug metabolism and disposition. – 2004. – Vol. 32. – P. 281–290.

Поступила в редакцию 13.12.2006 г.