



УДК 612.35 + 612.357.1

Тканинне дихання в печінці та холесекреція за умов дії L-цистеїну

Юлія Левадянська, Євдокія Решетнік, Станіслав Весельський, Петро Янчук

Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Адреса для листування: julia6021@gmail.com

Отримано: 02.02.18; прийнято до друку: 03.04.18; опубліковано: 25.06.18

Резюме. Печінка – поліфункціональний орган, більшість синтетичних процесів, у якій відбувається за зростання інтенсивності тканинного дихання. Відомо, що умовно незамінна сірковмісна амінокислота L-цистеїн є попередником газового трансмітера сірководню (H_2S), який, за нашими даними, змінює кровопостачання печінки, а отже, здатний впливати на її кисневий гомеостаз. Мета роботи – дослідити вплив L-цистеїну на тканинне дихання в печінці та з'ясувати його зв'язок з динамікою змін концентрацій жовчних кислот і ліпідів у жовчі щурів.

Напруження кисню (pO_2) у паренхімі печінки щурів реєстрували полярографічним методом. Коефіцієнт споживання кисню печінкою (К) розраховували за кривою падіння pO_2 у залозі при оклюзії її приносячих судин. Концентрації жовчних кислот і ліпідів жовчі визначали методом тонкошарової хроматографії в півгодинних пробах жовчі.

У результаті нашого дослідження встановлено, що внутрішньопортальне введення L-цистеїну в дозі 20 мг/кг викликає зростання споживання кисню печінкою на 39,6 % ($p < 0,001$) завдяки посиленню ряду кисеньзалежних біосинтетичних процесів у залозі, таких як синтез таурохолевої кислоти та суміші тауродезоксихолевої й таурохенодезоксихолевої кислот з одночасним окисненням окремих фракцій ліпідів жовчі. Так, концентрація таурохолевої кислоти зросла на 7,3% ($p < 0,05$; при вихідному рівні 173,0 [147,9; 181,1] мг%) у четвертій півгодинній пробі з моменту введення L-цистеїну, а суміші тауродезоксихолевої та таурохенодезоксихолевої кислот у третій півгодинній пробі – на 17,9 % ($p < 0,05$); вихідний рівень становив 81,2 [66,9; 92,0] мг%). При цьому вміст фосfolіпідів зменшився у шостій півгодинній пробі на 12,5 % ($p < 0,05$) при вихідному рівні 72,2 [68,7; 77,7] мг%, а вільних жирних кислот та тригліцеридів у п'ятій півгодинній пробі на 12,3 % і 18,5 % ($p < 0,05$) при вихідних рівнях 14,6 [14,6; 15,5] мг% та 2,7 [2,3; 2,9] мг% відповідно. При цьому відбувається падіння рівня напруження O_2 у паренхімі печінки на 46,8 % ($p < 0,01$) відносно вихідного рівня.

Отже, L-цистеїн викликає посилення кисеньзалежних синтетичних процесів у печінці, зокрема, пов'язаного з мітохондріальними поліферментними системами біосинтезу жовчних кислот та окиснення окремих фракцій ліпідів жовчі з одночасною активацією в гепатоцитах тканинного дихання. Рівень напруження кисню в залозі при цьому знижується.

Ключові слова: полярографія, напруження кисню, споживання кисню, тонкошарова хроматографія, жовчні кислоти, ліпіди жовчі.

Tissue Respiration in the Liver and Bile Secretion at the Action of L-cysteine

Yliya Levadianska, Evdokiya Reshetnik, Stanislav Veselsky, Petro Yanchuk

Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

Correspondence: julia6021@gmail.com

Resume. The specific function of the liver is bile secretion, the synthesis and transport of certain organic components which are directly related to the level of activity of tissue respiration in the gland. Its modulator may be an amino acid L-cysteine, which is a precursor of a gas transmitter of hydrogen sulfide (H_2S), which can affect the supply of oxygen to the liver with blood and metabolic processes in it.

Purpose. The aim of the present study was to investigate the effect of L-cysteine on the level of oxygen in the liver tissue and to find out the relation of this indicator with the dynamics of changes in concentrations of bile acids and lipids in bile in rats.

Methods. The level of oxygen tension (pO_2) in the liver tissue was recorded by the polarographic method. The coefficient of oxygen consumption by the liver (K) was calculated by the curve of falling pO_2 in the gland during the occlusion of its blood vessels. Concentrations of bile acids and lipids of bile were determined by thin layer chromatography.

Results. Our results indicate that administration of L-cysteine at a dose of 20 mg/kg body weight causes the maximum fall in pO_2 in the liver parenchyma by 46,8 % ($p < 0,01$) from baseline. This may indicate the activation of processes associated with the consumption of oxygen in the gland, which led to the drop of pO_2 . Along with this, there was an increase in the level of tauroconjugates in the bile, in particular, the concentration of taurocholic acid by 7,3 % ($p < 0,05$) and the mixture of taurodeoxychole and taurohenodeoxycholic acids by 17,9 % ($p < 0,05$) relative to the initial equal. At the same time, the content of free fatty acids and triglycerides in the liver secretion decreased by 12,3 % and 18,5 % ($p < 0,05$) respectively in the fifth half-hourly sample relative to the baseline level. The concentration of phospholipids decreased in the sixth half-hourly sample by 12,5 % relative to the baseline level.

Conclusion. Thus, L-cysteine causes an increase in oxygen-dependent synthetic processes in the liver, in particular, associated with mitochondrial poly-enzymes bile acid biosynthesis systems and oxidation of some lipid fractions of bile with simultaneous activation in hepatocytes of tissue respiration. The level of oxygen supply in the gland decreases.

Key words: polarography, oxygen tension, oxygen consumption, thin-layer chromatography, bile acids, lipid bile.

Вступ

Печінка є одним із найбільш поліфункціональних та метаболічно-активних органів, більшість синтетичних процесів у якому відбувається за зростання інтенсивності тканинного дихання. Зокрема, така специфічна функція печінки, як утворення й секреція жовчі, безпосередньо залежить від перебігу низки кисеньзалежних процесів [1, 2, 3, 4]. До них належать синтез жовчних кислот і ліпідів, які є основними компонентами жовчі [5, 6], а також транспорт її окремих органічних компонентів [7]. Сучасними дослідженнями показано, що амінокислота L-цистеїн може впливати на кисневий гомеостаз печінки. Основним механізмом впливу цієї амінокислоти на функціонування печінки вважають, передусім, регуляторну дію L-цистеїну як попередника газового трансмітера сірководню (H_2S) [8, 9, 10].

Раніше нами показано здатність сірководню підвищувати рівень кровопостачання печінки, а отже, і

збільшувати надходження до неї кисню [11, 12].

Мета роботи – дослідити вплив L-цистеїну на тканинне дихання печінки та з'ясувати його зв'язок із динамікою змін концентрацій жовчних кислот і ліпідів у жовчі щурів.

Матеріал і методи досліджень

Дослідження проведено *in vivo* в умовах гострого експерименту на 22 лабораторних щурах масою 250–300 г, наркотизованих тіопенталом натрію (70 мг/кг) або уретаном (1 г/кг). Напруження кисню (pO_2) в паренхімі печінки щурів реєстрували за допомогою полярографа LP-9 (Чехія) у хроноамперометричному режимі при фіксованій напрузі – 0,6 В, використовуючи 2–3 покриті склом платинові (індикаторні) електроди, розміщені в різних ділянках печінки. Як індіферентний використовували стандартний каломельний електрод від рН-метра. Калібрували електроди за методикою Березовського [13]. Всі показники записували на

реєстраторі Н071.6М. Коефіцієнт споживання кисню печінкою (К) розраховували за кривою падіння pO_2 в залозі при оклюзії її приносних судин [14].

Концентрації жовчних кислот (таурохолевої кислоти та суміші тауродезоксихолевої й таурохенодесоксихолевої кислот), ліпідів жовчі (фосфоліпідів, вільних жирних кислот та тригліцеридів) визначали методом тонкошарової хроматографії [15, 16]. Після відбору першої півгодинної проби (вихідний рівень) тваринам дослідної групи внутрішньопортально болюсно вводили L-цистеїн (Sigma, USA) у дозі 20 мг/кг, а щурам контрольної групи – фізіологічний розчин (ПАТ Галичфарм, Україна) із розрахунку 1 мл/кг і продовжували збирати наступні 5 півгодинних проб жовчі. Кількісне визначення окремих органічних компонентів жовчі здійснювали за допомогою вітчизняного денситометра ДО-1М ($\lambda=620$ нм) за калібрувальними кривими. Їх концентрацію в пробах жовчі розраховували в мг%.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою аналітичного пакету Statistica 8.0, використовуючи t-критерій Стьюдента для результатів, що мали нормальний розподіл, та критерій Вілкоксона, які не мали нормального розподілу. Результати представляли у

виділі $M \pm SD$ (середнє значення \pm середньоквадратичне відхилення) та Me [25 %; 75 %] (медіана [нижній квартиль; верхній квартиль]). Відмінності між групами вважали вірогідними при рівні значущості $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Рівень напруження кисню в паренхімі печінки піддослідних щурів становив $46,2 \pm 2,3$ мм рт. ст. Внутрішньопортальне введення щурам L-цистеїну у дозі 20 мг/кг зумовлювало істотне зниження pO_2 із максимальним його падінням на 46,8 % ($p < 0,01$), порівняно з вихідним рівнем, на 65 хвилині дослідження (рис. 1А).

Цікаво, що ці результати, на перший погляд, не узгоджуються з отриманими нами раніше даними про зростання кровопостачання печінки при дії L-цистеїну (Yanchuk & Slobodanuk 2015; Slobodanuk & Yanchuk 2014), що мало б призвести й до підвищення рівня напруження кисню в її паренхімі. Тому варто припустити, що отримані результати можуть свідчити про активацію процесів, пов'язаних з інтенсифікацією споживання кисню залозою, що й призвело до зниження рівня pO_2 в ній. І дійсно, як засвідчили наші подальші дослідження, введення піддослідним тваринам

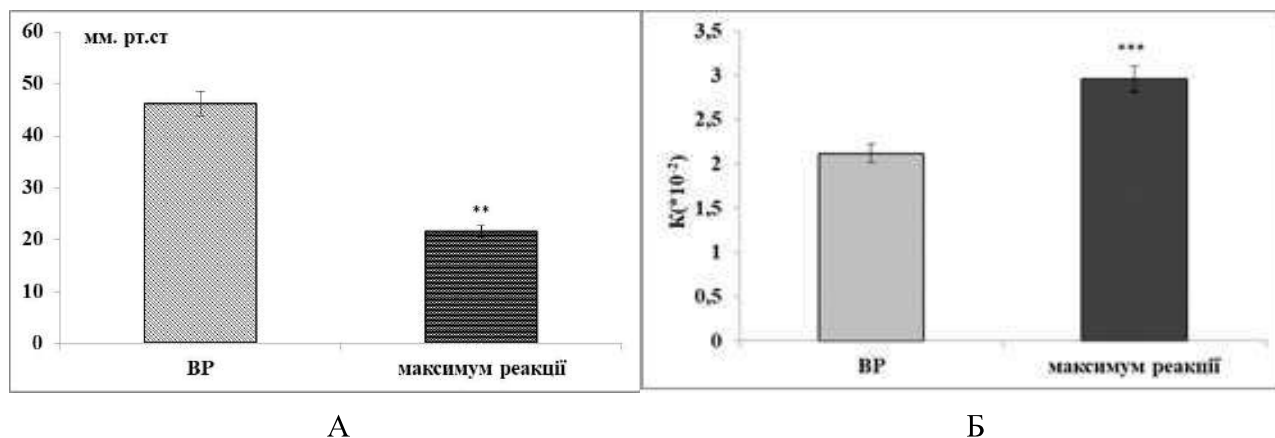


Рис. 1. Вплив внутрішньопортального введення L-цистеїну (20 мг/кг) на напруження кисню (pO_2) в паренхімі печінки (мм рт. ст.) (А) та на коефіцієнт споживання кисню (К) залозою (Б); $M \pm SD$, $n=8$.

L-цистеїну викликало значне зростання інтенсивності тканинного дихання в печінці. Так, коефіцієнт споживання кисню печінкою (K) збільшувався, порівняно з вихідним рівнем ($2,12 \pm 0,11 \cdot 10^{-2}$), на 39,6 % ($p < 0,001$) на максимумі реакції (60-та хвилина з моменту введення L-цистеїну) і досягав $2,96 \pm 0,14 \cdot 10^{-2}$ (рис. 1Б).

До того ж на другому етапі дослідження ми перевірили можливість впливу L-цистеїну на активацію кисеньзалежних

процесів утворення компонентів жовчі з використанням тонкошарової хроматографії.

У тварин контрольної групи спостерігали зменшення концентрацій фосфоліпідів на 10,9 % ($p < 0,05$), порівняно з вихідним рівнем (68,7 [64,1; 70,1] мг%). Концентрації вільних жирних кислот і тригліцеридів статистично достовірно не змінювалися, порівняно з їх вихідними рівнями (табл. 1).

Таблиця 1

Динаміка змін окремих фракцій ліпідів (мг%) у жовчі щурів при внутрішньопортальному введенні L-цистеїну в дозі 20 мг/кг (n=14), Me [25 %; 75 %]

№ проби	Окремі фракції ліпідів жовчі щурів		
	фосфоліпіди	вільні жирні кислоти	тригліцериди
Контроль			
1	68,7 [64,1; 70,1]	12,7 [11,6; 12,8]	2,1 [2,0; 2,1]
2	67,8 [64,8; 72,2]	12,8 [11,9; 13,3]	2,2 [1,9; 2,3]
3	65,0 [65,0; 69,6]	12,0 [11,9; 14,1]	2,0 [2,0; 2,1]
4	65,9 [64,1; 66,7]	12,8 [12,6; 12,8]	2,1 [2,1; 2,1]
5	63,2 [63,2; 63,2]#	14,0 [11,9; 14,2]	1,9 [1,8; 1,9]
6	61,2 [60,5; 62,3]#	13,4 [12,4; 14,2]	1,8 [1,8; 1,9]
L-цистеїн			
1	72,2 [67,8; 73,1]	14,6 [14,6; 15,5]	2,7 [2,3; 2,9]
2	72,2 [68,7; 77,7]	15,5 [13,7; 15,5]	2,6 [2,5; 2,9]
3	74,0 [70,4; 80,3]	14,6 [14,2; 15,1]	2,8 [2,7; 2,8]
4	71,3 [70,2; 74,0]	13,7 [13,3; 13,7]	2,5 [2,4; 2,5]
5	65,0 [65,0; 71,3]	12,3 [11,9; 12,4]#	2,2 [2,1; 2,3]#
6	63,2 [61,4; 66,9]#	12,4 [11,1; 12,8]#	2,4 [2,2; 2,4]#

Примітки. * $p < 0,05$ відносно контролю; # $p < 0,05$ відносно вихідного рівня (концентрація ліпідів у півгодинній пробі жовчі, отриманій до введення досліджуваної сполуки).

Також спостерігали зменшення концентрацій таурокон'югатів. Максимум реакції виникав в останній півгодинній пробі жовчі, а саме: уміст таурохолевої кислоти знизився на 9,8 % ($p < 0,05$), порівняно з вихідним рівнем (176,6 [171,2; 190,9] мг%), а концентрація суміші тауродезоксихолевої й таурохенодесоксихолевої кислот зменшилася на 16,1 % ($p < 0,05$) відносно вихідного рівня (105,5 [102,8; 108,2] мг%) (табл. 2). Зменшення вмісту жовчних кислот та фосфоліпідів у печінковому секреті щурів контрольної групи впродовж проведення експерименту,

наймовірніше, пов'язане з перериванням ентерогепатичної циркуляції та зменшенням кількості їх надходження з кров'ю до печінки.

При введенні L-цистеїну в жовчі дослідної групи щурів відбувалося найістотніше зменшення вмісту фосфоліпідів у шостій півгодинній пробі на 12,5 % ($p < 0,05$) при вихідному рівні 72,2 [68,7; 77,7] мг%, а вільних жирних кислот та тригліцеридів у п'ятій півгодинній пробі – на 12,3 і 18,5 % ($p < 0,05$) при вихідних рівнях 14,6 [14,6; 15,5] мг% та 2,7 [2,3; 2,9] мг% відповідно (табл. 2).

Таблиця 2

Динаміка змін окремих фракцій жовчних кислот (мг%) у жовчі щурів при внутрішньопортальному введенні L-цистеїну в дозі 20 мг/кг (n=14), Me [25 %; 75 %]

№ проби	Окремі фракції жовчних кислот жовчі щурів	
	таурохолева кислота	тауродезоксихолева й таурохенодесоксихолева кислоти
Контроль		
1	176,6[171,2;190,9]	105,5[102,8;108,2]
2	174,9[170,3;189,3]	106,9[101,9;111,6]
3	172,1[168,6;187,5]#	103,3[95,0;105,5]
4	172,7[164,0;185,7]#	98,0[93,7;101,9]#
5	166,3[161,3;177,6]#	93,4[92,0;99,0]#
6	159,3[151,4;172,1]#	88,5[86,7;92,0]#
L-цистеїн		
1	173,0[147,9;181,1]	81,2[66,9;92,0]**
2	178,5[163,9;191,0]#	92,0[74,0;95,7]*#
3	182,0[171,2;198,3]#	95,7[77,7;108,2]#
4	185,7[169,5;204,5]#	88,5[74,0;110,9]#
5	181,1[164,0;198,5]#	81,2[69,6;107,3]#
6	177,6[161,3;191,0]#	72,2[65,0;103,7]

Примітки. * $p < 0,05$ відносно контролю; # $p < 0,05$ відносно вихідного рівня (концентрація ліпідів у півгодинній пробі жовчі, отриманій до введення досліджуваної сполуки).

Внутрішньопортальне ведення щурам дослідної групи L-цистеїну (20 мг/кг) зумовлювало вірогідне зменшення концентрації суміші тауродезоксихолевої й таурохенодезоксихолевої кислот, порівняно з контролем, лише в першій півгодинній пробі жовчі на 23,0 % ($p < 0,01$) та в другій пробі – на 13,9 % ($p < 0,05$). Зважаючи на те, що контрольна й дослідна групи сформовані окремо, у кожній – по сім щурів, спостережувані зміни можуть бути свідченням варіабельності вихідних значень досліджуваних показників у різних тварин. Тому більш доцільним у цьому випадку було порівнювати значення змін конкретного показника після введення досліджуваної речовини з вихідним його рівнем у цій групі тварин. Таке порівняння проведено на наступному етапі дослідження.

При введенні L-цистеїну в жовчі дослідної групи щурів найбільше відносно вихідного рівня зростав уміст таурококон'югатів, зокрема, концентрації таурохолевої кислоти на 7,3 % ($p < 0,05$) при вихідному рівні 173,0 [147,9; 181,1] мг% у четвертій півгодинній пробі та суміші тауродезоксихолевої й таурохенодезоксихолевої кислот у третій пробі на 17,9 % ($p < 0,05$), порівняно з вихідним рівнем (81,2 [66,9; 92,0] мг%) (табл. 2).

Висновки

Отже, L-цистеїн викликає посилення кисеньозалежних синтетичних процесів у печінці, зокрема пов'язаного з мітохондріальними поліферментними системами біосинтезу жовчних кислот «кислим шляхом» та окиснення окремих фракцій ліпідів жовчі з одночасною активацією в гепатоцитах тканинного дихання. При цьому спостерігали підвищення рівня концентрації таурохолевої кислоти й суміші тауродезоксихолевої та таурохенодезоксихолевої. Кон'юговані жовчні кислоти є більш

розчинними, ніж вільні, тому зростання вмісту таурококон'югатів у жовчі після введення L-цистеїну сприяє зменшенню літогенності жовчі, стабілізуючи її колоїдний стан. Також спостерігали посилення енергозалежних катаболічних процесів, таких як окиснення вільних жирних кислот і тригліцеридів, про що свідчить зменшення їх умісту в жовчі щурів після введення L-цистеїну. Рівень напруження кисню в залозі при цьому знижується.

Література

1. Esteller, A. Physiology of bile secretion. *World J Gastroenterol.* 2008, 14 (37), pp 5641–5649.
2. Marschall, H. U.; Matern, H.; Sjovall J. *Conjugation of bile acids.* Dordrecht, Boston: London 1995, pp 155–168.
3. Pellicoro, A.; vanden Heuvel, F. A.; Geuken, M. Human and rat bile acid-CoA:amino acid N-acyltransferase are liver-specific peroxisomal enzymes: implications for intra cellular bile salt transport. *Hepatology* 2007, 45(2), pp 340–348.
4. Hofmann, A. F.; Hagey, L. R. Bile acids: chemistry, pathochemistry, biology, pathobiology, and therapeutics. *Cell Mol Life Sci*; 2008, 65 (16), pp 2461–2483.
5. Lefebvre, P.; Cariou, B.; Lien, F. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev*; 2009, 89(1), pp 147–91.
6. Dijkers, A. Biliary cholesterol secretion: more than a simple ABC. *World J Gastroenterol*; 2010, 16 (47), pp 5936–45.
7. Li, Y.; Wang, X.; Shen, Z. Traditional Chinese medicine for lipid metabolism disorders. *Am J Transl Res*; 2017, 9(5), pp 2038–2049.
8. Haouzi, P.; Sonobe, T. Cardio genic shock induced reduction in cellular O₂ delivery as a hallmark of acute H₂S intoxication. *Clinical toxicology.* Philadelphia, Pa; 2015, 53(4), pp 416–417.
9. Abou-Hamdan, A.; Guedouari-Bounihi, H.; Lenoir, V. Oxidation of H₂S in mammalian cells and mitochondria. *Methods Enzymol*; 2015, 554, pp 201–28.
10. Norris, E. J.; Culbertson, C. R.; Narasimhan, S. The liver as a central regulator of hydrogen sulfide. *Shock*; 2011, 36 (3), pp 242–50.
11. Янчук, П. І.; Слободяник, Л. О. Роль сірководню у регуляції кровообігу в печінці. *Фізіологічний журнал* 2015, 61(3), с. 28–34.
12. Слободяник, Л. О.; Янчук, П. І. Участь сірководню у регуляції тканинного кровотоку в

печінці щурів. *Вісник Черкаського університету. Сер : Біологічні науки* 2014, 36, с. 103–107.

13. Березовский, В. А.; Еномян, С. Г. *Методы и аппаратура для исследования кислородного обеспечения тканей*. Методические рекомендации. Алма-Ата, 1985, с 26–27.

14. Цибенко, В. А.; Егорова, Л. С.; Михайлова, Н. В.; Жахалова, Л. А.; Дубілей Т. А. Нейрогенний контроль окисного метаболізму в печінці. *Фізіологічний журнал* 1988, 5, с. 737–745.

15. А. с. 4411066/14 ССРСР, МБИ G 01 N33/50. Способ определения желчных кислот в

биологических жидкостях/С.П. Весельский, П. С. Лященко, И. А. Лукьяненко (СССР). – № 1624322; заявл. 25.01.1988; опубл.30.01.1991, Бюл. №4.

16. Патент України 99031324, МБН А61В5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / Весельский С. П., Лященко П. С., Костенко С. І., Горенко З. А., Куровська Л. Ф.; заявник і патентовласник КНУ імені Тараса Шевченка. № 33564 А; заявл. 05.10.1999; опубл. 15.02.2001; Бюл. №1.