

**УДК 612.35:616.36**

## **ОСОБЛИВОСТІ ДИНАМІКИ ХОЛЕРЕЗУ ПРИ ДІЇ РІЗНИХ ДОЗ ЕНДОТЕЛІНУ-1**

*Радченко Н.С., Янчук П.І.*

*НДІ фізіології імені академіка Петра Богача Навчально-наукового центру «Інститут біології» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна  
E-mail: VeselkaN@i.ua*

В гострих дослідах на щурах досліджено вплив різних доз ендотеліну-1 (ЕТ-1) на рівень холесекреції. Встановлено, що введений внутрішньопортально, ендотелін-1 в дозах 0,1 та 0,2 мкг/кг зумовлює зростання холесекреції порівняно з контролем впродовж всього дослідження, максимальна реакція становила 20,4% ( $p < 0,05$ ) і 31% ( $p < 0,01$ ) відповідно. Застосування ще більшої дози ЕТ-1 (0,5 мкг/кг) зумовило незначне підвищення секреції жовчі на початку і часткове гальмування в другій половині дослідження. Доза ендотеліну-1 – 0,75 мкг/кг виявила чітку гальмівну дію на жовчоутворення з максимальним ефектом 11,7% ( $p < 0,05$ ) щодо контролю у 5-му десятихвилинному проміжку з моменту введення пептиду.

**Ключові слова:** ендотелін-1, печінка, жовч, холесекреція.

### **ВСТУП**

Зовнішньосекреторна функція печінки регулюється складними нейрогуморальними механізмами, в яких особливе місце посідають пептиди, зокрема ендотеліни [1–7]. Так, ендотелін-1 (ЕТ-1) ефективно впливає на тонус судин печінки [8]. Окрім того, виявлено регуляторну дію даного пептиду на перебіг інших фізіолого-біохімічних процесів не тільки в цьому органі, а й в інших тканинах організму, де наявні ендотелінові рецептори [9]. Вони за своєю хімічною будовою є глікопротеїдами, у яких білкова гідрофобна частина молекули рецептора перетинає біліпідний шар мембрани клітини сім разів, залишаючи, відповідно, у внутрішньоклітинному та зовнішньоклітинному просторі петлі пептидних ланцюгів, які утворені переважно гідрофільними амінокислотами. Саме ці зовнішньоклітинні пептидні петлі разом з вуглеводневою складовою формують сайти для зв'язування з регуляторними пептидами ендотелінової природи. Останні, взаємодіючи з сайтами рецептора, викликають характерні конформаційні зміни молекули рецептора та за участі G-білків ініціюють зміни рівня внутрішньоклітинних посередників. Завдячуючи цьому реалізується вплив ендотелінових пептидів на перебіг метаболічних процесів у клітині [10].

Варто зазначити, що ендотелінові рецептори підтипу А (ЕТ<sub>A</sub>) виявлені не лише на клітинах ендотелію кровеносних судин печінки, а й безпосередньо на гепатоцитах та міоцитах жовчного міхура [11, 12]. Така локалізація цих рецепторів вказує на широкі можливості різнонаправленого впливу ендотеліну на перебіг

фізіолого-біохімічних процесів у печінці, в тому числі тісно пов'язаних з жовчоутворенням.

В наших попередніх дослідженнях [13] було з'ясовано, що застосування ендотеліну-1 у дозі 1мкг/кг маси тіла тварини, що зумовлює чітку звужувальну дію на ворітні судини печінки, викликає гальмування холерезу, максимальні зміни якого реєструються на 40-50 хвилинах з моменту внутрішньопортального введення препарату. У зв'язку з виявленим суттєвим впливом даної дози ендотеліну-1 на жовчоутворення в печінці щурів виникла необхідність з'ясувати вплив його менших доз на холеретичні реакції, що і стало метою наших подальших досліджень.

#### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Дослідження проводили на 36 білих лабораторних щурах масою 180-250 г за умов гострого експерименту. У якості наркозу використовували уретан (Sigma-Aldrich, USA) в дозі 1 г/кг маси тіла, який вводили внутрішньоочеревинно. У наркотизованих щурів розтинали черевну порожнину і у відпрепаровану жовчну протоку вводили тонку канюлю, з'єднану поліетиленою трубкою з мікропіпеткою. ЕТ-1, розчинений у фізіологічному розчині, вводили внутрішньопортально через катетер к дозах: 0,1мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,5мкг/кг, 0,75мкг/кг маси тіла тварини. Контролем слугували тварини, яким аналогічним способом вводили фізіологічний розчин.

Інтенсивність секреції жовчі у щурів визначали кожні 10 хвилин експерименту впродовж 3 годин. Об'ємну швидкість секреції жовчі розраховували в мкл/г маси тіла тварини.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за допомогою пакета програм STATISTICA 6.0. Для оцінки нормальності розподілу використовували тест Шапіро-Вілка. Для оцінки значущих відмінностей між вибірками з нормальним розподілом даних використовували критерій Ст'юдента. Відмінності між групами вважалися вірогідними при  $p < 0,05$ .

#### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Результати наших досліджень засвідчили, що спонтанна секреція жовчі у щурів в гострих спробах відбувається постійно, але нерівномірно. При цьому впродовж дослідження спостерігається закономірне зменшення кількості виділеної жовчі (рис.1). Так, в перший десятихвилинний період після півгодинної стабілізації печінка щурів секретувала  $0,291 \pm 0,022$  мкл/г маси тіла жовчі, тоді як у останньому десятихвилинному проміжку жовчі вироблялось лише  $0,244 \pm 0,019$  мкл/г маси тіла, тобто на 16,2% менше ( $p < 0,05$ ). Однак, варто відмітити, що це зниження жовчоутворення було нерівномірним впродовж трьохгодинного контрольного експерименту, про що свідчать деякі осциляції динаміки холерезу (рис.1).

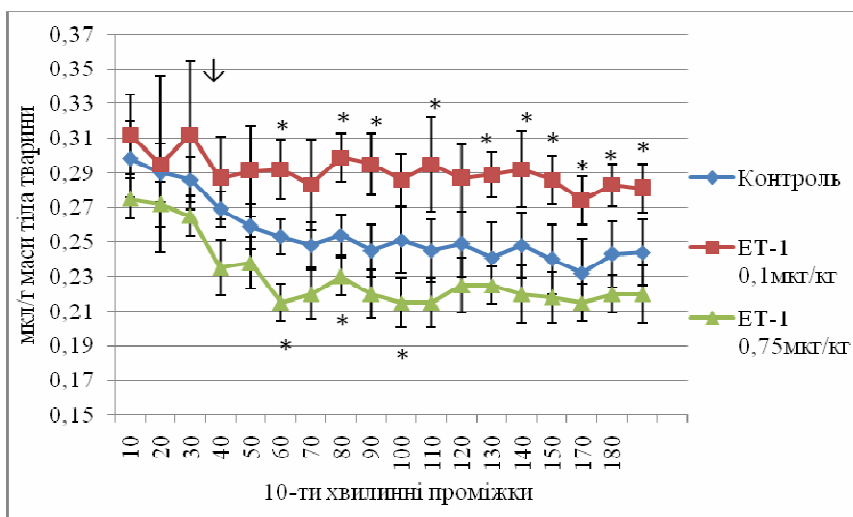


Рис. 1. Вплив різних доз ендотеліну-1 (0,1мкг/кг, 0,75мкг/кг) на динаміку секреції жовчі у щурів (мкл/г маси тіла), (M+m, n=22), примітка: \* -  $p < 0,05$ ; ↓ - момент введення речовини.

Іншу динаміку секреції жовчі у піддослідних щурів ми реєстрували при введенні різних доз ендотеліну-1. Зокрема, застосування найменшої апробованої дози – 0,1мкг/кг зумовлювало зростання холесекреції порівняно з контролем впродовж всього дослідження (рис.1, рис.2). Найбільша реакція (підвищення холерезу на 20,4%;  $p < 0,05$ , відносно контролю) спостерігалась на 80-ій хвилині після введення ендотеліну-1. Також варто відмітити, що в останньому 10 хвилинному проміжку рівень холерезу був на 15,2% ( $p < 0,05$ ) вищий за контрольний. При цьому загальна кількість продукованої жовчі за весь дослід зроста порівняно з контролем на 14,1% ( $p < 0,05$ ) (рис.4).

Внутрішньопортальне введення вдвічі більшої дози ЕТ-1 (0,2мкг/кг маси тіла) зумовило суттєве зростання жовчоутворення вже з перших 10-ти хвилинних проміжків дослідження (рис.2, рис.3). В кінці першої години дослідження, тобто у шостій десятихвилинній пробі, рівень холерезу у піддослідних тварин перевищував контрольне значення на 21% ( $p < 0,05$ ). Стимулююча дія пептиду на жовчоутворення з часом дослідження зростала і в 9 – 16-тому десятихвилинних проміжках перевищувала контрольні величини на 31% ( $p < 0,01$ ). А в останній пробі дослідження рівень холерезу був на 24,8% ( $p < 0,05$ ) вищий ніж у контролі (рис.3). Стимулюючий ефект даної дози ЕТ-1 забезпечив збільшення кількості жовчі за весь період дослідження на 21,6% ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем (рис.4).

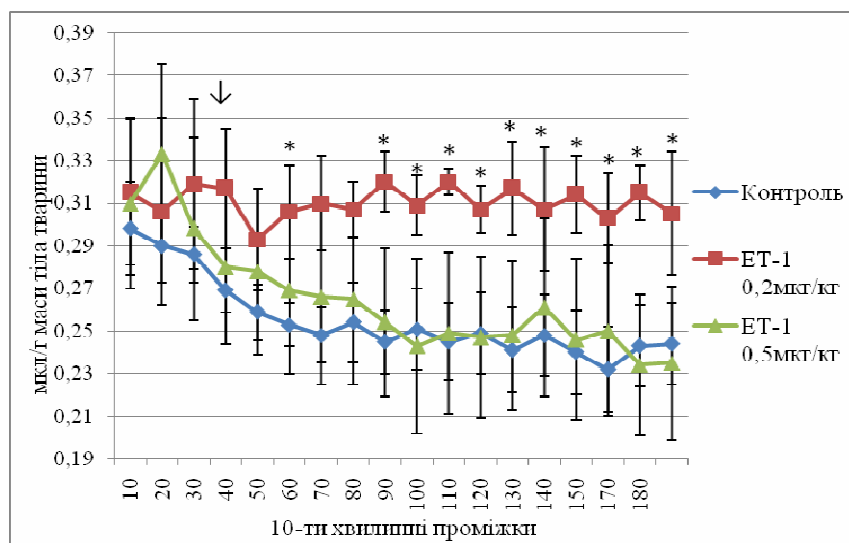


Рис. 2. Вплив різних доз ендотеліну-1 (0,2мкг/кг, 0,5мкг/кг) на динаміку секреції жовчі у щурів (мкг/г маси тіла), (M+m, n=22), примітка: \* -  $p < 0,05$ ; ↓ - момент введення речовини.

Застосування ще більшої дози ET-1 (0,5 мкг/кг маси тіла тварини) не виявило очікуваної подальшої стимулюючої дії пептиду на жовчоутворення у піддослідних щурів. Так, в першу годину після введення ET-1 реєстрували незначне підвищення холерезу (на 4-7%) в окремі десятихвилинні проміжки дослідження порівняно з відповідними контрольними значеннями. В наступні півтори години дослідження в динаміці холерезу спостерігались окремі осциляції, як у бік гальмування процесу так і незначної стимуляції. В результаті кількість продукованої жовчі в цілому за дослід була лише на 3,7% більшою відносно контролю. Однак, слід підкреслити, що на відміну від менших доз ендотеліну-1, для цієї дози препарату доволі чітко проявилися особливості дії пептиду на якісно відмінних етапах жовчоутворення. Так, якщо в першій половині дослідження, коли має місце надходження жовчних кислот із кишечника, дія препарату була більш ефективною в підтриманні на стабільному рівні жовчосекреції. А в другій половині дослідження, коли холерез забезпечується головним чином за рахунок біосинтезу жовчних кислот “de novo”, вплив ET-1, що підтримує холесекрецію на стабільному рівні, виявився в певній мірі менш ефективним.

ОСОБЛИВОСТІ ДИНАМІКИ ХОЛЕРЕЗУ ПРИ ДІЇ РІЗНИХ ДОЗ...

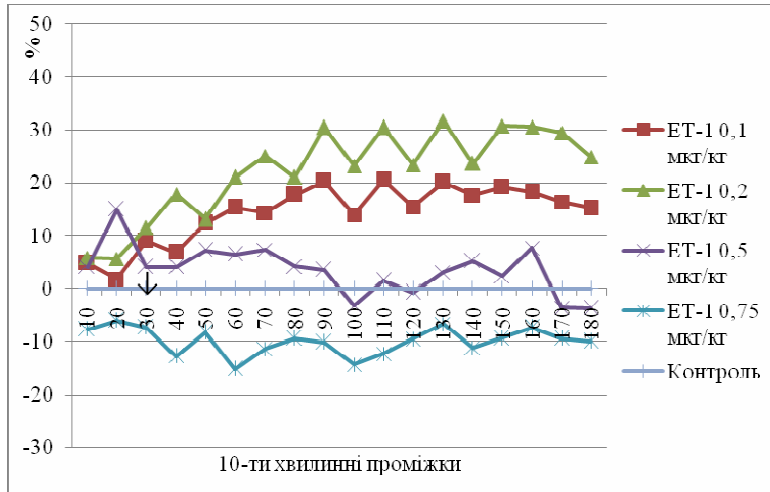


Рис. 3. Відносні зміни холерезу (%) у щурів при введенні різних доз ендотеліну-1, (M+m , n=36). примітка: ↓ - момент введення речовини.

Застосування нами більш високої дози ендотеліну-1 – 0,75 мкг/кг виявило чітку гальмівну його дію на жовчоутворення, що поступово розвивалася і досягла свого максимального ефекту – 11,7% ( $p < 0,05$ ) відносно контролю, у 5-му десятихвилинному проміжку з моменту введення пептиду. І в наступних проміжках до кінця дослідження ми реєстрували головним чином незначний гальмівний ефект цієї дози ендотеліну-1, який в результаті обумовив вірогідне зниження кількості секретованої печінкою жовчі на 9,9% ( $p < 0,05$ ) порівняно з контролем (рис. 4).

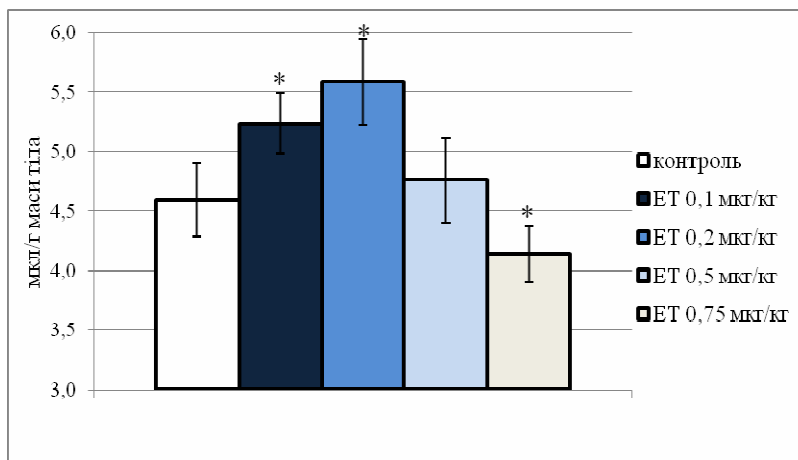


Рис. 4. Кількість секретованої жовчі протягом дослідження при дії різних доз ендотеліну-1, (M+m , n=36). примітка: \* -  $p < 0,05$ .

Виявлені нами різнопланові впливи досліджуваних доз ендотеліну-1 на зовнішньосекреторну функцію печінки у щурів в деякій мірі є характерними для пептидної регуляції багатьох фізіологічних функцій [14, 15], коли малі дози стимулюють перебіг певного фізіологічного процесу, а більші дози – чинять зворотній ефект, а іноді навіть втрачають свою ефективність [2, 16].

Отже, результати нашого дослідження дають підстави по-іншому трактувати причини суперечливих даних, отриманих іншими авторами при дослідженні впливу ET-1 на жовчосекреторні процеси [17, 18]. Адже ефективність дії регуляторного пептиду залежить як від його дози, так і від функціонального стану органа і організму в цілому [19]. Використана нами схема експерименту, тобто гострі досліді на щурах, не виключає крім безпосередньої дії ендотеліну-1 на перебіг фізіолого-біохімічних процесів в печінці участь центральних механізмів регуляції. Ендотелінові рецептори виявлені як на клітинах периферичних органів, так і на клітинах центральної нервової системи [20, 21]. При введенні більш високих доз пептиду внутрішньопортально його інактивація в печінці повністю не відбувається, а тому потрапивши до системного кров'яного русла він може здійснювати свій центральний регуляторний вплив на холесекрецію.

### ВИСНОВОК

Таким чином, проведені нами дослідження виявили особливості впливу різних доз ендотеліну-1 на динаміку холерезу у щурів за умов гострого експерименту і вказують на те, що цей пептид бере активну участь у гуморальній регуляції зовнішньосекреторної функції печінки.

### Список літератури

1. Kohan D.E. Biology of endothelin receptors in the collecting duct / D.E. Kohan // *Kidney International*. – 2009. – Vol. 76. – P.481–486.
2. Климов П.К. Роль нейропептидов в регуляции функций пищеварительной системы / П.К.Климов // *Клин. медицина*. – 1987. – Т.65, № 3. – С.3-12.
3. Vagally mediated cholestatic and choleric effects of centrally applied endothelin-1 receptors / M.R. Rodriguez, M.E. Sabbatini, G. Santella. [et al.] // *Regulatory peptides*. – 2006. – Vol.135. – P.54-62.
4. Саратиков А.С. Желчеобразование и желчегонные средства / А.С. Саратиков, Н.П. Скакун // *Томск: Изд-во Томского ун-та*. – 1991. – С. 260.
5. Ганиткевич Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма / Я.В. Ганиткевич – К.: *Наук.думка*. – 1980. – 179 с.
6. Barton M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy / M.Barton, M.Yanagisawa // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 86. – P.485–498.
7. Yoneda M. Central regulation of hepatic function by neuropeptides / M. Yoneda, H. Watanobe, A. Terano // *J. Gastroenterol.* – 2001. – No 36. – P.361–367.
8. Янчук П.І. Участь ендотеліну-1 у регуляції кровообігу, кисневого балансу та жовчосекреторної функції печінки / П.І. Янчук, В.І. Комаренко, Я.І. Русінчук, А.А. Терехов // *Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка: Проблеми регуляції фізіологічних функцій*. – 2006. – Вип.1. – С. 8-10.
9. Патарая С.А. Биохимия и физиология семейства эндотелинов / С.А.Патарая, Д.В.Преображенский, Б.А.Сидоренко, В.П.Масенко // *Кардиология*. – 2000. – № 6. – С. 78 -85.
10. Levin E.R. Endothelins / E.R. Levin // *The new england journal of medicine*. – 1995. – Vol. 333, No 6. – P. 356–363.

11. Huang S.C. Endothelin ET(A) but not ET(B) receptors mediate contraction of common bile duct / S.C. Huang // *Regulatory Peptides*. – 2003. – Vol. 133, No 15. – P. 131.
12. Kamimura Y. Endothelin-1 induces contraction of bile canaliculi in isolated rat hepatocytes / Y. Kamimura, N. Sawada, M. Aoki, M. Mori // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 191. – P. 817-822.
13. Янчук П.І. Зміни співвідношення жовчних кислот в жовчі щурів під впливом ендотеліну-1 / П.І. Янчук, Н.С. Весельська, А.А. Терехов, В.М. Бабан // *Вісник Черкаського Університету: Серія Біологічні науки*. – 2009. – Вип.156. – С. 149-154.
14. Громов Л.А. Нейропептиды. / Громов Л.А. – К.: Здоров'я. – 1992. – 46 с.
15. Ивашкин В.Т. Уровни регуляции функциональной активности органов и тканей / В.Т. Ивашкин, В.Ю. Васильев, Е.С. Северин. – Л.: Наука, 1987. – 272 с.
16. Ивашкин В.Т. Теория функциональных блоков и проблемы клинической медицины / В.Т. Ивашкин, Г.А. Минасян, А.М. Уголев – Л.: Наука, 1990. – 303 с.
17. Isales CM. Endothelin-1 induces cholestasis which is mediated by an increase in portal pressure / C.M. Isales, M.H. Nathanson, R. Bruck // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1993. – Vol. 191, No 3. – P. 1244-1251.
18. Endothelin-1 stimulates bile acid secretion and vesicular transport in the isolated perfused rat liver / A. Tanaka, K. Katagiri, M. Hoshino [et al.] // *Am.J.Physiol.* – 1994. – Vol. 266. – P. 324-329.
19. Луценко В.К. Пептиды и синапсы. (Механизмы регуляции деятельности центральной нервной деятельности) / Луценко В.К. // *Сер. Медицина – Изд-во Знание*. – М., 1986. – №1. – 64 с.
20. Mauricio M. Castañeda. Endothelineric cells in the subependymal region of mice / Mauricio M. Castañeda, Marisa A. Cubilla, Martín M. López-Vicchi, Angela M. Suburo // *Brainresearch*. – 2010. – Vol. 1321. – P.20-30.
21. Endothelin-3 stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis / M. Hirai, S. Miyabo, E. Ooya [et al.] // *Life sciences*. – 1991. – Vol. 48. – P. 2359-2363.

**Радченко Н.С. Особенности динамики холереза при действии разных доз эндотелина-1 / Н.С. Радченко, П.И. Янчук** // *Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия»*. – 2013. – Т. 26 (65), № 1. – С.179-185.

В острых опытах на крысах исследовали влияние различных доз эндотелина-1(ЭТ-1) на уровень холесекреции. Установлено, что введенный внутривенно, ЭТ-1 в дозах 0,1 и 0,2 мкг/кг вызывает возрастание холесекреции по сравнению с контролем на протяжении всего эксперимента, максимальная реакция повышения составляла 20,4% ( $p<0,05$ ) и 31% ( $p<0,01$ ) соответственно. Применение еще большей дозы ЭТ-1 (0,5 мкг/кг) обусловило незначительное повышение секреции желчи в начале опыта и частичное торможение холереза во второй половине. ЭТ-1 в дозе 0,75 мкг/кг оказывал четкое тормозящее действие на желчеотделение, с максимальным эффектом – 11,7% ( $p<0,05$ ) относительно контроля в 5-м десятиминутном промежутке с момента введения пептида.

**Ключевые слова:** эндотелин-1, печень, желчь, холерез.

**Radchenko N.S. Peculiarities of bile secretion processes in application of different endothelin-1 doses / N.S. Radchenko, P.I. Yanchuk** // *Scientific Notes of Taurida V.Vernadsky National University. – Series: Biology, chemistry*. – 2013. – Vol. 26 (65), No. 1. – P. 179-185.

Influence of different endothelin-1(ET-1) doses on cholesecretion velocity was studied in acute experiments on rats. It was shown, that intraportally injected endothelin-1 in doses of 0,1 and 0,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of body weight causes stimulation of bile secretion during the whole experiment compared to control by 20.4% ( $p<0,05$ ) and 31.0% ( $p<0,05$ ) correspondingly. ET-1 in dose of 0,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of body weight evoked slight choleresis increasing at the beginning of experiment followed by insignificant bile secretion decreasing during the second half of experiment. But the highest dose of ET-1 (0,75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of body weight) exposed strict inhibitory action on bile formation process and during the fifth half-hour period cholesecretion decreased by 11,7% ( $p<0,05$ ) compared to control experiments.

**Keywords:** ET-1 – endothelin-1, liver, bile, choleresis.

*Поступила в редакцию 25.01.2013 г.*