

Роль опиоидных пептидов в регуляции секретинстимулированной секреции желчи

Медведев М.А., Рудин И.В.

The role of opioid peptides in the regulation of secretin-stimulated bile secretion

Medvedev M.A., Roudin I.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Медведев М.А., Рудин И.В.

В острых опытах на белых крысах изучено влияние внутрибрюшинного введения агониста δ - и μ -опиоидных рецепторов даларгина, δ -опиоидных рецепторов DADLE, μ -опиоидных рецепторов DAGO и κ -опиоидных рецепторов U50488 на стимулированное секретинном желчеотделение. Показано, что в различной степени все изученные препараты угнетают желчеток, стимулированный секретинном, по показателям скорости желчеотделения и секреции в составе желчных кислот, холестерина, фосфолипидов и билирубина. Высказывается предположение, что опиоидергическая система оказывает на желчеотделение разнонаправленный эффект в зависимости от исходного уровня физиологической секреции.

Ключевые слова: секретин, опиоидные пептиды, секреция желчи.

Influence of intraperitoneal dalargin (δ - and μ -opioid agonist), DADLE (δ -opioid agonist), DAGO (μ -opioid agonist) and U50488 (κ -opioid agonist) on bile secretion which is stimulated by secretin was studied in sharp experiments on white rats. All opioids studied is demonstrated to suppress secretory response of liver upon secretin in different extent. We suppose that opioidergic regulation system has different effect on bile secretion in dependence of baseline level of physiologic secretion.

Key words: secretin, opioid peptides, bile secretion.

УДК 612.357:577.15

Введение

Секретин относится к группе гастроинтестинальных гормонов и вызывает стимуляцию секреции поджелудочной железы [10, 15, 21, 25] и желчеотделения [13, 24, 26]. Широко распространенные в желудочно-кишечном тракте опиоидные пептиды [12] и их синтетические аналоги обладают угнетающим действием на секрецию желудка [7] и поджелудочной железы [18]. Секретин является гастроинтестинальным гормоном, стимулирующим холерез не только за счет холатонезависимой фракции и увеличения секреции в составе желчи бикарбоната [10, 15, 21, 25], но и за счет прямого действия на гепатоциты и увеличения секреции желчных кислот [14, 22, 24].

Показано, что опиоидные пептиды препятствуют проявлению стимулирующего эффекта секретина на поджелудочную железу [18]. Ранее было показано [8, 9], что синтетические аналоги опиоидных пептидов иг-

рают важную роль в регуляции желчеотделения в условиях физиологического эксперимента. Цель настоящей работы — установление регуляторных взаимоотношений секретина как представителя группы гастроинтестинальных гормонов с системой опиоидергической регуляции в проявлении секреторного ответа печени.

Материал и методы

Изучение роли системы опиоидных нейропептидов в регуляции секретинстимулированного желчеобразования проводилось в остром эксперименте на 140 беспородных крысах-самцах массой 180—220 г. Животные включались в эксперимент после 12-часового голодания в условиях свободного доступа к воде. Желчь для исследования собиралась после канюлирования общего желчного протока под нембуталовым наркозом (50 мг на 1 кг массы тела). Сбор желчи для исследования осуществлялся с интервалом в 1 ч в те-

чение 3 ч от момента введения аналогов опиоидных пептидов.

Использовали следующие препараты:

1. Даларгин — смешанный агонист δ - и μ -опиоидных рецепторов, официальный препарат «Даларгин лиофилизированный», Туг-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu-Arg, — в дозе 10 мкг на 1 кг массы тела.

2. DADLE («Вектор БиоПродукт», г. Новосибирск) — селективный агонист δ -опиоидных рецепторов, [D-Ala²,D-Leu⁵]-Enkephalin, — в дозе 10 мкг на 1 кг массы тела.

3. DAGO («Вектор БиоПродукт», г. Новосибирск) — селективный агонист μ -опиоидных рецепторов, [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly⁵-ol]-Enkephalin, — в дозе 10 мкг на 1 кг массы тела.

4. U50488H («UpJohn») — селективный агонист κ -опиоидных рецепторов, [trans-(+/-)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)cyclohexyl]benzeneacetamide] гидрохлорид, — в дозе 1 мг на 1 кг массы тела.

5. Секретин («Sigma-Aldrich»), His-Ser-Asp-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Glu-Leu-Ser-Arg-Leu-Arg-Asp-Ser-Ala-Arg-Leu-Gln-Arg-Leu-Leu-Gln-Gly-Leu-Val-NH₂, — инфузия осуществлялась в дозе 0,15 мкг на 1 кг массы тела в час [3].

Синтетические аналоги опиоидных пептидов вводились в стерильном физиологическом растворе внутривенно. Инфузия секретина в физиологическом растворе осуществлялась внутривенно с помощью инфузионного насоса. Опиоидные пептиды вводили через 10 мин от начала инфузии секретина. Сбор желчи начинали после введения аналогов опиоидных пептидов. Контрольную группу составляли эксперименты с внутривенной инфузией физиологического раствора. В экспериментах с введением опиоидных пептидов на фоне инфузии секретина контролем служила группа с инфузией секретина. Как контрольная, так и экспериментальные группы состояли из 20 животных. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществлялись в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Определяли количество секретированной желчи в каждом временном промежутке, а также содержание в желчи желчных кислот и холестерина по реакции Златкиса—Зака в модификации В.П. Мирошниченко с со-

авт. [6], билирубина по реакции Ендрашика—Клегхорна—Грофа в модификации М.А. Акинчиц с соавт. [1], липидного фосфора по реакции Фиска—Саббароу [5] после экстракции фосфолипидов смесью Блора [2].

Результаты исследований обрабатывались с расчетом среднего значения M и стандартного отклонения m , сравнение групп осуществляли с использованием критерия Стьюдента. Проверка нормальности распределения проводилась с использованием одновыборочного критерия Колмогорова—Смирнова, различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Инфузия секретина приводила к увеличению скорости желчетока на протяжении 1-го ч исследования в 2 раза ($p < 0,001$), 2-го ч — на 79% ($p < 0,001$) и 3-го ч — на 73% ($p < 0,001$) (рис. 1). Секретия желчных кислот возрастала в течение 1-го ч в 2,5 раза ($p < 0,001$), 2-го ч — в 2,2 раза ($p < 0,001$) и 3-го ч — на 73,3% ($p < 0,01$) (рис. 2), что согласуется с данными, полученными другими авторами [14, 15, 17, 21, 22, 24], о холеретическом действии секретина. Секретия холестерина повышалась на протяжении 3 ч эксперимента: в течение 1-го ч в 2,2 раза ($p < 0,001$), 2-го ч — в 2,1 раза ($p < 0,001$), 3-го ч — на 87% ($p < 0,001$) (рис. 3). Сходным образом возрастала секретия фосфолипидов (рис. 4) и билирубина (рис. 5).

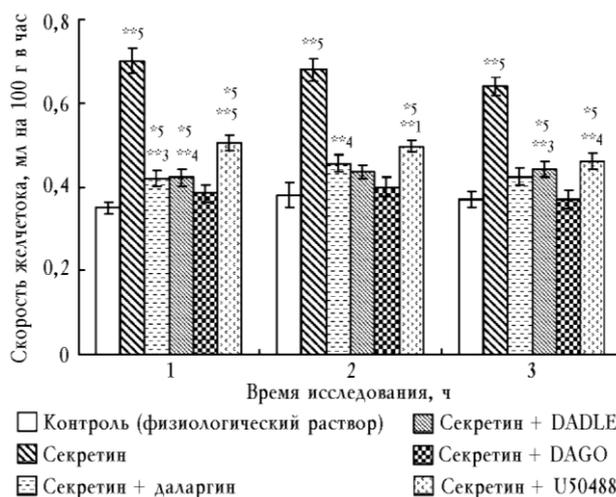
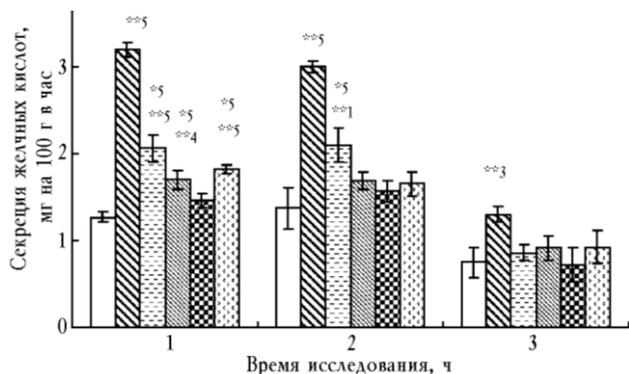


Рис. 1. Изменение скорости желчетока у крыс под влиянием секретина и синтетических аналогов опиоидных пептидов, $M \pm m$. Здесь и на рис. 2—5: * — различия достоверны по отношению к соответствующему часу группы с введением секретина: *¹ — $p < 0,05$, *² — $p < 0,02$, *³ — $p < 0,01$, *⁴ — $p < 0,005$, *⁵ — $p < 0,001$; ** — различия достоверны по отношению к соответствующему часу контроля:

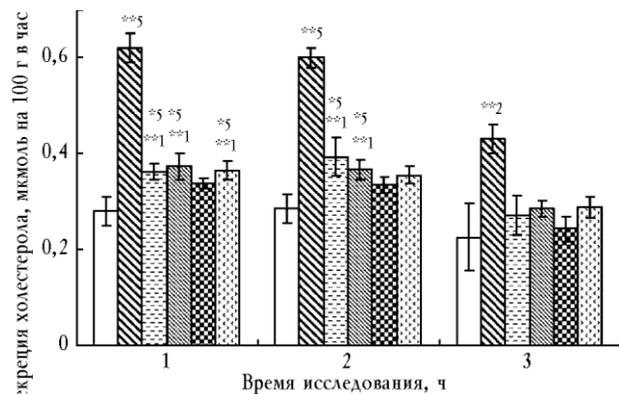
**1 — $p < 0,05$, **2 — $p < 0,02$, **3 — $p < 0,01$, **4 — $p < 0,005$, **5 — $p < 0,001$

Введение даларгина частично устраняло повышение скорости желчетока, вызванное инфузией секретина, на протяжении 1-го ($p < 0,001$) и 2-го ч ($p < 0,001$)



□ Контроль (физиологический раствор) ■ Секретин + DADLE
 ▨ Секретин ▩ Секретин + DAGO
 ▤ Секретин + даларгин ▥ Секретин + U50488

Рис. 2. Изменение секретии желчных кислот в желчь крыс под влиянием секретина и синтетических аналогов опиоидных пептидов, $M \pm m$



□ Контроль (физиологический раствор) ■ Секретин + DADLE
 ▨ Секретин ▩ Секретин + DAGO
 ▤ Секретин + даларгин ▥ Секретин + U50488

Рис. 3. Изменение секретии холестерина в желчь крыс под влиянием секретина и синтетических аналогов опиоидных пептидов, $M \pm m$



Рис. 4. Изменение секретии лецитина в желчь крыс под влиянием секретина и синтетических аналогов опиоидных пептидов, $M \pm m$



Рис. 5. Изменение секретии билирубина в желчь крыс под влиянием секретина и синтетических аналогов опиоидных пептидов, $M \pm m$

исследования, при этом показатели были выше контрольных значений на 20,0% ($p < 0,01$ и $p < 0,05$). В течение 3-го ч исследования даларгин полностью отменял повышение скорости желчетока, вызванное секретинном (рис. 1). Сходным образом под влиянием даларгина изменялась вызванная секретинном секретия ЖК (рис. 2) и холестерина (рис. 3). Секретия фосфолипидов, повышенная введением секретина, при введении даларгина снижалась в течение 1-го ч исследования ($p < 0,001$), при этом значения оставались одновременно выше контрольных на 46,3% ($p < 0,001$). В течение 2-го и 3-го ч эксперимента секретия фосфолипидов в этой группе не отличалась от контрольных показателей.

Секретия билирубина при введении даларгина на фоне действия секретина в течение 1-го ч снижалась

до контрольных величин. В течение 2-го и 3-го ч исследования секреция билирубина была достоверно ниже показателей группы с применением секретина ($p < 0,001$), оставаясь повышенной по отношению к группе с инфузией физиологического раствора на 21,0% ($p < 0,01$) и 23,0% ($p < 0,005$) (рис. 5).

Под влиянием DADLE скорость желчеотока, стимулированная секретинном, снижалась в течение 1-го ч ($p < 0,001$), оставаясь при этом выше контрольных величин на 21,0% ($p < 0,005$). В течение 2-го ч исследования DADLE полностью отменял эффект секретина, а в течение 3-го ч экспериментальные показатели, достоверно сниженные по сравнению с группой с инфузией секретина ($p < 0,001$), были выше контроля на 17,9% ($p < 0,02$) (рис. 1). DADLE полностью отменял повышение секреции ЖК, вызванное секретинном в течение 2-го и 3-го ч исследования, а в течение 1-го ч снижение было неполным и показатели оставались выше контрольных на 33,8% ($p < 0,005$) (рис. 2). Секреция холестерина снижалась до контрольных значений в течение 1-го ч исследования, в течение 2-го и 3-го ч показатели были снижены по сравнению с группой с инфузией секретина ($p < 0,001$), но выше контрольных значений на 33,2% ($p < 0,05$) и 28,7% ($p < 0,05$) (рис. 3). Секреция фосфолипидов, сниженная под влиянием DADLE ($p < 0,001$), оставалась выше контрольных значений на 39,0% в течение 1-го ч и не отличалась от контроля на протяжении 2-го и 3-го ч исследования (рис. 4). Секреция билирубина, повышенная инфузией секретина, под влиянием DADLE снижалась ($p < 0,001$) на протяжении всего времени эксперимента, но оставалась выше контрольных значений на 22,4% ($p < 0,05$), 26,6% ($p < 0,05$) и 23,0% ($p < 0,05$) в течение 1, 2 и 3-го ч исследования соответственно (рис. 5).

μ -Агонист DAGO полностью устранял стимулированное секретинном повышение скорости желчеотока на протяжении всего времени эксперимента (рис. 1). Секретинстимулированная секреция ЖК, холестерина, фосфолипидов и билирубина под влиянием DAGO также снижалась на протяжении 3 ч исследования, и показатели не отличались от значений контрольной группы (рис. 2—5).

κ -Агонист U50488 снижал скорость желчеотока, повышенную введением секретина, на протяжении всего эксперимента ($p < 0,001$), при этом значения показателей оставались достоверно выше контрольных на 44,3% ($p < 0,001$), 30,8% ($p < 0,005$) и 24,9%

($p < 0,005$) в течение 1, 2 и 3-го ч соответственно (рис. 1). Секреция ЖК, стимулированная секретинном, под влиянием U50488 снижалась ($p < 0,001$) в течение 1-го ч исследования, оставаясь выше контроля на 43,3% ($p < 0,05$), и становилась равной контрольным значениям ($p < 0,001$) на протяжении последующих 2-го и 3-го ч эксперимента (рис. 2). При этом повышение секреции холестерина, фосфолипидов и билирубина, вызванное инфузией секретина, полностью устранялось стимуляцией κ -опиоидных рецепторов U50488 ($p < 0,001$) (рис. 3—5) на протяжении всего времени наблюдения.

Таким образом, неселективный агонист опиоидных рецепторов δ - и μ -типа даларгин устраняет повышение скорости желчеотока, секреции компонентов липидного комплекса желчи, а также билирубина, вызываемое секретинном. Периферическая селективная стимуляция δ -опиоидных рецепторов DADLE приводит к значительному снижению, а в некоторых случаях и к полному устранению эффекта периферического введения секретина на скорость желчеотделения и состав секреторируемой желчи. Селективная стимуляция периферических μ -опиоидных рецепторов DAGO и κ -опиоидных рецепторов U50488 приводит к более выраженному, чем при стимуляции периферических δ -опиоидных рецепторов, угнетению секреторной активности печени, стимулированной секретинном. Можно предположить, что сходный эффект даларгина может быть реализован через стимуляцию периферических как δ -, так и μ -опиоидных рецепторов, к которым он обладает аффинитетом как неселективный агонист.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что все изученные синтетические аналоги опиоидных пептидов в той или иной мере угнетают проявление стимулирующего действия секретина на желчеотделительную функцию печени, и наиболее выраженный эффект оказывает стимуляция периферических μ - и κ -опиоидных рецепторов. В механизме неодинаковой выраженности влияния изученных аналогов опиоидных пептидов на стимулированный секретинном желчоток может играть роль различность эффекта самих аналогов на желчеотделение, некоторые из них, как было показано ранее [8, 9], сами оказывают холеретическое действие и, таким образом, обладая способностью угнетать желчеотделение, стимулированное гастроинтестинальными гормонами, вероятно, сохраняют при этом свой собственный эффект на секретор-

ную функцию печени. С другой стороны, поскольку даларгин является смешанным δ - и μ -агонистом, различие может быть связано с особенностями взаимоотношений популяций μ - и δ -опиоидных рецепторов [23].

Однонаправленность эффекта изученных аналогов опиоидных пептидов на секреторный ответ печени, стимулированный секретинном, свидетельствует о том, что разные опиоидные пептиды воздействуют на одни и те же механизмы регуляции функций в гепатоците. Установлено, что повышение активности аденилатциклазы и накопление циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) являются ключевыми для проявления эффекта секретина на желчеотделение [13, 24, 26]. Аналоги опиоидных пептидов с аффинитетом к δ -, μ - или κ -опиоидным рецепторам подавляют активность аденилатциклазы [11, 16, 19, 20]. Следовательно, снижение эффекта секретина под влиянием опиоидных пептидов может объясняться их способностью снижать накопление цАМФ в гепатоцитах.

Направленность регуляторного эффекта опиоидергической системы на желчеотделительную функцию печени в условиях физиологического эксперимента зависит от исходного функционального состояния органа. Как было показано авторами статьи [8, 9] и другими исследователями [22], при секреторной активности состояния покоя активация периферического отдела опиоидергической системы способствует повышению секреторной функции печени, а в состоянии повышенной секреторной активности, вызванной секретинном, активность опиоидергической системы приводит к снижению желчеотделительной функции печени. В данном случае имеет место описанная ранее модулирующая функция системы опиоидных нейропептидов [4], когда эффект опиоидов зависит от исходного функционального состояния органа или системы. Таким образом, опиоидергическая система оказывает модулирующее воздействие на желчеотделение, что проявляется в разнонаправленном эффекте в зависимости от исходного уровня физиологической секреции.

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. 136 с.
3. Коротко Г.Ф., Кадыров Ш.К. Зависимость секреции

- ферментов поджелудочной железой от дозы октапептида холецистокинина // Мед. журн. Узбекистана. 1986. № 4. С. 46—49.
4. Лишманов Ю.Б., Маслов Л.Н. Опиоидные нейропептиды, стресс и адаптационная защита сердца. Томск: Изд-во Том. ун-та, 1994. 352 с.
5. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1987. 407 с.
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. Противовозвратное действие и периферическая опиоидная активность продуктов деградации даларгина // Бюл. ВКНЦ АМН СССР. 1986. Т. 9. № 2. С. 83—86.
8. Рудин И.В., Медведев М.А. Опиоидные пептиды снижают литогенность желчи // Сиб. журн. гастроэнтерологии и гепатологии. 1996. Т. 1. № 2. С. 73—75.
9. Рудин И.В., Медведев М.А. Опиоидные пептиды модулируют секрецию основных детерминант желчотока // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1997. Т. 123. № 5. С. 498—500.
10. Alpini G., Glaser S., Robertson W. et al. Large but not small intrahepatic bile duct units are involved in secretin-regulated ductal bile secretion in normal rat liver // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 1997. V. 272. P. G1064—G1074.
11. Attali B., Saya D., Vogel Z. Kappa-opioid agonists inhibit adenylate cyclase and produce heterologous desensitization in rat spinal cord // J. Neurochem. 1989. V. 52. № 2. P. 360—369.
12. Chaturvedi K. Opioid peptides, opioid receptors and mechanism of down regulation // Indian. J. Exp. Biol. 2003. V. 41. № 1. P. 5—13.
13. Cho W.K., Boyer J.L. Vasoactive intestinal polypeptide is a potent regulator of bile secretion from rat cholangiocytes // Gastroenterology. 1999. V. 117. № 2. P. 420—428.
14. Fukumoto Y., Murakami F., Tateishi A. et al. Effects of secretin on TCDCA- or TDCA-induced cholestatic liver injury in the rat // Hepatol. Res. 2002. V. 22. № 3. P. 214—222.
15. Glaser S.S., Rodgers R., Phinizy J.L. et al. Gastrin inhibits secretin-induced ductal secretion by interaction with specific receptors on rat cholangiocytes // Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol. 1997. V. 273. P. G1061—G1070.
16. Ingram S.L., Williams J.T. Opioid inhibition of I_h via adenylylcyclase // Neuron. 1994. V. 13. № 1. P. 179—186.
17. LeSage G., Glaser S., Gubba S. et al. Regrowth of the rat biliary tree after 70% partial hepatectomy is coupled to increased secretin-induced ductal bile secretion // Gastroenterology. 1996. V. 111. P. 1633—1644.
18. Li J.P., Kae Y.L., Chang T.M., 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.
19. Mehta C.S., Strada S.J. Effects of acute and continuous administration of morphine on the cyclic AMP response induced by norepinephrine in rat brain slices // Life Sci. 1994. V. 55. № 1. P. 35—42.
20. Pratner P.L., McGinn T.M., Erickson L.J. et al. Activity of

- delta opioid receptors to interact with multiple G-proteins is independent of receptor density // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 32. P. 20548—20553.
21. Schaffalitzky de Muckadell O.B. Secretin in plasma: ups and downs Scand // *J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 2001. V. 234. P. 105—108.
22. Shimizu I., Hirota M., Matsumura M., Shima K. Effects of gut hormones on bile acid uptake and release in cultured rat hepatocytes // *Gastroenterol Jpn.* 1987. V. 22. № 2. P. 174—178.
23. Smith A.P., Lee N.M. Opioid receptor interactions: Local and nonlocal, symmetric and asymmetric, physical and functional // *Life Sciences.* 2003. V. 73. Issue 15. P. 1873—1893.
24. Trauner M., Mennone A., Gigliozzi A. et al. Nitric oxide and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate stimulate bile secretion in isolated rat hepatocyte couplets, but not in isolated bile duct units // *Hepatology.* 1998. V. 28. № 6. P. 1621—1628.
25. Walsh J.H., Mayer E.A.I. Gastrointestinal hormones // *Gastrointestinal Disease.* 5th ed. / Ed. M.H. Sleisenger, J.S. Fordtran. London: Saunders, 1993. P. 18—44.
26. Yamatani K., Saito K., Takahashi K. et al. Hormone-specific combinations of isoforms of adenylyl cyclase and phosphodiesterase in the rat liver // *Regul. Pept.* 2001. V. 99. № 1. P. 45—52.

Поступила в редакцию 10.05.2006 г.