

С.В. Тукаєв, С.П. Весельський, Є.М. Решетнік, П.С.Лященко

Вплив кальційзалежних сполук на секрецію з жовчю аденілових нуклеотидів

Клетки многих типов высвобождают АТФ в ответ на специфические физиологические регуляторные сигналы. АТФ и другие адениловые нуклеотиды вовлечены в регуляцию секреции желчи. Целью исследования было определение влияния на секрецию адениловых нуклеотидов норадреналина, регуляторного трипептида fMLP и блокатора кальциевых каналов верапамила. Содержание адениловых нуклеотидов желчи уменьшалось при действии норадреналина (337 мкг/100 г или 1 ммоль/л) на 65,2 %, fMLP в дозах 0,1 мкг/100 г - на 52,2 % и 10,0 мкг/100 г - на 35,7 %, верапамила (50 мкг/100 г) - на 63,2 %, а также при последовательной инфузии верапамила (50 мкг/100 г) и норадреналина (500 мкг/100 г, в растворе 90 ммоль/л CaCl₂) - на 56,3 %. Таким образом, норадреналин, fMLP и верапамил регулируют желчеобразование, изменяя уровень энергетического обмена.

ВСТУП

Утворення жовчі – це осмотичнозалежне надходження води в жовчні каналікули, при якому транспорт осмотично активних речовин у каналікулярну жовч спряжений з численними метаболічними процесами, що відбуваються в гепатоцитах та на їх цитоплазматичних мембранах [2, 10, 16, 18]. Надходження органічних і неорганічних компонентів до жовчі забезпечують активні транспортні системи каналікулярної плазматичної мембрани гепатоцитів (АТФ-зв'язувальні касетні білки тощо) [18]. Рушійними силами транспорту жовчних кислот та інших органічних компонентів жовчі через каналікулярну мембрану є негативний електрохімічний потенціал та АТФ-залежні транспортні процеси [10, 15, 18]. У прямій залежності від клітинного вмісту АТФ знаходиться швидкість секреції жовчі [13], про це також свідчить той факт, що зі зменшенням вмісту внутрішньоклітинного АТФ знижується швидкість транспорту жовчних кислот [12].

АТФ, АДФ та АМФ, а також аденін, аденозин, аденозин-2'- та аденозин-3'- фос-

фати, аденіндезоксирибоза-5'-фосфат наявні у жовчі, де вони виконують функцію універсального аутокринного та паракринного регулятора для широкого спектра клітинних та органних процесів [21]. Аденілові нуклеотиди здатні впливати на функціональний стан клітин печінки, взаємодіючи з відповідними рецепторами апікальних мембран гепатоцитів [21], що зумовлює інтерес до вивчення змін їх вмісту в жовчі під дією різних регуляторних агентів та аналізу можливої модифікації ними регуляторного впливу різних ендогенних і екзогенних сполук (катехоламінів, пептидних гормонів, жовчних кислот, лікарських препаратів) на функціональний стан клітин. Разом з тим зміни вмісту у жовчі АТФ, АДФ, АМФ відображають інтенсивність метаболічних процесів у гепатоцитах [4], в тому числі, ймовірно, і тих, що складають основу жовчоутворювальної функції.

Метою нашої роботи було визначення вмісту у жовчі аденілових нуклеотидів під впливом речовин, які реалізують свою дію змінюючи, зокрема концентрацію внутріш-

ньоклітинного кальцію, а саме норадреналіну [1] і регуляторного трипептиду бактеріального походження fMLP (N-форміл-метионін-лейцин-фенілаланін) [11] та блокатора кальцієвих каналів верапамілу [1, 19] для з'ясування ролі аденілових нуклеотидів у реалізації впливу вказаних регуляторних речовин на жовчосекреторну функцію.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 25 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180 - 240 г у гострих спробах під тіопенталовим наркозом (5 мг/100 г). Внутрішньопортально інфузували речовини: норадреналіну гідротартат (Московський ендокринний завод, Росія) в дозах 337 та 500 мкг/100 г, fMLP ("Sigma", США) в дозах 0,1 і 10, 0 мкг/100 г, фіноптін (верапамілу гідрохлорид) ("Orion", Фінляндія) в дозі 50 мкг/100 г, кальцію хлорид (Львівфарм) в дозі 1,0% (90 ммоль/л). Швидкість інфузії - 50 мкл/хв, тривалість - 30 хв. Вміст аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ та АМФ, а також аденін, аденозин, аденозин-2' та аденозин-3' фосфати, аденіндезоксирибоза-5'-фосфат) визначали в жовчі за стандартною методикою [5] і розраховували інтенсивність їх секреції. Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Одержані нами результати свідчать, що секреція аденілових нуклеотидів з жовчю при дії фізіологічно активних речовин, які реалізують свій вплив через внутрішньоклітинний кальцій, пригнічується. Норадреналін в дозі 337 мкг/100 г (1 ммоль/л; n=6) знижував сумарний вміст аденілових нуклеотидів у жовчі через 30 хв після початку інфузії на 52,2 % - з $0,23 \pm 0,03$ до $0,11$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ $\pm 0,02$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ (P<0,05). Наприкінці другої години після закінчення інфузії їх вміст зменшувався в жовчі на 65,2 % ($0,08$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ $\pm 0,01$ мкг·г⁻¹

печінки·хв⁻¹; P<0,01) (рис. 1,а).

За перші 15 хв інфузії fMLP у дозі 0,1 мкг/100 г (n=3) сумарний вміст аденілових нуклеотидів у жовчі і, відповідно, інтенсивність їх секреції зменшилася на 52,2 % - з $0,23 \pm 0,04$ до $0,11$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ $\pm 0,009$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ (P<0,05). У дозі 10,0 мкг/100 г fMLP (n=3) пригнічував секрецію аденілових нуклеотидів наприкінці третьої години дослідження на 35,7 % - з $0,14 \pm 0,01$ до $0,09$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ $\pm 0,006$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ (P<0,02) (див. рис. 1,б).

При дії верапамілу (50 мкг/100 г, n=7) сумарний вміст аденілових нуклеотидів жовчі прогресивно зменшувався впродовж дослідження, сягаючи максимального зниження на початку четвертої години після інфузії на 63,2% - з $0,19 \pm 0,02$ до $0,07$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ $\pm 0,003$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ (P<0,001) (див. рис. 1,а).

Через 45 хв після закінчення послідовної інфузії верапамілу (50 мкг/100 г) та норадреналіну (500 мкг/100 г) у розчині 90 ммоль/л CaCl₂ (n=6) сумарний вміст аденілових нуклеотидів у жовчі зменшувався з $0,16 \pm 0,01$ до $0,07$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ $\pm 0,01$ мкг·г⁻¹ печінки·хв⁻¹ або на 56,3% (P<0,01). Упродовж другої-третьої годин дослідження секреція аденілових нуклеотидів була меншою від вихідного рівня на 25,0-31,3% (див. рис. 2).

Таким чином, у наших дослідах норадреналін, fMLP і верапаміл зменшували вміст в жовчі аденілових нуклеотидів упродовж усього дослідження. Зміни концентрації аденілових нуклеотидів, і в першу чергу АТФ, у жовчі відображають напрямок метаболічних процесів у гепатоцитах [4]. Виходячи з того, що в забезпеченні внутрішньоклітинного вмісту АТФ задіяні значні метаболічні ресурси клітин, можна припустити, що норадреналін, fMLP і верапаміл як фізіологічно активні сполуки, які реалізують свою дію на гепатоцити, змінюючи концентрацію внутрішньоклітинного кальцію, пригнічують у клітинах печінки метаболічні процеси, котрі відповідають за енергетичне забезпечення жовчотворювальної функції.

Зменшення секреції аденілових нуклеотидів при дії норадреналіну та fMLP може бути пов'язано з пригніченням синтезу цих сполук у мітохондріях гепатоцитів. Відомо [3], що агоніст α -адренорецепторів фенілефрин зменшує на 50% вміст АДФ і аденілових нуклеотидів у клітинах печінки. Зниження секреції жовчі при дії норадреналіну (на 37 %) [6], fMLP (на 31,1 % у дозі 0,1 мкг/100 г і на 19,2 % у дозі 1,0 мкг/100 г) [11] та при послідовному введенні верапамілу та норадреналіну в розчині 90 ммоль/л CaCl_2 (на 54,6 %) [7], і зменшення секреції аденілових

нуклеотидів упродовж усього досліду при дії цих регуляторних сполук дозволяє зробити припущення, що пригнічення жовчоутворення відбувається на рівні метаболічних процесів, які відповідають за його енергетичне забезпечення. Разом з тим ми не можемо стверджувати про пряму залежність рівня жовчовиділення від секреції аденілових нуклеотидів - зміни вмісту аденілових нуклеотидів у жовчі не завжди відображають зміни рівня жовчоутворення.

Ефекти норадреналіну, трипептиду fMLP і верапамілу на жовчоутворення, які ми

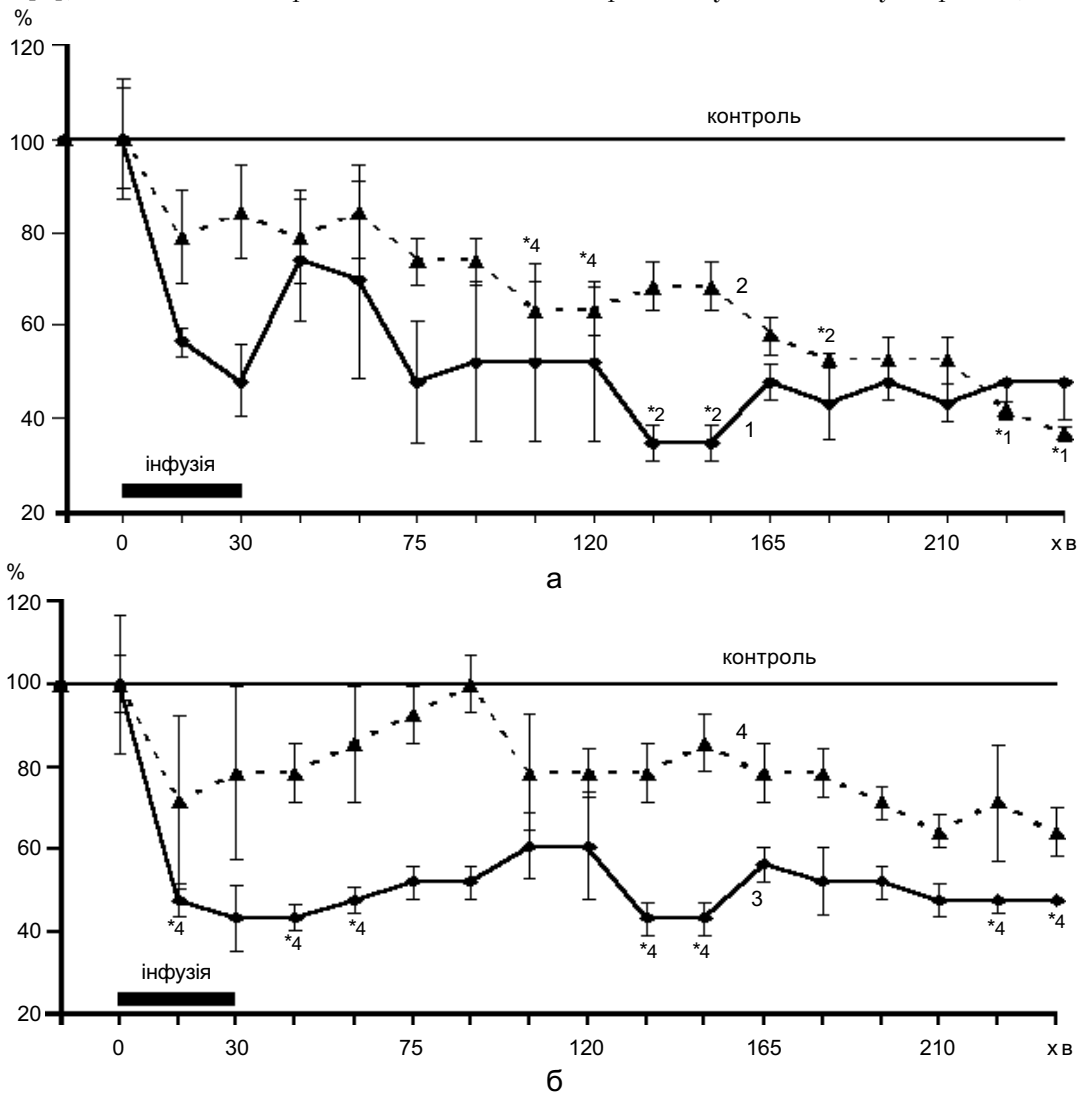


Рис. 1. Зміни секреції (% відносно вихідного рівня) компонентів аденілової системи при дії норадреналіну (1), верапамілу (2) (а), fMLP в дозах 0,1 і 10,0 мкг/100 г (3 і 4 відповідно) (б):

*1 $P < 0,001$; *2 $P < 0,01$; *3 $P < 0,02$; *4 $P < 0,05$.

спостерігали, можна пояснити також зміною функціональної активності транспортних систем гепатоцитів [6-8, 11]. Транспортні системи синусоїдальної і каналікулярної мембран гепатоцитів АТФ-залежні [15-18], що свідчить про роль АТФ у регуляції секреції жовчі на рівні транспортних систем. У наших дослідженнях секреція аденілових нуклеотидів зменшувалась як при дії норадреналіну, fMLP, верапамілу, так і при послідовній інфузії верапамілу та норадреналіну в розчині 90 ммоль/л CaCl₂, що вірогідно може свідчити про вплив на функціональну активність білків-транспортних каналікулярної мембрани (АТФ-зв'язувальних касетних білків тощо).

Багато типів клітин вивільнюють АТФ у відповідь на такі специфічні фізіологічні регуляторні сигнали, як гормони та нейромедіатори різної молекулярної природи, жовчні кислоти [17, 21]. АТФ є джерелом енергії для транспорту жовчних кислот білками молекулярної маси 110 - 170 кДа (екто-АТФаза, каналікулярний АТФ-залежний транспортер жовчних кислот (cBST)) [9]. З Ca²⁺, Mg²⁺-екто-АТФазою утворює комплекс специфічний переносник жовчних кислот

[2] і Ca²⁺,Mg²⁺-екто-АТФаза опосередковує АТФ-залежний, АДФ- та АМФ-гальмівний транспорт таурохолевої кислоти [14, 16, 22, 23]. Зменшення продукції АТФ призводить до зменшення АТФ-залежного транспорту жовчних кислот [9], на це вказує також той факт, що при зниженні вмісту АТФ транспорт жовчних кислот пригнічується і відновлюється при додаванні екзогенної АТФ [23]. Відповідно до отриманих нами результатів, досліджувані сполуки (норадреналін, верапаміл і fMLP), ймовірно, пригнічують енергомісткі процеси і впливають на активність Ca²⁺, Mg²⁺-екто-АТФази [6-8, 11]. Але згідно з Kast і співавт. [14] стимуляція каналікулярної секреції АТФ не може опосередкувати збільшення стимульованої секреції жовчних кислот. У цьому випадку можна припустити залучення до транспорту жовчних кислот інших систем, крім Ca²⁺, Mg²⁺-екто-АТФази, тобто ймовірно зміни вмісту АТФ у жовчі безпосередньо не впливають на секрецію жовчних кислот, або ж ця залежність має більш складний характер і реалізується на рівні численних внутрішньоклітинних процесів.

Зменшення вмісту аденілових нуклеотидів у жовчі при дії верапамілу впродовж

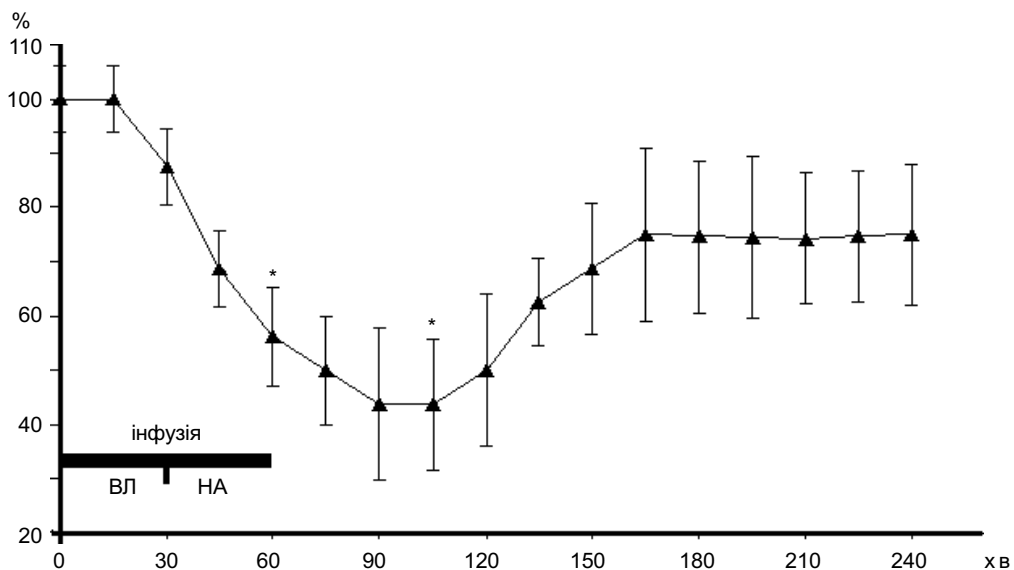


Рис. 2. Секреція компонентів аденілової системи при послідовній інфузії верапамілу (ВЛ) і норадреналіну (НА) в розчині 90 ммоль/л CaCl₂:* P<0,01.

3,5 год дослідю після закінчення інфузії дозволяє припустити, що блокатор кальцієвих каналів пригнічує утворення та вихід до жовчних каналікул аденілових нуклеотидів внаслідок дії на метаболічні процеси в клітинах печінки. Крім того, відомо, що каналним білком, який забезпечує вихід АТФ із клітини, є Р-глікопротеїн [14, 21, 24]. Вивільнення АТФ, опосередковане Р-глікопротеїном, пригнічується верапамілом [20], тобто зменшення вмісту аденілових нуклеотидів при дії верапамілу, можливо, крім інгібування енергетичного обміну, також вказує на блокаду Р-глікопротеїну.

Вивільнений гепатоцитами АТФ стимулює пуринергічні рецептори клітин печінки P_{2U} і P_{2Y} . Крім того, існує АДФ-чутливий тип P_2 -пуринергічного рецептора. За нормальних умов концентрація аденілових нуклеотидів в жовчі достатня для того, щоб активувати пуринорецептори гепатоцитів і холангіоцитів [21, 24]. Стимуляція будь-якого з цих рецепторів збільшує концентрацію внутрішньоклітинного Ca^{2+} через його вивільнення з інозитолтрифосфат-чутливих депо [17] і, як наслідок, відбувається пригнічення жовчоутворення [10]. Отже, можна припустити, що АТФ та інші аденілові нуклеотиди жовчі можуть здійснювати регуляцію секреторної активності гепатоцитів за принципом зворотного зв'язку. Однак спостережуване нами в експерименті зменшення як швидкості секреції жовчі, так і вмісту в ній аденілових нуклеотидів не вказує на можливість зазначеного регуляторного зв'язку. Таким чином, виходячи з результатів наших досліджень і даних літератури можна припустити, що опосередкованої дії досліджуваних нами речовин на жовчовиділення через зміни вмісту в жовчі АТФ та інших аденілових нуклеотидів не відбувається.

Отже, отримані нами результати дозволяють вважати, що норадреналін, регуляторний трипептид бактеріального походження fMLP та блокатор кальцієвих каналів верапаміл, тобто фізіологічно активні речовини, які діють через внутрішньоклітинний кальцій,

регулюють жовчоутворення на рівні енергетичного забезпечення печінки.

**S.V. Tukaev, S.P. Veselsky,
E.N. Reshetnik, P.S. Lyashchenko**

THE ACTION OF $[Ca^{2+}]$ REGULATING AGENTS ON THE BILIARY SECRETION OF ADENYL NUCLEOTIDES

Many types of cells release ATP under the action of specific physiological signals. It is known that the ATP and other adenylnucleotides is involved in the regulation of bile secretion too. The aim of our experiments was to determinate the influence of noradrenaline, fMLP and verapamile on the biliary secretion of adenylnucleotides in bile-fistula rats. The biliary secretion of adenylnucleotides was decreased under the influence of noradrenaline, fMLP (in doses 0,1 mkg/(100 g*30 min) and 10,0 mkg/(100 g*30 min)), verapamile and successive intraportal infusion of verapamile and noradrenaline (in 90 mM/1 $CaCl_2$ solution). It seems to be possible that noradrenaline, fMLP and verapamile regulate bile secretion on the level of energetic exchange.

*Research Institute of Physiology
of Taras Shevchenko Kyiv National University,
Kiev, Ukraine*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Авдонин П.В., Ткачук В.А. Рецепторы и внутриклеточный кальций. – М.: Наука, 1994. – 288 с.
2. Масюк А.И. Молекулярная физиология образования желчи // Вестн. Рос. АМН. – 1996. – № 1. – С. 17–21.
3. Орлов С.Н., Покудина Н.И., Гулак П.В. Транспорт кальция в гепатоцитах: механизмы и их регуляция. – В кн.: Гепатоцит: Функционально-метаболические свойства -М.: Медицина, 1985 – С. 192-212.
4. Саратиков А.С., Скакун Н.П. Желчеобразование и желчегонные средства – Томск: Изд-во томск. ун-та, 1991 –260 с.
5. Сафронова М.Н., Гусев Н.Б., Матвеева Л.Н., Фейгина М.М. Природные азотсодержащие соединения. Низкомолекулярные азотсодержащие соединения. –В кн.: Практикум по биохимии – М.: Изд-во моск. ун-та, 1989 –С. 183-187.
6. Тукаев С.В., Весельський С.П., Масюк А.І. Секреторна функція печінки при дії норадреналіну // Вісн. Київ. ун-ту. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 1998. – Вип. 3. – С. 22–24.

7. Тукаєв С.В., Масюк А.І. Порівняльне дослідження дії верапамілу і фентоламіну на секрецію жовчі у щурів // Там само. – С. 25-27.
8. Тукаєв С.В., Решетнік Є.М., Весельський С.П., Лященко П.С. Вплив блокатора кальцієвих каналів верапамілу на секрецію жовчі –В кн.: Актуал. проблеми гастроентерології – К., 2001 – С. 52.
9. Bouscarel B., Kroll S.D., Fromm H. Signal transduction and hepatocellular bile acid transport: cross talk between bile acids and second messengers // Gastroenterology. – 1999. – **117**, № 2 – P. 433-452.
10. Boyer J.L., Nathanson M.H. Bile formation // Schiff's diseases of the liver / Ed. E.R. Schiff., M.F. Sorrell, W.C. Maddrey. – Philadelphia, 1999. – P. 119-146.
11. Dolgova E.N., Tukaev S.V., Veselsky S.P., Masyuk A.I. The effect of chemotactic peptide fMLP on the bile secretion // Гастрооблєтєнь. –2000. – № 1-2 – С. 30.
12. Frimmer M., Ziegler K. The transport of bile acids in liver cells // Biochemica et Biophysica Acta. – 1988. – **947**, № 17. – P. 75-99.
13. Kamiike W., Nakahara M., Nakao K. et al. Correlation between cellular ATP level and bile excretion in the rat liver // Transplantation. – 1985. – **39**, № 1. – P. 50-55.
14. Kast C., Stieger B., Winterhalter K.H., Meier P.J. Hepatocellular transport of bile acids. Evidence for distinct subcellular localizations of electrogenic and ATP-dependent taurocholate transport in rat hepatocytes // J. Biol. Chem. – 1994. – **269**, № 7. – P. 5179-5186.
15. Meier P.J. Molecular mechanisms of hepatic bile salt transport from sinusoidal blood into bile // Amer. J. Physiol. (Gastrointest. Liver Physiol. 32). – 1995. – **269**, № 6, part 1. – P. G801-G812.
16. Muller M., Jansen P.L.M. The secretory function of the liver: new aspects of hepatobiliary transport // J. Hepatology. – 1998. – **28**. – P. 344-354.
17. Nathanson M.H., Burgstahler A.D., Masyuk A., LaRusso N.F. Stimulation of ATP secretion in the liver by therapeutic bile acids // Biochem. J. – 2001 – **358**. – P. 1-5.
18. Paumgartner G. Bile formation and cholestasis: molecular mechanisms and clinical implications // Progress in hepato-pharmacology. –1997. –**2**. –P. 9-17.
19. Pozzan T., Rizzuto R., Volpe P., Meldolesi J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores // Physiol. Rev. –1994. – **74**, № 3. – P. 595-636.
20. Roman R.M., Schwiebert E.M., Feranchak A.P. et al. Hepatocellular ATP-binding cassette (ABC) proteins modulate volume-sensitive ATP release // Hepatology. –1997. – 26, № 4, part 2, Suppl. – P. 194A.
21. Roman R.M., Fitz J.G. Emerging roles of purinergic signaling in gastrointestinal epithelial secretion and hepatobiliary function // Gastroenterology – 1999. –**116**, № 4 –P. 964-979.
22. Sippel C.J., Suchy F.J., Ananthanarayanan M., Perlmutter D.H. The rat liver ecto-ATPase is also a canalicular bile acid transport protein // J. Biol. Chem. –1993. –**268**, № 3. –P. 2083-2091.
23. Sippel C.J., McCollum M. J., Perlmutter D.H. Bile acid transport by the rat liver canalicular bile acid transport/ecto-ATPase protein is dependent on ATP but not on its own ecto-ATPase activity // Ibid. – 1994. –**269**, № 4. – P. 2820--2826.
24. Zsembery A., Thalhammer T., Graf J. Bile formation: a concerted action of membrane transporters in hepatocytes and cholangiocytes // News Physiol. Sci – 2000. – **15**, February –P. 6-11.

*Наук.-досл.ін-т фізіології ім. акад. Петра
Богача Київ. нац. ун-ту ім. Тараса Шевченка*

*Матеріал надійшов до
редакції 24.10.2001*