

ОКСИД АЗОТУ ТА ЖОВЧОВИДІЛЕННЯ

ОКСИД АЗОТУ ТА ЖОВЧОВИДІЛЕННЯ – Оксид азоту (NO) модулює ряд метаболічних функцій у печінці, однак його роль у процесі жовчовиділення залишається нез'ясованою. В цьому дослідженні ми вивчали вплив модуляторів синтезу NO на показники жовчовиділення в нормі та за умов внутрішньопечінкового холестаза. Попередник NO L-аргінін викликає холеретичну дію у здорових особин та у щурів із холестазом. L-NAME, неселективний блокатор NOS, погіршує жовчовиділення в обох досліджуваних моделях. Селективний інгібітор iNOS аміногуанідин підвищує інтенсивність жовчовиділення та вміст компонентів у жовчі при холестазі.

ОКСИД АЗОТА И ЖЕЛЧЕОТДЕЛЕНИЕ – Оксид азота (NO) модулирует ряд метаболіческих функций в печени, однако его роль в процессе желчеотделения остается невыясненной. В данном исследовании мы изучали влияние модуляторов синтеза NO на показатели желчеотделения в норме и в условиях внутрипеченочного холестаза. Предшественник NO L-аргинин вызывает холеретическое действие у здоровых особей и у крыс с холестазом. L-NAME, неселективный блокатор NOS, ухудшает желчеотделение в обеих исследуемых моделях. Селективный ингибитор iNOS аминоганидин увеличивает интенсивность желчеотделения и содержание компонентов в желчи при холестазах.

NITRIC OXIDE AND BILIARY EXCRETION – Nitric oxide (NO) modulates several metabolic functions in liver, but its role in bile secretion was not clearly defined. In the present study, we examined the effects of NO modulators on bile excretion in normal and intrahepatic cholestasis. The NO precursor L-arginine produced cholagogue effect in healthy and cholestatic rats. L-NAME, non-selective NOS inhibitor, aggravated biliary excretion in both examine models. Selective iNOS inhibitor aminoguanidine significantly improves bile flow and composition in cholestasis.

Ключові слова: оксид азоту, жовчовиділення, L-аргінін, N-нітро-L-аргінін, аміногуанідин.

Ключевые слова: оксид азота, желчеотделение, L-аргинин, N-нітро-L-аргинин, аминоганидин.

Key words: nitric oxide, bile excretion, L-arginine, N-nitro-L-arginine, aminoguanidine.

ВСТУП Оксид азоту (NO) – медіатор, що утворюється з амінокислоти L-аргінін за участі групи ферментів NO-синтаз (NOS) певних клітин та тканин, бере участь у низці фізіологічних та патофізіологічних функцій організму [1]. NO *in vivo* стабільно утворюється в низьких концентраціях за участі конститутивної cNOS. У гепатоцитах та непаренхіматозних клітинах печінки, наприклад, купферівських клітинах, виявлено також індукцибельну iNOS, яка активуючись цитокінами та ліполісахаридами, здатна синтезувати значно більшу кількість NO [2]. Встановлено, що у печінці NO регулює судинний тонус, модулює ряд метаболічних функцій гепатоцитів, таких, як синтез альбуміну, глюконеогенез, мітохондріальне дихання, активність цитохрому P-450 [3]. NO також бере участь у регуляції секреції підшлункової залози [4]. Разом з тим, вплив оксиду азоту на екзогенну функцію печінки, а саме процеси жовчовиділення, залишаються на даний час нез'ясованими.

Отже, якщо NO бере участь у вказаних вище процесах гепатоцитів, то ймовірно він залучений і до син-

тезу та виділення жовчі. Відомо, що модуляцію синтезу NO за допомогою попередників та блокаторів широко використовують з метою вивчення фізіологічної ролі цього медіатора. Відповідно до результатів досліджень J. F. Dufuor et al. (1995), екзогенні донатори NO пригнічують скорочення жовчних каналців [5] та підвищують парацелюлярну проникність [6], що опосередковано свідчить про пригнічення швидкості виділення жовчі. Однак відомо, що циклічний гуанідин монофосфат (цГМФ) підвищує інтенсивність секреції жовчі та екскрецію HCO_3^- ; а оскільки NO активує в клітинах, у тому числі гепатоцитах розчинну гуанілатциклазу і синтез цГМФ, то слід очікувати на зростання цГМФ-залежного холеретичного ефекту під впливом NO [7]. Метою даного дослідження стало вивчення впливу модуляторів синтезу NO на процеси жовчовиділення у здорових тварин та при холестазі.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Для цієї роботи ми використали в ролі попередника синтезу NO-L-аргінін (LA) (“Sigma”, США), а як блокатори N-нітро-L-аргінін (L-NAME) (“Oldrich. Chem. Co.”, Англія) та аміногуанідин (AG) (ТОВ “Хімлабораторреактив”, Київ). Відомо, що AG в 40 разів є активнішим інгібітором iNOS, ніж cNOS [8], а L-NAME пригнічує обидві форми ферменту [9]. Здоровим щурам коригуючі чинники вводили інтраперитонеально, один раз на добу, щоденно протягом 7 днів. Холестатичне ураження печінки моделювали внутрішньошлунковим введенням α -нафтілізотіоціанату (АНІТ) одноразово в дозі 0,1 г/кг [10]. Дослідження проводили на третю добу експерименту, що відповідає періоду розпаду процесу [11]. Коригуючі чинники речовини вводили відповідно протягом двох діб інтраперитонеально один раз на добу щоденно. Всі гострі дослідження жовчовиділення було виконано зранку, згідно з добовою періодичністю синтезу жовчі [12]. Інтенсивність секреції жовчі (ІСЖ) визначали як середню протягом двох годин і виражали в грамах на кілограм маси тіла тварини за годину — мл/(год·кг) [13]. У жовчі визначали сумарну кількість жовчних кислот [14], яку виражали у г/л, концентрацію холестерину [15] — у мкмоль/л, загального білірубину та його фракцій [16] — у мкмоль/л. Абсолютну кількість вказаних компонентів жовчі виражали у мкмоль/ (кг·год). Отримані результати піддавали статистичній обробці загальноприйнятими методами з використанням t-критерію Стьюдента при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ Встановлено, що ІСЖ під впливом LA зростала на 10,0 %, а під впливом L-NAME знижувалась на 35,9 %, при введенні AG вірогідно не змінювалась. Концентрація загального білірубину вірогідно не змінювалась за введення досліджуваних агентів, разом з тим абсолютна кількість пігменту знижувалась відповідно на 42,1 та 16,2 % при введенні L-NAME та AG (табл.1). Це відбувається за рахунок кон'югованої форми пігменту, кількість якого знижується на 51,2 та 18,9 % при застосуванні інгібіторів NO відповідно, причому кон-

Таблиця 1. Вплив модуляторів синтезу NO на показники жовчовиділення

Показник	Група тварин				
	одиниці вимірювання	контроль	L-аргінін	L-NAME	AG
ІСЖ	мл/(год·кг)	1,99±0,07	2,19±0,03 p<0,05	1,28±0,08 p<0,001	1,78±0,06 p>0,05
Загальний білірубін	мкмоль/(кг·год)	472,68±14,60	488,36±25,73 p>0,05	273,62±21,67 p<0,001	396,16±27,01 p<0,05
	мкмоль/л	237,85±8,37	222,78±11,16 p>0,05	212,73±8,25 p>0,05	222,78±11,16 p>0,05
Білірубін прямий	мкмоль/(кг·год)	301,46±7,09	301,08±16,53 p>0,05	147,05±28,80 p<0,01	244,46±18,18 p<0,05
	мкмоль/л	151,76±4,88	137,35±7,34 p>0,05	112,22±15,15 p<0,05	137,35±7,34 p>0,05
Білірубін непрямий	мкмоль/(кг·год)	171,22±9,25	187,29±11,07 p>0,05	126,57±6,55 p<0,01	151,70±12,15 p>0,05
	мкмоль/л	86,10±4,60	85,43±4,71 p>0,05	100,50±7,52 p>0,05	85,43±6,20 p>0,05
% кон'югації	%	63,87±1,04	61,65±0,94 p>0,05	52,00±4,95 p>0,05	61,73±1,86 p>0,05
Жовчні кислоти	мг/(кг·год)	7,34±0,29	8,63±0,51 p>0,05	3,82±0,25 p<0,001	6,80±0,34 p>0,05
	г/л	3,70±0,19	3,95±0,27 p>0,05	2,99±0,08 p<0,05	3,88±0,09 p>0,05
Холестерин	мг/(кг·год)	0,56±0,05	0,54±0,04 p>0,05	0,41±0,05 p>0,05	0,48±0,03 p>0,05
	г/л	0,28±0,02	0,25±0,02 p>0,05	0,32±0,03 p>0,05	0,32±0,03 p>0,05
Холати/холестерин	–	13,47±1,28	16,26±0,94 p>0,05	9,77±1,06 p<0,05	15,38±1,06 p>0,05

Примітка. p – достовірність відносно контролю.

центрація цієї форми ферменту зменшується на 26,0 % при введенні L-NAME, а при введенні AG спостерігають тенденцію до зниження (табл. 1).

Концентрація вільної форми білірубину вірогідно не змінюється за введення усіх коригуючих чинників, хоча при застосуванні L-NAME спостерігають тенденцію до її зниження, а абсолютна кількість цієї форми пігменту вірогідно зменшується на 26,1% (табл.1). Вміст жовчних кислот у жовчі при введенні LA та AG не відрізняється від показників контрольної групи тварин, а при введенні L-NAME концентрація знижується на 19,3 %, а абсолютна кількість – на 48,0 %. Вміст холестерину в жовчі при введенні модуляторів синтезу NO не змінювався. Співвідношення холати/холестерин також вірогідно не змінюється при введенні LA та AG, однак знижується на 39,9 % при введенні L-NAME, що вказує на ризик випадання жовчних конкрементів [17] при блокуванні синтезу NO. Враховуючи те, що при застосуванні AG, який є селективним блокатором, холато/холестериновий коефіцієнт вірогідно не змінювався iNOS, провідну роль у підвищенні літогенних властивостей жовчі відіграє інгібування cNOS.

Відомо, що введення АНІТ викликає розвиток внутрішньопечінкового холестази [18]. Встановлено, що при експериментальному холестазі на третій день експерименту зменшення швидкості жовчовиділення (на 63,6 %) супроводжується зниженням у жовчі концентрації та вмісту основних компонентів (табл. 2). Так, вірогідно знижується абсолютна кількість загального та кон'югованого білірубину на 66,1 та 71,7 % відповідно. Про порушення глюкуронокон'югуючої функції печінки при ураженні АНІТ свідчить підвищення на 53,3 %

вмісту вільної фракції пігменту в жовчі. Показник відсоткової частки кон'югованої форми білірубину при холестазі становить 65,24±1,09 порівняно з 78,89±2,78 у контрольної групи тварин. Концентрація (г/л) та абсолютна кількість (мг/(кг·год)) холестерину зменшується відповідно на 43,7 та 47,6 %, а вміст жовчних кислот (мг/(кг·год)) – на 66,4 %. Про порушення літогенних властивостей жовчі свідчить достовірне зниження холато/холестеринового коефіцієнта на 35,5 %.

У результаті проведених досліджень встановлено, що при повторному застосуванні попередника синтезу оксиду азоту LA, за умов АНІТ-індукованого холестази інтенсивність жовчовиділення зростає на 20,5 %, при цьому підвищується і вміст компонентів у жовчі (табл. 2).

Так, вірогідно зростає вміст загального білірубину на 38,7 % за рахунок кон'югованої форми пігменту, концентрація якого збільшується у жовчі на 47,8 %, а абсолютний вміст – на 50,0 %, концентрація та вміст вільної форми зменшуються відповідно на 28,1 та 47,8 %, що призводить до збільшення частки кон'югованої форми ферменту при застосуванні попередника синтезу оксиду азоту до 84,77±1,63 проти 65,24±1,09 при холестазі. Вміст жовчних кислот та холестерину вірогідно не змінюються при введенні препарату, однак спостерігають тенденцію до їх зростання та підвищення коефіцієнта жовчні кислоти/холестерин порівняно з тваринами із холестазом (табл. 2).

Пригнічення синтезу NO при введенні препарату L-NAME, який є неселективним блокатором NOS, не призводить до поліпшення процесів жовчовиділення. На це вказує подальше, порівняно з контролем, зниження інтенсивності процесу жовчовиділення (на

Таблиця 2. Вплив модуляторів синтезу NO на показники жовчовиділення при внутрішньопечінковому холестази, викликаному ANIT (M±m, n=6)

Показник	Одиниці вимірювання	Група тварин				
		контроль	ANIT	ANIT + L-аргінін	ANIT + L-NAME	ANIT + AG
ІСЖ	мл/(год·кг)	2,26±0,07	0,82±0,03 p<0,001	0,99±0,05 p ₁ <0,05	0,76±0,05 p ₁ >0,05	1,26±0,05 p ₁ <0,001
Загальний білірубін	мкмоль/(кг·год)	29,88±2,75	10,12±0,59 p<0,01	14,06±0,80 p ₁ <0,01	9,12±0,45 p ₁ >0,05	16,71±0,93 p ₁ <0,01
Загальний білірубін	мкмоль/л	13,16±0,91	12,42±0,91 p>0,05	14,46±0,83 p ₁ >0,05	12,05±0,49 p ₁ >0,05	13,35±0,89 p ₁ >0,05
Білірубін прямий	мкмоль/(кг·год)	23,50±2,18	6,65±0,57 p<0,01	11,91±0,67 p ₁ <0,01	6,07±0,45 p ₁ >0,05	13,38±1,09 p ₁ <0,01
Білірубін прямий	мкмоль/л	10,38±0,81	8,16±0,81 p>0,05	12,24±0,63 p ₁ <0,01	7,97±0,37 p ₁ >0,05	10,38±0,81 p ₁ >0,05
Білірубін непрямий	мкмоль/(кг·год)	2,78±0,41	4,26±0,20 p<0,01	2,23±0,31 p ₁ <0,01	4,08±0,68 p ₁ >0,1	2,74±0,30 p ₁ <0,05
Білірубін непрямий	мкмоль/л	6,38±1,17	3,48±0,09 p>0,05	2,15±0,29 p ₁ <0,01	3,05±0,43 p ₁ >0,05	3,33±0,41 p ₁ >0,05
% кон'югації	%	78,89±2,78	65,24±1,09 p ₁ >0,05	84,77±1,63 p ₁ <0,05	66,71±4,41 p ₁ >0,05	79,71±3,09 p ₁ <0,05
Жовчні кислоти	мг/(кг·год)	11,47±0,78	3,85±0,25 p<0,001	4,50±0,25 p ₁ >0,05	3,75±0,24 p ₁ >0,05	5,08±0,23 p ₁ <0,05
	г/л	5,08±0,19	4,69±0,23 p>0,05	4,60±0,26 p ₁ >0,05	4,93±0,16 p ₁ >0,05	4,06±0,24 p ₁ >0,05
Холестерин	мг/(кг·год)	1,10±0,07	0,57±0,04 p<0,001	0,51±0,03 p ₁ >0,05	0,46±0,05 p ₁ >0,05	0,55±0,07 p ₁ >0,05
	г/л	0,48±0,03	0,70±0,03 p<0,05	0,52±0,03 p ₁ >0,05	0,60±0,04 p ₁ >0,05	0,42±0,04 p ₁ <0,05
Холати/холестерин		10,58±0,80	6,82±0,64 p>0,05	8,97±0,86 p ₁ >0,05	8,42±0,82 p ₁ >0,05	10,21±1,79 p ₁ >0,05

Примітки: 1. p – достовірність відносно контролю;
2. p₁ – достовірність відносно ANIT.

66,2 %). Вміст компонентів у жовчі, а саме загального білірубину та його фракцій, холестерину, жовчних кислот залишається на рівні ураження. Разом з тим, блокування аміногуанідином тільки iNOS веде до зростання жовчовиділення (на 53,3 % порівняно з ураженням). Вірогідно у жовчі зростає вміст загального та прямого білірубину на 65,1 та 101,3 % відповідно. Вміст вільного пігменту знижується на 36,5 %, в результаті чого відсоток кон'югації зростає і відповідає контролю (табл. 2), вміст жовчних кислот достовірно зростає на 32,0 %, а холестерину вірогідно не змінюється, однак показник холати/холестерин відповідає контролю, що вказує на нормалізацію літогенних властивостей жовчі за зниження активності iNOS.

Отже, наші дослідження показали, що застосування донатора синтезу оксиду азоту сприяє поліпшенню жовчовидільної функції печінки в нормі та при холестази. Однак логічним є припущення, що зростання рівня NO веде до релаксації гладком'язових волокон жовчних каналців та зниження холекінетичної функції [5]. Такий, на перший погляд контраверсійний результат, можна пояснити результатами досліджень M. Trauner et al. (1997), які показали, що донатори оксиду азоту активізують незалежно від жовчних кислот виділення жовчі за рахунок стимуляції виділення дисульфиду глутатіону, що є незалежним від цГМФ [19]. Блокуванням цього процесу можна пояснити негативний вплив L-NAME на процеси жовчовиділення. Наші дослідження показали, що інгібування sNOS відіграє важливу роль у порушенні літогенних властивостей

жовчі. Поліпшення жовчовиділення при введенні селективного інгібітора iNOS, особливо при холестази, можна пояснити його протективною дією на печінку [20] та, можливо, здатністю оксиду азоту проявляти спазмолітичний вплив на жовчні каналці за рахунок інгібування накопичення іонів кальцію ізонітол-трифосфатзалежним механізмом [5].

ВИСНОВКИ. 1. Попередник синтезу оксиду азоту L-аргінін проявляє холеретичну дію у здорових особин та у щурів з холестазом.

2. Неселективний блокатор NO-синтази N-нітро-L-аргінін пригнічує жовчовиділення та підвищує літогенні властивості жовчі.

3. Селективний інгібітор індукційної NO-синтази аміногуанідин підвищує інтенсивність жовчовиділення та вміст компонентів у жовчі при внутрішньопечінковому холестази.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Moncada S. The L-arginine-nitric oxide pathway / S. Moncada, A. Higgs // N. Engl. J. Med. – 1993. – Vol. 29. – P.2002–2012.
2. Spitzer J. A. Cytokine stimulation of nitric oxide formation and differential regulation in hepatocytes and nonparenchymal cells of endotoxemic rats / J. A. Spitzer // Hepatology. – 1994. – Vol. 19. – P. 217–218.
3. Endotoxin impairs biliary glutathione and HCO₃⁻ excretion and blocks the choleric effect of nitric oxide in rat liver / M. Trauner, M. H. Nathanson, St. A. Rydberg [et al.] – Hepatology. – 1997. – Vol. 25. – P. 1184–1191.
4. Role of nitric oxide in the relationship of pancreatic blood flow and exocrine secretion in cats. / A. G. Patel, M. T. Toyama,

T. N. Nguyen [et al.] // *Gastroenterology*. – 1995. – Vol. 108. – P. 1215–1220.

5. Dufour J. F. Nitric oxide blocks bile canalicular contraction by inhibiting inositol trisphosphate-dependent calcium mobilization / J. F. Dufour, T. Turner, I. M. Arias // *Gastroenterology*. – 1995. – V. 108. – P. 841–849.

6. Burgstahler A.D. NO modulates the apicolateral cytoskeleton of isolated rat hepatocytes by a PKC-dependent, cGMP-independent mechanism. / Burgstahler A.D., Nathanson M.H. // *Am. J. Physiol.* – 1995. – Vol. 269. – P. 789–799.

7. Cyclic GMP stimulates bile acid independent bile formation and biliary bicarbonate excretion / N. C. Myers, S. Gruene, H. L. Jameson, M. S. Anwer // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 270 – P. 418–424.

8. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction / J. A. Corbett, R. G. Tilton, K. Chang [et al.] // *Diabetes* – 1992. – Vol. 41. – P. 552–556.

9. Nv-nitro-L-arginine: a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. / K. Ishii, B. Chang, J. F. Kerwin [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 176. – P. 219–223.

10. Одынец А. Г. Методологические аспекты скрининга гепатопротекторов с использованием моделей поражения печени четыреххлористым углеродом, Д-галактозамином и α -нафтилизотиоцианатом / А. Г. Одынец, Д. А. Берзиня, А. Н. Кожухов // *Успехи гепатологии*. – Рига, 1988. – В. 14. – С. 255–237.

11. Plaa G. L. Functional Aspects of the Cholestatic Response Induced by α -Naphthylisothiocyanate in Mice and Rats / G. L. Plaa // *Agents action*. – 1969. – № 1. – P. 22–27.

12. Скакун Н. П. Суточные изменения в реакции печени на введение дегидрохолевой кислоты / Н. П. Скакун, О. В. Буняк // *Фармакология и токсикология*. – Киев. – 1980. – № 15. – С. 70–72.

13. Методические рекомендации по экспериментальному изучению желчегонной, холеспазматической, холелитиазной и гепатопротекторной активности новых лекарственных средств / С. М. Дрогвоз, С. И. Сальникова, Н. П. Скакун, В. В. Слышков // Киев : ФК МЗ Украины, 1994. – 46 с.

14. Мирошниченко В. П. Фотометрическое определение суммарного содержания, содержания три- и диоксихолановых желчных кислот в желчи с помощью реакции Петтенкофера / В. П. Мирошниченко, В. Н. Гайдай // *Лаб. дело*. – 1980. – № 7. – С. 448.

15. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи / В. П. Мирошниченко, Л. Л. Громашевская, М. Г. Касаткина [и др.] // *Лаб. дело*. – 1978. – № 3. – С. 149–153.

16. Скакун Н. П. Экспериментальный островковый диабет и функция печени / Н. П. Скакун // *Тез. Докл. X научн. Сессии инст. питания*. – М., 1956. – С. 238–241.

17. Никитенко Т. М. Показатели литогенности желчи, липидов сыворотки крови и воспаление слизистой желчного пузыря у женщин с холестериновой желчнокаменной болезнью / Т. М. Никитенко // *Бюллетень СО РАМН*. – 2006. – № 4 (122). – С. 160–163.

18. β -Naphthylisothiocyanate (ANIT) Induced Cholestasis in Rats/ Kiyohisa Uchida, Yoshio Ogura, Nobuo Yamaga, Kazuo Yamada // *Yonago Acta medica* – 2002. – Vol. 45. – P. 59–68.

19. Nitric Oxide Donors Stimulate Bile Flow and Glutathione Disulfide Excretion Independent of Guanosine 3,5-Cyclic Monophosphate in the Isolated Perfused Rat Liver / M. Trauner, M. H. Nathanson, A. Mennone [et al.] // *Hepatology*. – 1997. – Vol. 25, N. 2. – P. 263–269.

20. Chronic administration of aminoguanidine reduces vascular nitric oxide production and attenuates liver damage in bile duct-ligated rats / Chang-Li Wei, Wei-Min Hon, Kang-Hoe Lee, Hoon-Eng Khoo // *Liver International*. – 2005. – Vol. 20, I.3. – P. 647–656.

Отримано 15.02.12