

Роль μ -опиоидных рецепторов в регуляции желчеотделительной функции печени

Медведев М.А., Рудин И.В., Гараева А.Ф.

The role of μ -opioid receptors in the regulation of hepatic secretory function

Medvedev M.A., Rudin I.V., Garayeva A.F.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Медведев М.А., Рудин И.В., Гараева А.Ф.

В острых опытах на белых крысах изучено влияние периферического и центрального введения DAGO (агонист μ -опиоидных рецепторов) на скорость секреции и состав секретируемой желчи при интактной и денервированной печени. Показано, что DAGO в значительной степени изменяет состав желчи при обоих способах введения, а также, что эффекты периферической и центральной стимуляции опиоидных рецепторов DAGO на желчеотделение носят разнонаправленный характер. Наличие интактной иннервации печени является необходимым условием проявления эффекта центральной стимуляции опиоидных рецепторов DAGO на желчеотделение.

Ключевые слова: опиоидные пептиды, DAGO, налоксон, секреция желчи.

Influence of intraperitoneal and intracerebroventricular DAGO (μ -opioid agonist) on the bile secretion and composition was studied in white rats having intact and denervated liver. DAGO was demonstrated to alter bile composition significantly both intraperitoneally and intracerebroventricularly and these effects were opposite. Intact liver innervation is a necessary condition for intracerebroventricular DAGO to have its effect on bile secretion.

Key words: opioid peptides, DAGO, naloxone, secretion of bile.

УДК 612.357:612.82

Введение

Опиоидные пептиды – группа нейропептидов, которая является обширным и в последние годы активно изучаемым классом регуляторных пептидов. Они участвуют в регуляции функций нервной, иммунной, сердечно-сосудистой, эндокринной, выделительной, дыхательной систем, являются компонентом антиноцицептивной системы, регулируют различные виды обмена веществ, функций и поведения [4, 11, 13, 18, 22, 23, 25—27]. Широко представлены как в нервной системе, так и непосредственно в желудочно-кишечном тракте [12], опиоидные пептиды также оказывают протективное действие на слизистую желудка [7], регулируют секреторную функцию поджелудочной железы [17], изменяют интенсивность метаболизма в печени [3] и оказывают гепатопротекторный эффект при острых повреждениях органа [28].

В настоящее время выделяют несколько типов опиоидных рецепторов, в частности, μ -, δ -, κ - и орфа-

ниновые [20]. Их распространение в различных органах и тканях и функциональная значимость активно изучаются [15, 24]. Показано, что эффекты опиоидных пептидов зависят не только от типа опиоидных рецепторов, с которым они взаимодействуют, но и от локализации рецептора [8].

Ранее было установлено, что синтетические аналоги опиоидных пептидов, в частности даларгин, влияют на секрецию в желчь детерминант желчотока — желчных кислот и иона натрия [9]. Поскольку даларгин является неселективным агонистом как δ -, так и μ -опиоидных рецепторов, представлялось необходимым выяснить роль μ -опиоидных рецепторов в проявлении эффекта опиоидных пептидов на желчеотделительную функцию печени.

Материал и методы

Эксперименты проводились в остром опыте на 200 беспородных белых крысах-самцах массой 180—

220 г. Животные включались в эксперимент после 12-часового голодания в условиях свободного доступа к воде.

Под нембуталовым наркозом желчь для исследования собиралась путем канюлирования общего желчного протока. Сбор желчи осуществлялся с интервалом в 1 ч в течение 3 ч от начала введения опиоидных пептидов. Периферическое введение агониста μ -опиоидных рецепторов DAGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁵-ol]-Enkephalin) («Вектор Биопродукт», Россия) и антагониста налоксона гидрохлорид (ИТЦ «Солярис», Россия) осуществлялось внутривентриально в дозе 10 мкг и 1 мг на 1 кг массы тела соответственно.

В экспериментах с центральным введением DAGO использовали стереотаксический метод с применением аппарата СЭЖ-5 (НПО «Конструктор», Украина). Введение канюли из нержавеющей стали осуществляли в правый латеральный желудочек мозга по следующим координатам от брегмы: AP – 1,5 мм, L — +2 мм, V – 3,5 мм [21]. Верификация положения канюли осуществлялась введением раствора метиленового синего по окончании эксперимента с последующим вскрытием полости латерального желудочка. DAGO применяли в дозе 10 мкг на 1 животное, налоксон в дозе 200 мкг на 1 животное. Объем раствора составлял 8 мкл, при совместном применении препаратов вводили по 4 мкл каждого.

Группам контрольных животных вводили подогретый до 37 °С физиологический раствор натрия хлорида в соответствующих количествах.

Денервацию печени проводили путем аппликации раствора фенола на поверхность сосудов печени, общего желчного протока и печеночных связок по W.W. Lautt с соавт. [16]. DAGO и налоксон вводили через 30 мин после аппликации фенола. Контрольные и экспериментальные группы содержали по 20 животных. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Определяли количество секретированной желчи в каждом временном промежутке, а также содержание в желчи суммарных желчных кислот и холестерина по реакции Златкиса—Зака в модификации В.П. Мирошниченко с соавт. [6], билирубина по реакции Ендрасика—Клеггорна—Грофа в модификации М.А. Акин-

чиц [1], фосфолипидов по реакции Фиске—Суббарроу [5] после экстракции их смесью Блора по Я.В. Ганиткевич [2].

Результаты исследований обрабатывали с использованием критерия Стьюдента для независимых выборок. Рассчитывали среднее M и стандартное отклонение m . Нормальность распределения проверялась с помощью одновыборочного критерия Колмогорова—Смирнова, различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Периферическое введение DAGO вызывало достоверное повышение скорости желчеотока на протяжении первого часа на 25,0% ($p < 0,01$), второго — на 23,0% ($p < 0,005$) и третьего часа эксперимента — на 15,8% ($p < 0,02$) (рис. 1). Предварительное периферическое введение налоксона не только не отменяло эффекта DAGO, но, наоборот, скорость желчеотока была достоверно выше, чем в контрольной группе на протяжении первого часа на 32,2% ($p < 0,001$), второго — на 32,3% ($p < 0,001$) и третьего часа эксперимента — на 21,0% ($p < 0,01$) (рис. 1). Секретция желчных кислот при периферическом введении DAGO достоверно не изменялась по отношению к контролю на протяжении первого и третьего часа и достоверно снижалась в течение второго часа на 24,0% ($p < 0,02$).

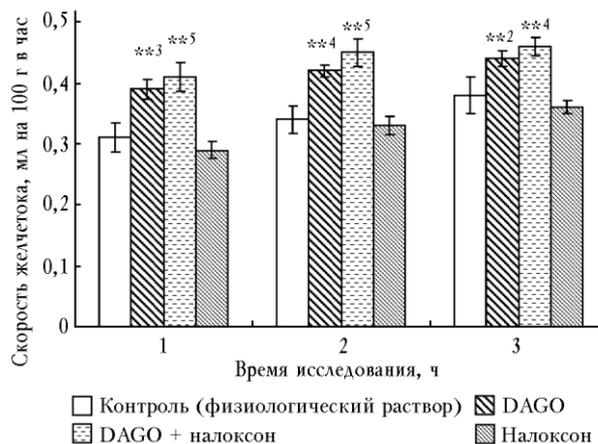


Рис. 1. Изменение скорости желчеотока у крыс под влиянием периферического введения DAGO, $M \pm m$. Здесь и на рис. 2: $n = 20$ во всех группах; ** — различия достоверны по отношению к соответствующему часу контроля: **1 — $p < 0,05$, **2 — $p < 0,02$, **3 — $p < 0,01$, **4 — $p < 0,005$, **5 — $p < 0,001$

Предварительное введение налоксона не изменяло этой тенденции. Секретция холестерина при перифе-

рическом введении DAGO достоверно повышалась на протяжении первого часа на 40,0% ($p < 0,001$), второго — на 34,6% ($p < 0,005$) и третьего часа — на 88,8% ($p < 0,001$). Предварительное введение налоксона устраняло эти изменения на протяжении 2 ч эксперимента, однако в течение 3 ч секреция холестерина повышалась на 50% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными значениями (рис. 2). Секреция фосфолипидов под влиянием периферического введения DAGO повышалась на протяжении всего эксперимента: в течение первого часа — на 47,48% ($p < 0,005$), второго — на 48,84% ($p < 0,001$) и третьего часа — на 59,38% ($p < 0,01$).

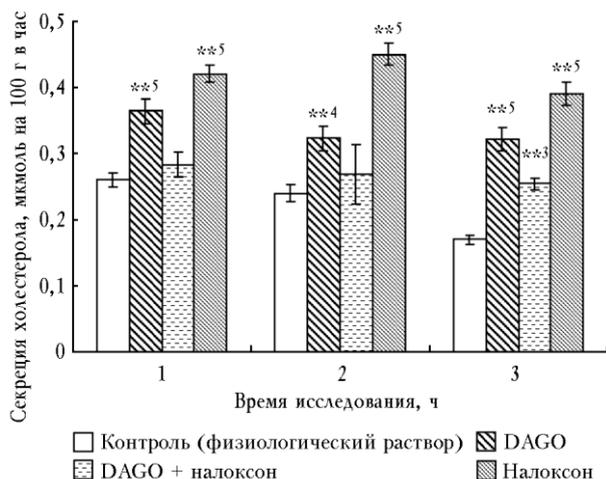


Рис. 2. Изменение секреции холестерина в желчь крыс под влиянием периферического введения DAGO, $M \pm m$

Предварительное введение налоксона устраняло повышение секреции фосфолипидов в течение первого и второго часа, а на протяжении третьего часа секреция была достоверно выше контроля на 36,85% ($p < 0,005$). Секреция билирубина под влиянием DAGO не изменялась, применение DAGO на фоне предварительного введения налоксона приводило к увеличению секреции билирубина по сравнению с контролем в течение первого часа на 35,41% ($p < 0,02$), второго часа — на 22,33% ($p < 0,05$) и третьего часа — на 30,77% ($p < 0,05$). Применение налоксона само по себе не приводило к достоверным изменениям секреции билирубина в течение первого и второго часа, и только на протяжении третьего часа эксперимента секреция снижалась на 24,7% ($p < 0,05$).

Скорость желчетока при центральном введении DAGO достоверно от контрольных значений не отличалась. Секреция желчных кислот под влиянием центрального введения DAGO снижалась в течение 3 ч эксперимента: в первый час — на 32,1% ($p < 0,001$), во второй час — на 39,1% ($p < 0,001$) и в третий час — на 47,3% ($p < 0,001$). Предварительное введение налоксона полностью устраняло этот эффект DAGO на секрецию желчных кислот в течение первого и второго часа, и секреция была даже несколько выше контроля в течение третьего часа ($p < 0,05$). Центральное введение налоксона само по себе приводило к повышению секреции желчных кислот в течение первого, второго и третьего часа исследования на 58,9% ($p < 0,001$), 36,4% ($p < 0,001$) и 16,5% ($p < 0,05$) соответственно (рис. 3). Секреция холестерина под влиянием центрального введения DAGO изменялась сходным образом: на протяжении 3 ч эксперимента происходило

снижение секреции на 44,0% ($p < 0,001$), 41,0% ($p < 0,001$) и 46% ($p < 0,001$) в течение первого, второго и третьего часа соответственно. Предварительное введение налоксона устраняло это снижение на протяжении первого и второго часа исследования, в течение третьего часа величина секреции была выше значений контрольной группы ($p < 0,005$). Применение налоксона само по себе приводило к повышению секреции холестерина на протяжении первого часа на 35,0% ($p < 0,001$), второго часа — на 25,8% ($p < 0,001$) и третьего часа — на 24,2% ($p < 0,001$) (рис. 4). Секреция фосфолипидов под влиянием центрального введения DAGO снижалась в течение первого часа в 2 раза ($p < 0,001$), второго часа — в 1,5 ($p < 0,001$) и третьего часа — в 1,75 раза ($p < 0,001$). Предварительное введение налоксона полностью устраняло эти изменения. Секреция билирубина снижалась на протяжении всего эксперимента на 12,0% ($p < 0,05$), 10,8% ($p < 0,05$) и 21,6% ($p < 0,001$) в течение первого, второго и третьего часа соответственно. Предварительное введение налоксона полностью устраняло эти изменения к первому и второму часу, а на протяжении третьего часа исследования секреция была выше контроля ($p < 0,01$).

Денервация печени не приводила к изменению скорости желчетока или секреции в желчь изучаемых компонентов в контрольной группе, однако устраняла увеличение скорости желчетока, вызываемое изолированным внутрижелудочковым введением налоксона

в течение второго и третьего часа исследования ($p < 0,05$). Денервация полностью устраняла снижение секреции желчных кислот, вызываемое центральным

введением DAGO в течение первого и второго часа исследования ($p < 0,02$ и $p < 0,001$ соответственно), в течение третьего часа снижение секреции устранялось

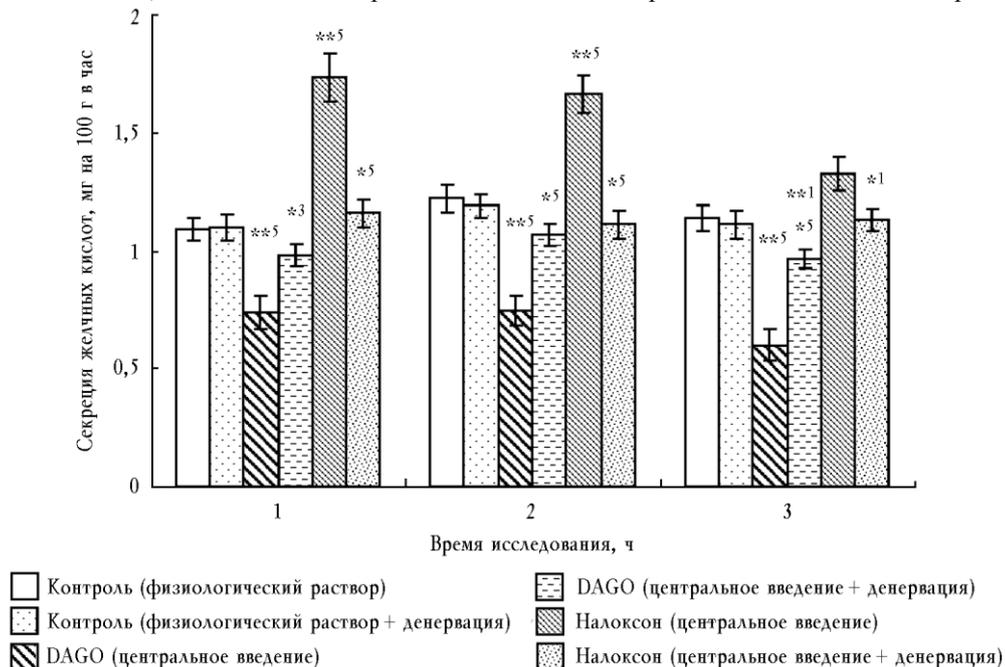


Рис. 3. Изменение секреции желчных кислот у крыс под влиянием внутрижелудочкового введения DAGO и налоксона при интактной и денервированной печени, $M \pm m$. ** — различия достоверны по отношению к соответствующему часу контроля: **¹ — $p < 0,05$, **⁵ — $p < 0,001$; * — различия достоверны по отношению к соответствующему часу без денервации: *¹ — $p < 0,05$, *³ — $p < 0,02$, *⁵ — $p < 0,001$.
Здесь и на рис. 4: $n = 20$ во всех группах

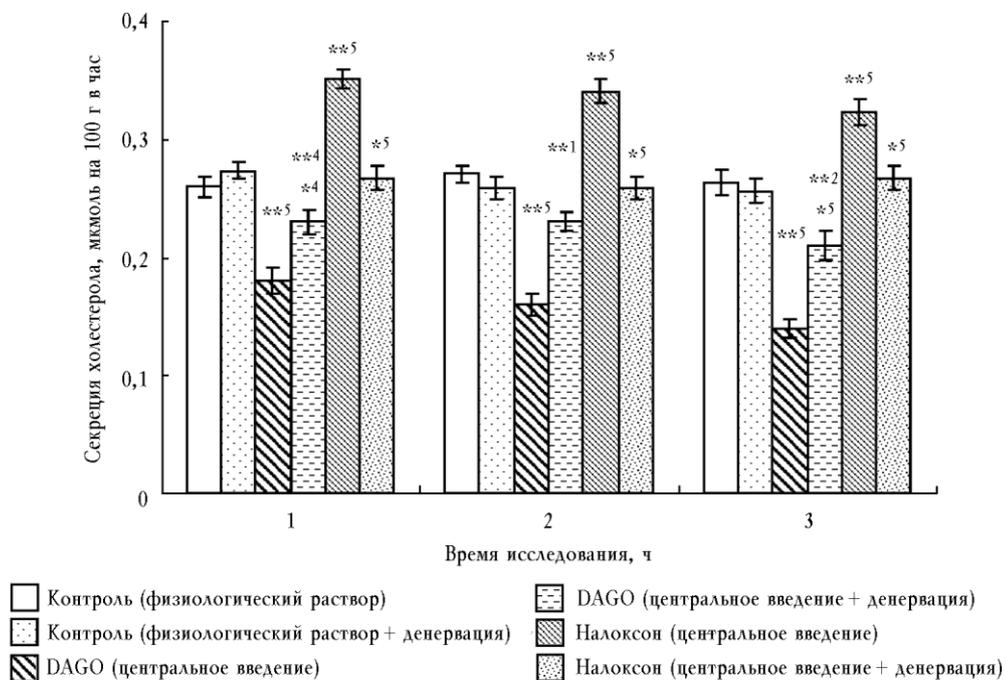


Рис. 4. Изменение секреции холестерина у крыс под влиянием внутривенного введения DAGO и налоксона при интактной и денервированной печени, $M \pm m$. ** — различия достоверны по отношению к соответствующему часу контроля: **¹ — $p < 0,05$, **² — $p < 0,01$, **⁴ — $p < 0,005$, **⁵ — $p < 0,001$; * — различия достоверны по отношению к соответствующему часу без денервации: *⁴ — $p < 0,005$, *⁵ — $p < 0,001$

денервацией частично, и показатели секреции компонента отличались как от контрольных ($p < 0,05$), так и от группы с центральным введением DAGO ($p < 0,001$). Эффект налоксона на повышение секреции желчных кислот устранялся денервацией полностью ($p < 0,001$) (рис. 3). Снижение секреции холестерина, вызываемое центральным введением DAGO, частично устранялось денервацией на протяжении 3 ч эксперимента, и отличия были достоверны как по отношению к контролю ($p < 0,005$; $p < 0,05$ и $p < 0,01$ в течение первого, второго и третьего часа соответственно), так и по отношению к группе с центральным введением DAGO ($p < 0,005$; $p < 0,001$ и $p < 0,001$ в течение первого, второго и третьего часа соответственно). Эффект налоксона на повышение секреции холестерина денервацией устранялся полностью ($p < 0,001$) на протяжении всего времени эксперимента (рис. 4). Показатели секреции фосфолипидов, сниженные центральным введением DAGO, при денервации печени повышались в течение первого часа, отличаясь при этом как от контроля ($p < 0,05$), так и от группы с введением DAGO ($p < 0,05$). В течение второго и третьего часа денервация полностью устраняла эффект центрального введения DAGO на секрецию в желчь фосфолипидов. Денервация печени устраняла снижение секреции билирубина, вызываемое центральным введением DAGO в течение первого и третьего часа ($p < 0,05$), и не оказывала влияния на секрецию компонента на протяжении второго часа эксперимента. Повышение секреции билирубина, вызываемое налоксоном, в течение третьего часа исследования полностью устранялось денервацией печени ($p < 0,005$).

Выводы

Полученные данные позволяют сделать вывод, что μ -опиоидные рецепторы играют важную роль в проявлении регуляторных эффектов опиоидергической системы на желчеотделительную функцию печени. Как периферические, так и центральные μ -опиоидные рецепторы участвуют в регуляции скорости секреции и состава секреторируемой желчи. В настоящей работе показано, что μ -опиоидные рецепторы участвуют в регуляции секреции детерминант желче-

тока: желчных кислот, желчных липидов — холестерина и фосфолипидов, пигментов — билирубина, что означает их способность опосредовать эффект эндогенных опиоидных пептидов на активность ферментных и транспортных систем гепатоцита.

Повышение секреции холестерина и желчных кислот при блокаде опиоидных рецепторов налоксоном при его центральном введении свидетельствует о том, что секреция этих компонентов находится под тоническим контролем центрального отдела опиоидергической регуляции, который снижает секрецию в составе желчи указанных компонентов.

Частичное устранение эффекта центральной стимуляции μ -опиоидных рецепторов на скорость секреции и состав желчи при денервации печени свидетельствует о значимой роли респираторной депрессии, вызываемой опиоидами при центральном введении [19, 20], которая проявляется ацидозом, гипоксией и гиперкапнией и в конечном итоге приводит к угнетению белкового синтеза в органах. При этом достоверное снижение секреторного ответа при денервации свидетельствует о необходимости сохранения интактной иннервации печени для проявления эффекта опиоидов на желчеотделительную функцию печени при центральном их введении. По данным N.V. Bergasa [10], существуют нервные опиоидергические пути, которые могут опосредовать эффекты центрального введения опиоидов на желчеотделение. В данной работе показано, что сохранение указанных путей является важным условием для проявления эффекта центральной стимуляции μ -опиоидных рецепторов на скорость желчотока и состав секреторируемой желчи. Разнонаправленность эффектов стимуляции центральных и периферических μ -опиоидных рецепторов по отношению к желчеотделительной функции печени является подтверждением гипотезы об антагонистических взаимоотношениях периферических и центральных опиоидных рецепторов в реализации опиоидергической регуляции функций, выдвинутой ранее В.М. Полонским с соавт. [8], по отношению к секреторной функции желудка. По-видимому, этот механизм является общим для регуляции функций желудочно-кишечного тракта опиоидными пептидами.

Литература

1. Акинчиц М.А., Павловская Н.А. Модификация метода определения билирубина в сыворотке крови. // Лаб. дело. 1988. № 12. С. 727—730.
2. Ганиткевич Я.В., Карбач Я.И. Исследование желчи: биохимические и биофизические методы. Киев: Наукова думка, 1985.
3. Золоев Г.К., Боброва И.В., Хабарова Н.И., Абиссова Н.А. Некоторые механизмы участия опиоидных пептидов в регуляции углеводного обмена // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1992. Т. 113. № 3. С. 257—259.
4. Мартынова Е.Р., Медведев О.С. Влияние опиоидных пептидов на регионарную гемодинамику у бодрствующих крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1988. Т. 106. № 8. С. 136—139.
5. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987.
6. Мирошниченко В.П., Громашевская Л.Л., Касаткина М.И., Козачек Г.А. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи // Лаб. дело. 1978. № 3. С. 149—153.
7. Полонский В.М., Коробов Н.В. Противоязвенное действие и периферическая опиоидная активность продуктов деградации даларгина // Бюл. ВКНЦ АМН СССР. 1986. Т. 9. № 2. С. 83—86.
8. Полонский В.М., Ярыгин К.Н., Кривошеев О.Г. и др. Место приложения (центральное или периферическое) противоязвенного действия синтетического аналога эндогенных опиоидов даларгина в экспериментальной модели цистеаминовых дуоденальных язв у крыс // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1987. Т. 103. № 4. С. 433—434.
9. Рудин И.В., Медведев М.А. Опиоидные пептиды модулируют секрецию основных детерминант желчного пузыря // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1997. Т. 123. № 5. С. 498—500.
10. Bergasa N.V., Zhou J, Ravi J, Shi Q. The opioid peptide analog D-Ala2-Met-enkephalinamide decreases bile flow by a central mechanism // Peptides. 1999. V. 20. № 8. P. 979—986.
11. Borlongan C.V., Wang Y., Su T.P. Delta opioid peptide (D-Ala 2, D-Leu 5) enkephalin: linking hibernation and neuroprotection // Front. Biosci. 2004. № 9. P. 3392—3398.
12. Chaturvedi K. Opioid peptides, opioid receptors and mechanism of down regulation // Indian. J. Expt. Biol. 2003. V. 41. № 1. P. 5—13.
13. Eager K.R., Robinson B.J., Galletly D.C., Miller J.H. Endogenous opioid modulation of hypercapnic-stimulated respiration in the rat // Respir. Physiol. 1994. V. 96. № 1. P. 13—24.
14. Hashiguchi Y., Molina P.E., Dorton S. et al. Central opiate mu-receptor-mediated suppression of tissue protein synthesis // Am. J. Physiol. 1997. V. 273. № 3. Pt. 2. P. R920—R927.
15. Janecka A., Fichna J., Janecki T. Opioid receptors and their ligands // Curr. Top. Med. Chem. 2004. № 1. P. 1—17.
16. Lauth W.W., Carroll A.M. Evaluation of topical phenol as a means of producing autonomic denervation of the liver // Can. J. Physiol. Pharmacol. 1984. V. 62. № 7. P. 849—853.
17. Li J.P., Lee K.Y., Chang Ta-Min, Chey W.Y. MEK inhibits secretin release and pancreatic secretion: roles of secretin-releasing peptide and somatostatin // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 2001. V. 280. № 5. P. G890—G896.
18. Osipov M.H., Lai J., King T. et al. Antinociceptive and nociceptive actions of opioids // J. Neurobiol. 2004. V. 61. № 1. P. 126—148.
19. Pasternak G.W. Review: pharmacological mechanisms of opioid analgesics // Clin. Neuropharmacol. 1993. V. 16. P. 1—18.
20. Pasternak G.W. Multiple opiate receptors: deja vu all over again // Neuropharmacology. 2004. V. 47. Suppl. 1. P. 312—323.
21. Paxinos G., Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. N.Y., 1982.
22. Sacerdote P., Limiroli E., Gaspari L. Experimental evidence for immunomodulatory effects of opioids // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 521. P. 106—116.
23. Smith E.M. Opioid peptides in immune cells // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 521. P. 51—68.
24. Snyder S.H. Opiate receptors and beyond: 30 years of neural signaling research // Neuropharmacology. 2004. V. 47. Suppl. 1. P. 274—285.
25. Stein C. Opioid receptors on peripheral sensory neurons // Adv. Exp. Med. Biol. 2003. V. 521. P. 69—76.
26. Von Zastrow M. Opioid receptor regulation // Neuromolecular Med. 2004. V. 5. № 1. P. 51—58.
27. Wood J.D., Galligan J.J. Function of opioids in the enteric nervous system // Neurogastroenterol. Motil. 2004. V. 16. № 2. P. 17—28.
28. Yamanouchi K., Yanaga K., Okudaira S. et al. [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin (DADLE) protects liver against ischemia-reperfusion injury in the rat // J. Surg. Res. 2003. V. 114. № 1. P. 72—77.

Поступила в редакцию 12.03.2006 г.