

Т. М. Говоруха, А. І. Назаренко, Л. І. Жаліло, Г. Б. Філь,  
В. М. Бабан, М. М. Середенко

## Порушення процесів жовчовиділення при тканинній гіпоксії та спроби їх корекції

*В острых экспериментах на крысах in vivo установлены стимулирующие эффекты гидрофильных желчных кислот - холевой и урсодезоксихолевой - (ХК и УДХК) и депрессивное влияние ротенона на секрецию желчи. Кроме того, показана активация секреторных процессов ХК и УДХК под воздействием ротенона. Обсуждаются механизмы влияния желчных кислот на секреторную функцию гепатоцитов. Делается вывод о том, что НАДН-гидрогеназное звено дыхательной цепи не задействовано в стимулирующих эффектах ХК и УДХК.*

### ВСТУП

Відомо, що продукти секрету гепатоцитів - жовчні кислоти (ЖК) - важливі регуляторні агенти в організмі, що справляють різнобічну дію на функціонування печінки. Вони є одним із найголовніших регуляторів секреторної функції печінки, чинять мембраностабілізуючий та антиоксидантний ефекти, модулюють синтез глутатіону і білка та впливають на інші біохімічні процеси в організмі [1,2,6,11,13,15]. Жовчовидільний процес є результатом інтеграції низки біохімічних реакцій та фізико-хімічних процесів у тканині печінки. Чільне місце серед них посідають метаболічні кисневозалежні процеси, пов'язані з переносом електронів у мітохондріальному та мікосомальному (ендоплазматична сітка) ланцюгах окиснення. Очевидна залежність жовчоутворення від інтенсивності роботи цих ланцюгів.

Пригнічення функції енергоутворення та гіпоксичний стан організму призводить до гальмування секреції жовчі. Зі свого боку, ЖК (зокрема, холева кислота - ХК) як показали наші дослідження [4], можуть стимулювати процес мітохондріального (сукцинатзалежного) окиснення in vitro. Виникає пи-

тання про зв'язок активації тканинного дихання з інтенсифікацією жовчоутворення під впливом жовчних кислот. Відомо, що ротенон є блокатором НАДН-дегідрогенази внутрішнього мітохондріального ланцюга переносу електронів. Блокада НАДН-дегідрогеназної ланки дихального ланцюга стає моделлю гіпоксії у разі дослідження функції тканинного дихання [5].

Мета нашої роботи - вивчити дію гідрофільних ЖК (ХК та урсодезоксихолевої - УДХК) за гіперхолеретичних доз на фоні блокади НАДН-дегідрогенази дихального ланцюга ротеноном на процеси жовчовиділення у білих щурів при внутрішньопортальному введенні цих субстанцій. Основними нашими задачами було: підібрати експериментально дози, за яких ХК та УДХК при внутрішньопортальному введенні протягом 2,5 хв справляють виразний стимулюючий ефект на процеси жовчовиділення; дослідити зміни показників жовчовиділення за умов блокади НАДН-дегідрогенази дихального ланцюга; вивчити вплив ХК та УДХК на інтенсивність процесів жовчовиділення за умов попереднього введення ротенону (за 15 хв до введення ЖК, упродовж 2,5 хв, внутрішньопортально).

## МЕТОДИКА

Експерименти проведено на статевозрілих білих щурах-самцях масою 190 - 200 г, а також на тканині (гомогенаті) видаленої печінки інтактних тварин.

Об'ємну швидкість жовчовиділення (жовчоутворення) у щурів визначали впродовж 2 год через кожні 15 хв. Жовч, зібрану через канюльовану жовчну протоку, аналізували на вміст іонів калію та натрію методом фотометрії в полум'ї природного газу [3], а також холатів і холестерину [7]. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) у тканині оцінювали за накопиченням ТБК-активних продуктів [8].

Одержані результати піддавали статистичній обробці із застосуванням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Проведено 9 серій експериментів, включаючи досліди *in vivo* та *in vitro*.

Перший етап торкався впливу гідрофільних ЖК - ХК та УДХК - на процеси жовчовиділення *in vivo* і складався із 3 серій

експериментів (рис. 1). Застосування дози ХК, яка становить 1 мг/100 г при внутрішньопортальному введенні (протягом 2,5 хв), викликає у тварин посилення холерезу (див.рис. 1). Підвищення екскреції іонів спостерігається у першій 30-хвилинній пробі і становить для  $\text{Na}^+$  14 % ( $P < 0,05$ ), для  $\text{K}^+$  - 26 % ( $P < 0,05$ ). Виділення із жовчю холестерину за 30 хв після введення ХК підвищується на 43 % ( $P < 0,05$ ), холатів - на 32 % ( $P < 0,05$ ). УДХК (3 мг/100 г), введена в портальну вену, також спричинює відчутний жовчогінний ефект (доза 1 мг/100 г виявилася неефективною). З результатів наведених на рис. 1 видно модуляції об'ємної швидкості жовчотоку під впливом УДХК з максимумом на 15-й хвилині після введення ЖК. Екскреція  $\text{Na}^+$  підвищується на 14 % ( $P > 0,05$ ),  $\text{K}^+$  - на 34 % ( $P < 0,05$ ). У цій серії концентрації холатів і холестерину не визначалися.

Блокатор НАДН-дегідрогенази дихального ланцюга ротенон гальмує жовчовидільний процес (див.рис. 1). Максимальне зниження об'ємної швидкості жовчотоку (29 %,  $P < 0,01$ ) спостерігається на 30-й хвилині після введення ротенону. Екскреція  $\text{Na}^+$

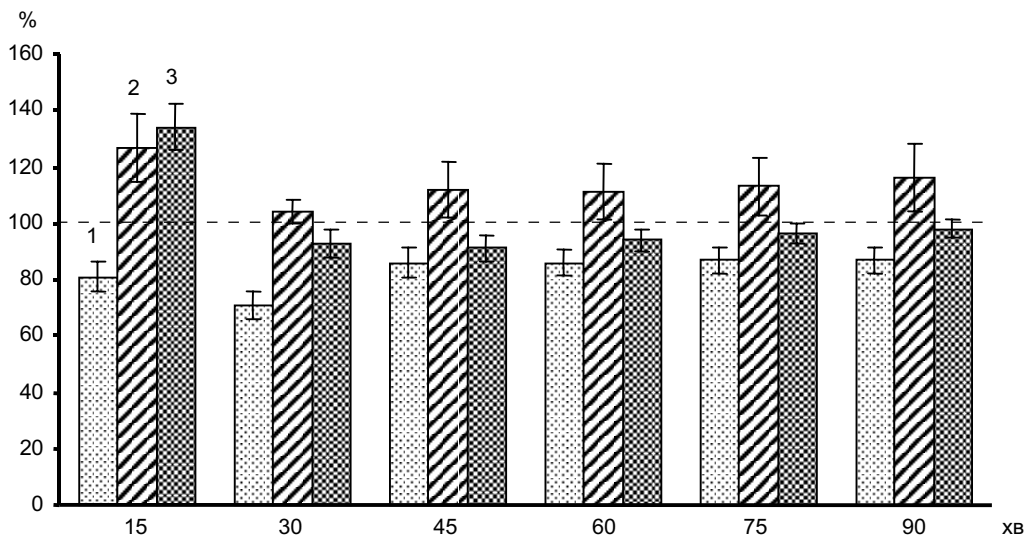


Рис. 1. Зміни інтенсивності жовчовиділення (об'ємної швидкості, %) у білих щурів під дією ротенону (1), холевої кислоти (2) та урсодезоксихолевої кислоти (вихідну об'ємну швидкість жовчотоку взято за 100 %) Час відліку вказаний від початку інфузії.

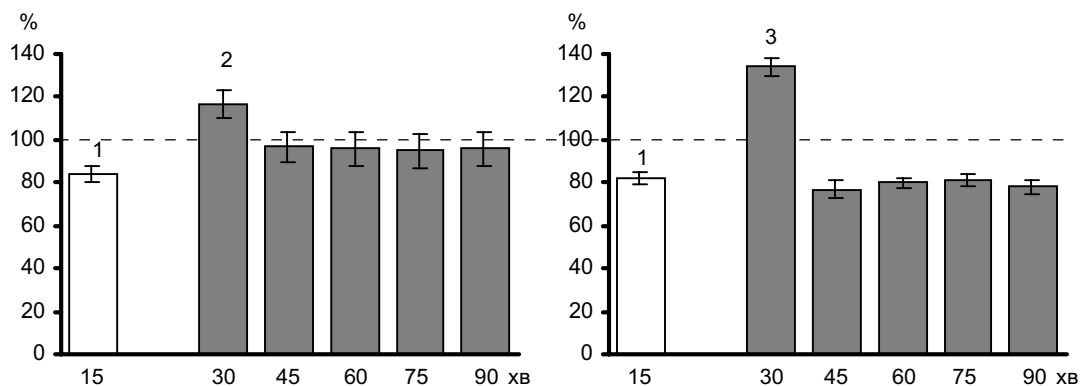
\*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ .

при цьому зменшується на 26 % ( $P < 0,01$ ), на 60-й та 90-й хвилині зниження становить 15 та 14 % відповідно ( $P < 0,05$ ). Екскреція  $K^+$  достовірно не змінюється. Достовірне ( $P < 0,05$ ) зменшення екскреції холестерину та холатів спостерігається на 30-й та 60-й хвилині після ін'єкції ротенону.

Одержані результати свідчать, що гідрофільні ЖК (ХК та УДХК, 1 і 3 мг/100 г відповідно) чинять гіперхолеретичні ефекти на процеси жовчоутворення (жовчовиділення) у щурів. Не виключено, що такі ефекти можуть бути результатом активації функції мітохондріального ланцюга переносу електронів. Ротенон, блокуючи НАДН-дегідрогеназну ланку внутрішнього мітохондріального ланцюга, знижує ефективність роботи останнього в цілому. В цьому, імовірно за все, й полягає причина гальмування жовчовидільної функції ротеноном. Можна припустити, що блокатор НАДН-дегідрогенази відіграє і роль прооксиданта для ПОЛ, що може також призвести до гальмування жовчовиділення, сприяючи перемиканню потоку електронів на мікросомальні редокс-ланцюги [9,10] і знижуючи ступінь окиснення косубстратів (НАДН і НАДФН). Проте інкубація ( $t^{\circ} = 37^{\circ}C$ ,  $t = 120$  хв) гомогенатів печінки з ротеноном за концентрації  $2 \cdot 10^{-6}$  моль/л (IV і V серії: контроль та дослід відповідно) не підвищує достовірно вміст малонового

діальдегіду (МДА) у пробах порівняно з контролем (на 6 %,  $P > 0,1$ ). До того ж слід зазначити, що підвищення концентрації блокатора у 2,5 раза (у VI і VII серіях: контроль та дослід відповідно) пригнічує процеси ПОЛ порівняно з контролем на 11 % ( $P < 0,05$ ). Це можна пояснити електронодонорними властивостями молекули ротенону, що у разі такої концентрації перекривають можливий (причини якого описані вище) прооксидантний ефект. Отже, активація ПОЛ не відіграє, як видається, будь-якої ролі в інгібіторному ефекті (на жовчовиділення) ротенону, і залишається єдине пояснення гальмівної дії останнього - зниження енергетичного потенціалу гепатоцитів. Виникають питання: чи можна компенсувати енергетичний дефіцит, створений блокадою НАДН-дегідрогеназної ланки дихального ланцюга, введенням в організм ХК та УДХК за гіперхолеретичних доз? Чи залучена дана ланка у механізм описаної вище стимуляції жовчовиділення під впливом гідрофільних ЖК?

Для відповіді на ці питання ми провели дослідження впливу ХК та УДХК за гіперхолеретичних доз на процеси жовчоутворення *in vivo* на фоні блокади НАДН-дегідрогенази дихального ланцюга ротеноном. Даний (другий) етап досліджень вмещував іще дві серії (VIII і IX серії за рахунком) експериментів (рис. 2). Спочатку вводився ротенон,



Таблиця 2. Вплив жовчних кислот на інтенсивність жовчовиділення (об'ємної швидкості, %) у білих щурів на фоні інфузії ротенону (1), ротенону і холевої кислоти (2) та ротенону і урсодезоксихолевої кислоти (3) (вихідну об'ємну швидкість жовчотуку взято за 100 %)

\*  $P < 0,01$ , \*\*  $P < 0,001$ .

потім (через 15 хв) на фоні пригнічення функції - ЖК. На рис. 2 відображено зміни об'ємної швидкості жовчотоку під впливом ХК та УДХК. Видно спочатку гальмування жовчовиділення під дією ротенону, потім різке збільшення швидкості секреції жовчі після введення кислот. Максимум дії обох кислот спостерігається через 15 хв після їх введення у воротну вену (для ХК - 17 %, для УДХК - 34 %). Відповідно абсолютний приріст становив 39 і 62 % (якщо за 100 % взяти швидкість жовчотоку при дії ротенону). Вже через 30 хв після введення ЖК спостерігається різке зниження швидкості жовчотоку, що у випадку з УДХК достовірно виходить за межі контрольних значень. В експериментах з ХК екскреція  $\text{Na}^+$  за 15 хв після введення ротенону зменшується на 15 % ( $P < 0,05$ ), після введення ХК збільшується на 20 %, перевищуючи контрольні значення ( $P < 0,05$ ). На 75-й хвилині досліді підвищення незначне й недостовірне. Подібним чином поводить себе й екскреція  $\text{K}^+$ , з тією лише різницею, що введення ротенону майже не впливає на даний показник (як і у випадку з описаними вище результатами дії ротенону на жовчовиділення без наступного введення ЖК). Екскреція холестерину й холатів під дією ротенону зменшується відповідно від  $0,56 \pm 0,02$  до  $0,44$  мг/кг·хв  $\pm 0,03$  мг/кг·хв ( $P < 0,05$ ) та від  $7,23 \pm 0,1$  до  $5,36$  мг/кг·хв  $\pm 0,24$  мг/кг·хв ( $P < 0,01$ ). Через 30 хв після введення ХК екскреція холестерину сягає контрольних значень, а холатів - достовірно перевищує останні на 37 % ( $P < 0,01$ ). У наступних 30-хвилинних пробах спостерігається зниження екскреції холестерину і ЖК відносно вихідних значень: на 75-й хвилині досліді - від  $0,56 \pm 0,02$  до  $0,44$  мг/кг·хв  $\pm 0,004$  мг/кг·хв ( $P < 0,001$ ) та від  $7,23 \pm 0,1$  до  $5,5$  мг/кг·хв  $\pm 0,17$  мг/кг·хв ( $P < 0,01$ ) відповідно, на 105-й хвилині - від  $0,56 \pm 0,02$  до  $0,41$  мг/кг·хв  $\pm 0,007$  мг/кг·хв ( $P < 0,01$ ) та від  $7,23 \pm 0,1$  до  $4,62$  мг/кг·хв  $\pm 0,11$  мг/кг·хв ( $P < 0,001$ ).

В експериментах з УДХК спостерігається деякою мірою подібність до такого у дослі-

дах з ХК характеру змін екскреції іонів. Спочатку - значення інтенсивності виведення іонів (зокрема  $\text{Na}^+$ ) з секретом після введення блокатора НАДН-дегідрогенази, потім через 30 хв після ін'єкції цієї ЖК - збільшення іонної екскреції. Проте для  $\text{Na}^+$  це підвищення незначне (6 %,  $P > 0,05$ ), а для  $\text{K}^+$  - збільшене на 28 % ( $P < 0,001$ ). Абсолютний приріст екскреції для  $\text{K}^+$  становить 34 %, для  $\text{Na}^+$  - 61 % (якщо відраховувати від екскреції при дії ротенону). Протягом останніх 60 хв спостерігається достовірно зниження екскреції для обох іонів:  $\text{Na}^+$  - на 22-23 % ( $P < 0,001$ ),  $\text{K}^+$  - на 10 % ( $P < 0,05$ ). Що ж стосується екскреції холестерину та його похідних, то цей показник знижується протягом усього періоду експерименту, починаючи від введення ротенону. Максимальне зниження припадає на 105-ту хвилину досліді і становить 72 % для холестерину ( $P < 0,001$ ) та 66 % для ЖК ( $P < 0,001$ ).

Враховуючи наведені результати, можна зробити наступні висновки і припущення. У стимулювальний ефект ХК роблять внесок такі складові жовчі, як іони  $\text{Na}^+$  і  $\text{K}^+$ , холати та меншою мірою холестерин. Що ж стосується УДХК, то найголовнішими факторами тут виступатимуть іони калію, іони натрію беруть дещо меншу участь. Холати і холестерин не відіграють будь-якої ролі в активації жовчовиділення під впливом цієї кислоти. Варто взяти до уваги можливу роль бікарбонатних іонів в ефекті УДХК, що розглядається в літературі [12]. Вміст іонів  $\text{Na}^+$  у секреті та деякою мірою холестерину і холатів може характеризувати активний (енергозалежний) транспорт; іони ж  $\text{K}^+$  відповідають за пасивний перенос. Отже, ХК, реалізуючи свою жовчоутворюючу дію, очевидно, впливає як на енергоутворюючі процеси, пов'язані з мітохондріальними ланцюгами окиснення, так і на процеси пасивного іонного транспорту, що залежить від багатьох факторів. Можна думати, що дія УДХК на процеси жовчоутворення дещо менше торкається процесів енергетики, ніж пасивного переносу іонів через мембрану. Як механізм збільшен-

ня  $K^+$ -екскреції, не виключається прямий мембранотропний вплив цієї кислоти через вбудовування у фосфоліпідний бішар [13], що може відбиватися на пасивному іонному транспорті. Стимуляція виходу  $K^+$  у секрет може залучити і процеси на рівні мітохондрій. Таким чином, активуючий вплив ЖК на процеси жовчовиділення складається, на нашу думку, із дії на енергетичні процеси у мітохондріальному ланцюзі та їх ефектів на пасивний транспорт іонів.

Відносно можливого впливу гідрофільних ЖК на процеси переносу електронів у мітохондріальному ланцюзі окиснення, то слід зазначити, що у стимулювальні ефекти ЖК та УДЖК не залучена НАДН-дегідрогеназна ланка. Очевидно, ефекти ЖК лише замаскують інгібуючу дію ротенону. Якби ці кислоти нейтралізували блокаду фермента, то характер змін (див.рис. 2) у період, що йде за піком стимуляції, більше б походив на такий, що його показано на рис. 1. Деякий залишковий вплив ротенону зберігається до кінця експерименту. Отож, для стимуляції енергетичних процесів на фоні дії ротенону слід увімкнути альтернативні способи генерації відновних еквівалентів у мітохондріальному ланцюзі. Одним із таких способів могла б бути мобілізація сукцинатзалежного шляху окиснення. Як ми вже зазначали, в дослідях *in vitro* нами встановлено факт активації окиснення сукцинату ЖК [4]. Не виключається така можливість і *in vivo*. Механізми увімкнення сукцинатзалежного шляху переносу електронів під дією ЖК невідомі й вимагають подальшого детального вивчення.

**T.M.Govorukha, A.I.Nazarenko, L.I.Zhalilo, G.B.Phil., V.M.Baban, M.M.Seredenko**

### **DISTURBANCES IN THE PROCESSES OF BILIFICATION AT TISSUE HYPOXIA AND ATTEMPTS OF THEIR CORRECTION**

In acute experiments on rats *in vivo* the stimulating effects of hydrophilic cholic acids (CA and UDCA)

on the bilification and their inhibiting by rotenone have been shown. The secretion of CA and UDCA under rotenone have been determined to be activated. The mechanisms of the influence of the cholic acids on the secretory function of the hepatocytes have being discussed. It has been concluded that NADH-dehydrogenase link in the respiratory chain is not involved in the activating effects by CA and UDCA.

*A.A.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kiev*

### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Ганиткевич Я.В., Швець В.И. Влияние желчных кислот на проницаемость эритроцитарных мембран // Физиол. журн. - 1983. - 29, № 5. - С. 625-628.
2. Єсипенко Б.Є., Жаліло Л.І., Костроміна А.П., Сінельник О.Д. Механізми дії жовчних кислот на жовчоутворення: Матер. XI з'їзду Укр. фізіол. тов. ім.І.П.Павлова. - К., 1982. - С. 152-153.
3. Жаліло Л.И. Роль ионов натрия и калия в модуляции энергетических процессов печени: Автореф. дисс. ...д-ра биол. наук. - Киев, 1990. - 38 с.
4. Жаліло Л.И., Сінельник О.Д., Весельский С.П. и др. Различные холеретические и метаболические эффекты холевой и дезоксихолевой кислот: Матер. XVI (1) Рос. научн. конф. "Физиология и патология пищеварения". - Краснодар, 1997. - С. 37-38.
5. Маевский Е.И., Гришина Е.В. Сохранение митохондрий при гипоксии за счет анаэробных редокс-превращений субстратов // Нур. Med. J. - 1996. - N 2. - С. 43-44.
6. Масюк А.І., Долгова О.М., Масюк Т.В., Слободян М.М. Особливості холеретичної дії жовчних кислот: Матер. XIII з'їзду Укр. фізіол. тов. ім.І.П.Павлова. - К., 1994. - С. 166.
7. Мирошниченко В.П., Громашевская Л.Л., Касаткина М.Г., Козачек Г.А. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи // Лаб. дело. - 1978. - № 3. - С. 149-153.
8. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. - В кн.: Современ. методы в биохимии. - М.: Наука, 1981. - С. 217-221.
9. Чистяков В.В., Поспелова Л.Н. Восстановление митохондриального цитохрома P-450 дыхательной цепью митохондрий печени. - В кн.: Регуляция процессов обмена веществ. - Таллин, 1981. - С. 105-106.
10. Чистяков В.В., Поспелова Л.Н. Перенос электронов от митохондрий к микросомам в реконструированной системе клеточных органелл // Биохимия. - 1982. - 47, вып. 1. - С. 55-61.

11. Buko L., Lukivskaya O., Maltsev A. et al. Ursodeoxycholic acid develops antiradical and antioxidative properties in rat liver microsomes. - In: Cholestatic Liver Diseases. - Freiburg, 1997. - P. 9.
12. Erlinger S. Hyperoholeretic bile acid: a key to mechanism? // Hepatol. - 1990. - **11**, N 5. - P. 888-890.
13. Holman M., Zgowras D., Samaras P. et al. UDC acid (UDC) lowers the rate constant of CDC acid (CDC) to the same extent as cholesterol in model membranes. - In: Cholestatic Liver Diseases. - Freiburg, 1997. - P. 25.
14. You T., Gцксе Y., Spiro P et al. Ursodeoxycholate increases bile flow and glutathione efflux in isolated perfused rat liver: Enhancement of reduced flow after chenodeoxycholate compared for ultrastructural changes. - In: Cholestatic Liver Diseases. - Freiburg, 1997. - P. 58.
15. Watson J.P., Cann P.A., Bramble M.G. Antioxidant therapy for symptomatic treatment of primary Biliary cirrosis: A pilot study // Gastroenterol. - 1998. - **114**, N 14. - A 1316.

*Ин-т фізіології ім.О.О.Богомольця НАН  
України, Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 24.10.2001*