

Секреція жовчі та транскрипційна активність ядер клітин печінки щурів при дії жовчних кислот

Изучали интенсивность желчеотделения у крыс при внутривенной инфузии холевой и таурохолевой кислот. Установлено, что указанные желчные кислоты угнетают секрецию желчи при их инфузии в физиологическом растворе и усиливают желчеотделение при инфузии в растворе, содержащем ионы гидрокарбоната. Предварительное введение ингибитора транскрипции актиномицина Д препятствует развитию гиперхолеретического действия таурохолевой кислоты. При действии таурохолевой кислоты на изолированные ядра клеток печени их транскрипционная активность усиливается и снижается при действии холевой кислоты. Сделан вывод, что холеретические эффекты желчных кислот реализуются, по крайней мере, частично, на уровне молекулярных регуляторных механизмов клеток, к числу которых относится транскрипция.

Вступ

За існуючими уявленнями [2, 15] жовчні кислоти як осмотично активні речовини зумовлюють транспепатоцелюлярне надходження води з крові у жовчні каналікули, тобто, інтенсивність секреції первинної (каналікулярної) жовчі. Однак не лише осмотичні властивості жовчних кислот відіграють важливу роль у механізмах секреції жовчі, оскільки, по-перше, різні жовчні кислоти істотно відрізняються між собою за фізико-хімічними властивостями, а отже, й за осмотичними [1]. По-друге, утворюючи жовчні міцели, жовчні кислоти втрачають здатність підтримувати осмотичний градієнт між жовчю та кров'ю [9, 10]. По-третє, наявна асинхронність у змінах інтенсивності секреції жовчі та секреції жовчних кислот при дії на печінку різних фізіологічно активних речовин [4]. Очевидно, жовчні кислоти є ендогенними регуляторами внутрішньоклітинних метаболічних процесів, активація або пригнічення яких призводить, зокрема, до змін інтенсивності секреції жовчі. Дія жовчних кислот на печінку може реалізуватися на різних рівнях внутрішньоклітинної регуляції метаболічних процесів. Серед останніх важливе значення мають внутрішньоядерні молекулярні процеси, зокрема, транскрипція, оскільки саме на цьому рівні здійснюється регуляторний вплив на гепатоцити різноманітних фізіологічно активних речовин, в тому числі гормонів, нейромедіаторів, регуляторних пептидів, продуктів метаболізму органічних сполук тощо. Проте, відомі лише поодинокі дані, які свідчать про здатність жовчних кислот впливати на транскрипційну активність ядер гепатоцитів. Так, встановлено, що регуляція жовчними кислотами активності холестерин-7 α -гидроксилази і стерол-27-гидроксилази - ферментів біосинтезу жовчних

кислот - відбувається на рівні транскрипції [16, 17, 19, 20]. На цьому рівні відбувається також регуляція жовчними кислотами біосинтезу їх специфічних рецепторів [14, 18] і активності Na^+ , K^+ -АТФази плазматичних мембран гепатоцитів [7].

Метою нашої роботи було експериментальне визначення здатності жовчних кислот регулювати секрецію жовчі у щурів, впливаючи на транскрипційну активність ядер клітин печінки.

Методика

Дослідження проведено на білих щурах-самцях масою 180-230 г у го-стрих дослідах під тіопенталовим наркозом (50 мг/кг). У відпрепаровану загальну жовчну протоку вводили тонку металеву голку, з'єднану поліетиленою трубкою з мікропіпеткою. Інтенсивність секреції жовчі (у мікролітрах на 1г печінки за 1 хв) визначали кожні 15 хв упродовж 4 год досліду. Вихідний рівень секреції жовчі визначали протягом 60 хв після канюлювання загальної жовчної протоки.

Таурохолеву та холеву кислоти у дозі 5 мкмоль/л і актиноміцин Д у дозі 2,5 мкг/100 г інфузували внутрішньопортально. Швидкість інфузії - 50 мкл/хв, час інфузії - 30 хв.

Ізольовані ядра клітин печінки щурів отримували як описано в попередній праці [5]. Розчини для виділення ядер містили інгібітор протеаз 1 ммоль/л фенілметилсульфонілфторид. Розчини цукрози (0,25 і 2,2 моль/л) для виділення ядер готували на буфері ТМК, який містив 50 ммоль/л *tris*-HCl, pH 7,4, 25 ммоль/л KCl, 5 ммоль/л MgCl_2 . Ізольовані ядра відмивали у 0,25 моль/л цукрозі, приготовленій на буфері ТМК. Кінцевий осад ядер, ресуспедованих у тому ж буфері, доводили до концентрації 1-2 мг ДНК на 1 мл. За даними світлової та електронної мікроскопії отримані препарати ядер не мали цитоплазматичних домішок, а їх структура була збережена. Відношення білок/ДНК в ізольованих ядрах клітин печінки становило 3,5-4,5, що відповідає прийнятим критеріям їх чистоти.

РНК-полімеразну активність ізольованих ядер гепатоцитів визначали за загальноприйнятим методом [6]. Інкубаційна суміш містила 0,12 моль/л KCl, 0,25 ммоль/л Mg-ацетат, 0,5 ммоль/л кожного з нуклеозидтрифосфатів - АТФ, ЦТФ, ГТФ і 0,05 ммоль/л $[^3\text{H}]$ -УТФ, а також 50 мкл суспензії ядер з концентрацією 1-2 мг ДНК на 1 мл. Кінцевий об'єм інкубаційної суміші становив 100 мкл. Реакцію зупиняли додаванням охолодженого розчину, що містив 10 %-ну трихлороцтову кислоту, 1 %-й пірофосфат натрію. Подальшу відмивку ядер від $[^3\text{H}]$ -УТФ, що не був включений у РНК, здійснювали на фільтрах "Millipore" з застосуванням приладу "Домбидот" (фірми "Диа-М", Росія). Холеву і таурохолеву кислоти додавали у концентрації $2,5 \cdot 10^{-9}$ - $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Ізольовані ядра інкубували при 25 °С. Кількість білка визначали за методом Лоурі і співав. [13], ДНК - за Бартоном [8].

Статистичну обробку отриманих експериментальних результатів здійснювали за загальноприйнятими методами з використанням критерію t Стюдента.

Результати та їх обговорення

Холева і таурохолева кислоти у щурів є природними гідрофільними жовчними кислотами, здатними утворювати міцели. Їх частка у загальному пулі жовчних кислот жовчі становить за нашими результатами 7,7 і 38,4 % відповідно [3].

Під час внутрішньопортальної інфузії холевої кислоти ($n = 13$) секреторна функція печінки пригнічувалася з $1,72 \pm 0,07$ до $1,38$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1} \pm 0,06$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1}$, або на 19,8 % ($P < 0,01$) (рис. 1). Протягом наступної години дослідження інтенсивність секреції жовчі залишалася нижчою за вихідний рівень у середньому на 16,9 %. На закінчення дослідження інтенсивність секреції жовчі становила $1,51$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1} \pm 0,08$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1}$, тобто була нижчою порівняно з вихідним значенням на 12,2 % ($P < 0,05$). За умов інфузії таурохолевої кислоти ($n = 15$) також відбувалося пригнічення секреції жовчі, причому воно було більш вираженим, ніж при інфузії холевої кислоти (див. рис. 1). Інтенсивність секреції жовчі знижувалася під час інфузії таурохолевої кислоти з $1,57 \pm 0,07$ до $1,18$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1} \pm 0,06$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1}$ або на 24,8 % ($P < 0,01$). Протягом наступних двох годин дослідження інтенсивність секреції жовчі залишалася нижчою за вихідне значення в середньому на 17 %. По завершенню дослідження інтенсивність секреції жовчі становила $1,33$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1} \pm 0,07$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1}$ тобто була нижчою порівняно з вихідним рівнем на 15,3 % ($P < 0,05$).

Встановлено [11, 12], що таурохолева кислота по-різному впливає на біосинтез жовчних кислот в ізольованих гепатоцитах щурів залежно від наявності в середовищі інкубації іонів гідрокарбонату. За нашими результатами (див. рис. 1) за наявності у розчині, в якому інфузували таурохолеву кислоту, іонів гідрокарбонату, секреція жовчі підсилювалася з $1,41 \pm 0,10$ до $1,61$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1} \pm 0,08$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1}$, або на 14,2 % ($P < 0,05$). Підсилення секреції жовчі

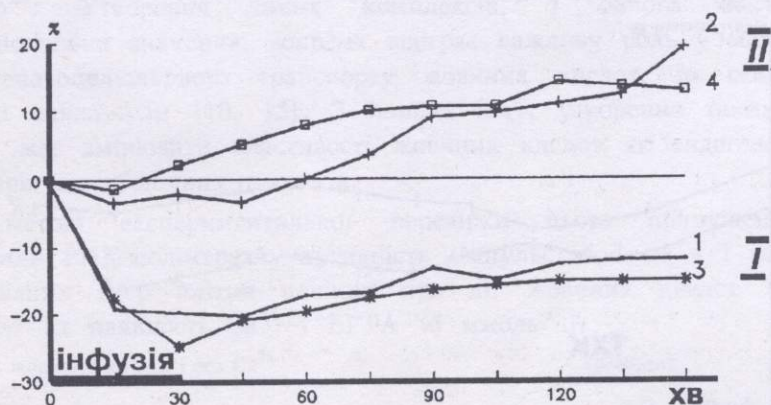


Рис. 1. Відносні зміни секреції жовчі при дії холевої (1, 2) і таурохолевої (3, 4) кислот за умов їх внутрішньопортальної інфузії у фізіологічному розчині (I) і у розчині, що містить іони гідрокарбонату (II).

до вказаного рівня відбувалося через 120 хв від початку, або через 90 хв по закінченню внутрішньопортальної інфузії таурохолевої кислоти.

За наявності у середовищі, в якому інфузували холеву кислоту, іонів гідрокарбонату також спостерігалось підсилення секреції жовчі. Холева кислота ($n = 8$) підсилювала секрецію жовчі протягом 120 хв після її інфузії. На цей час інтенсивність секреції жовчі підвищувалася з $1,46 \pm 0,08$ до $1,74$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1} \pm 0,09$ мкл/г печінки $\cdot$ хв $^{-1}$ або на 19,2 % ($P < 0,05$). Отже, жовчні кислоти, діючи на клітини печінки, можуть як підсилювати, так і пригнічувати секрецію жовчі. Функціональна активність печінки у цих випадках залежить, очевидно, від багатьох факторів, і, перш за все, від стану метаболічної активності гепатоцитів. Холева кислота пригнічувала секрецію жовчі за умов внутрішньопортальної інфузії у фізіологічному розчині, але якщо її інфузували у розчині, що містив іони гідрокарбонату, то секреція жовчі підсилювалась. Аналогічні зміни спостерігалися і при дії таурохолевої кислоти.

Пригнічення транскрипції актиноміцином Д попереджувало гіперхолеретичну дію таурохолевої кислоти, яку інфузували у розчині, що містив іони гідрокарбонату (рис. 2). Ці результати свідчать, що холеретична дія таурохолевої кислоти здійснюється, принаймні частково, на рівні транскрипції. Для того, щоб отримати безпосередні докази дії жовчних кислот на транскрипційну активність клітин печінки ми визначили вплив холевої та таурохолевої кислот на синтез РНК в ізольованих ядрах клітин печінки.

При додаванні в інкубаційне середовище жовчних кислот з'ясувалось, що таурохолева кислота в концентрації від $2,5 \cdot 10^{-9}$ до $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л підсилює транскрипційну активність ізольованих ядер клітин печінки на 47,6-71,4 % (таблиця). На відміну від таурохолевої холева кислота пригнічувала РНК-полімеразну активність ізольованих ядер гепатоцитів. За наявності в інкубаційному середовищі $2,5 \cdot 10^{-7}$ - $2,5 \cdot 10^{-6}$ моль/л холевої кислоти РНК-полімеразна активність ізольованих ядер клітин печінки пригнічувалася на 32,8 %. При дії холевої кислоти в кон-

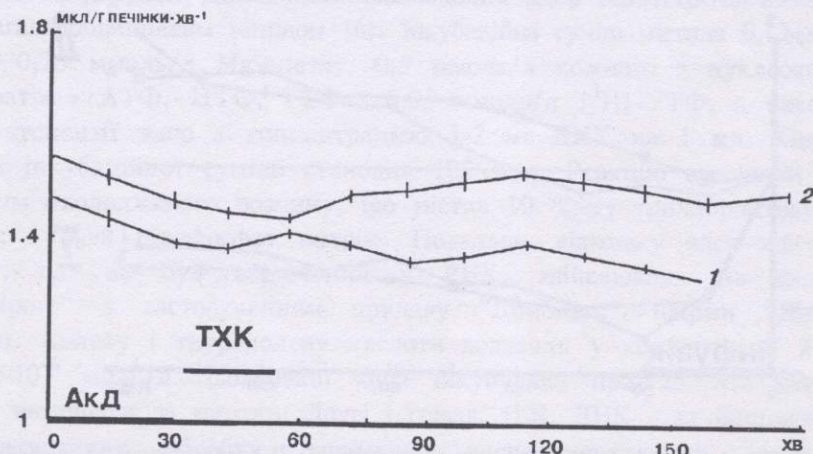


Рис. 2 Секреція жовчі при дії актиноміцину Д (1) і таурохолевої кислоти на фоні пригнічення транскрипції актиноміцином Д (2), АкД - актиноміцин Д, ТХК - таурохолева кислота.

РНК-полімеразна активність ($\text{імп} \cdot \text{хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ ДНК) ізольованих ядер клітин печінки при дії жовчних кислот у різних концентраціях, $n = 8$

Умова дослідю	РНК-полімеразна активність	Р
	$M \pm m$	
Контроль (без холевої кислоти)	40700 $\pm$ 132	
При додаванні холевої кислоти		
2,5 $\cdot$ 10 ⁻⁹ моль/л	39440 $\pm$ 82	>0,5
2,5 $\cdot$ 10 ⁻⁸ моль/л	34440 $\pm$ 104	<0,01
2,5 $\cdot$ 10 ⁻⁷ моль/л	27280 $\pm$ 268	<0,001
2,5 $\cdot$ 10 ⁻⁶ моль/л	27360 $\pm$ 118	<0,001
Контроль (без таурохолевої кислоти)	40700 $\pm$ 132	
При додаванні таурохолевої кислоти		
2,5 $\cdot$ 10 ⁻⁹ моль/л	67340 $\pm$ 298	<0,001
2,5 $\cdot$ 10 ⁻⁸ моль/л	69760 $\pm$ 352	<0,001
2,5 $\cdot$ 10 ⁻⁷ моль/л	60060 $\pm$ 252	<0,001
2,5 $\cdot$ 10 ⁻⁶ моль/л	65760 $\pm$ 296	<0,001

центрації 2,5 $\cdot$ 10⁻⁸ моль/л РНК-синтезуюча активність ізольованих ядер знижувалася на 15,4 %. У меншій концентрації (2,5 $\cdot$ 10⁻⁹ моль/л) холева кислота не впливала на РНК-синтезуючу активність ізольованих ядер гепатоцитів (див. таблицю).

Отже, жовчні кислоти беруть участь у регуляції біосинтезу РНК в ядрах клітин печінки, причому, у вільному стані холева кислота пригнічує біосинтез РНК, а у кон'югованому з таурином (таурохолева кислота) активує цей процес.

Жовчні кислоти як вільні, так і кон'юговані, утворюють у клітинах печінки комплекси з білками, ліпідами, неорганічними іонами, зокрема з Ca²⁺. Утворення таких комплексів, з одного боку, має функціональне значення, зокрема відіграє важливу роль у механізмах транспатоцелюлярного транспорту жовчних кислот, їх секреції у жовчні каналікули [10, 15]. З іншого боку, утворення таких комплексів має змінювати властивості жовчних кислот як ендогенних регуляторів метаболічних процесів.

З метою експериментальної перевірки цього припущення ми дослідили РНК-полімеразну активність (імпульс за 1 хв в 1 мг ДНК) ізольованих ядер клітин печінки при дії жовчних кислот (2,5 $\cdot$ 10⁻⁷ моль/л) за наявності Ca²⁺ і ЕГТА (5 ммоль/л):

Без жовчних кислот і без Ca ²⁺	40700 $\pm$ 132
	(n=8)
За наявності лише Ca ²⁺	
10 ⁻⁷ моль/л	42860 $\pm$ 138
	(n=8)

10^{-6} моль/л	36240±132 (n=8)
10^{-5} моль/л	39360±60 (n=9)
При додаванні холової кислоти і Ca^{2+}	
10^{-7} моль/л	32440±661 (n=8)
10^{-6} моль/л	33040±863 (n=9)
10^{-5} моль/л	36640±148 (n=6)
При додаванні таурохолевої кислоти і Ca^{2+}	
10^{-7} моль/л	57540±3642 (n=8)
10^{-6} моль/л	54420±1461 (n=9)
10^{-5} моль/л)	60860±2481 (n=6)
При додаванні ЕГТА	
без жовчних кислот	50020±190 (n=8)
з холовою кислотою	36380±110 (n=6)
з таурохолевою кислотою	69680±252 (n=6)

При додаванні Ca^{2+} у концентраціях від 10^{-7} до 10^{-5} моль/л РНК-синтезуюча активність ізольованих ядер клітин печінки не змінювалася. Однак при додаванні Ca^{2+} -хелатуючого реагенту ЕГТА РНК-полімеразна активність ізольованих ядер клітин печінки підвищувалася на 22,9 % ($P < 0,01$). Якщо в інкубаційну суміш додавали Ca^{2+} у вказаних концентраціях і холову кислоту у концентрації $2,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л пригнічуючий ефект холової кислоти на транскрипцію був менше виражений і становив 9,9-20,3 %. РНК-синтезуюча активність ізольованих ядер гепатоцитів при дії таурохолевої кислоти у концентрації $2,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л Ca^{2+} у концентраціях 10^{-7} - 10^{-5} моль/л підсилювалася на 34,3-54,6 %, тобто не відрізнялася за якісною характеристикою від дії таурохолевої кислоти на ізольовані ядра, хоча це підсилення було дещо меншим, ніж при дії лише таурохолевої кислоти. За наявності в середовищі інкубації Ca^{2+} -хелатуючого реагенту ЕГТА характер дії холової та таурохолевої кислот на транскрипційну активність ізольованих ядер клітин печінки зберігався.

Результати цих досліджень свідчать, що холова кислота може виявляти властивості інгібітора транскрипції, а таурохолева - активатора. У комплексі з Ca^{2+} жовчні кислоти зберігають ці властивості, хоча

вони є менш вираженими. Таким чином, ми вважаємо за можливе зробити висновок, що холеретична та холестатична дія жовчних кислот може здійснюватися на рівні регуляції транскрипційної активності гепатоцитів. Отже, не лише осмотичні властивості жовчних кислот мають важливе значення у механізмах утворення жовчі, а й їх метаболічні ефекти, тобто здатність регулювати метаболічні процеси в клітинах печінки, в тому числі на рівні молекулярних механізмів клітини, зокрема транскрипції.

Masyuk A.I., Kapralov A.A., Dolgova E.N.

BILE SECRETION AND TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF THE RAT LIVER CELLS NUCLEI UNDER THE BILE ACIDS ACTION

The intensity of rat's bile secretion under the intraportal infusion of cholic and taurocholic acids has been studied. The results demonstrate that bile acids decrease bile secretion rate under the infusion of these acids in the physiological saline, and increase bile secretion rate under the infusion in saline, with hydrocarbonic ions. Previous treatment by the transcriptional inhibitor actinomycin D affected the development of the hypercholeretic action of the taurocholic acid. The transcriptional activity of the isolated nuclei of liver cells is increased under taurocholic acid action, and decreased under the cholic acid action. The results show that choleretic effects of the bile acids is realised, at least, partially, on the level of the regulatory molecular mechanisms of the cell, the transcription among them.

Research Institute of Physiology,
Taras Shevchenko Kiev University, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ганиткевич Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма. - К.: Наук.думка, 1980. - 179 с.
2. Масюк А.И. Молекулярные и клеточные механизмы желче отделяющей функции печени // Успехи физиол. наук. - 1990. - 21, № 2. - С. 18-35.
3. Масюк А.И., Весельский С.П., Масюк Т.В. Жовчні кислоти за умов пригнічення біосинтезу білка в гепатоцитах // Молекулярна генетика і біофізика. - 1992. - № 17. - С. 105-108.
4. Масюк Т.В., Весельський С.П., Масюк А.И. Секреторна функція печінки при дії енкефалінів // Фізіол. журн. - 1995. - 41, № 3-4. - С. 3-8.
5. Петрова Г.В., Капралов А.А., Донченко Г.В. Влияние витамина Е на транскрипцию в изолированных ядрах и хроматине печени крыс в норме и при Е-гиповитаминозе // Биохимия. 1991. - 56, № 11. - С. 2025-2029.
6. Транскрипция и трансляция. Методы. М: Мир, 1987.- 285 с.
7. Ballard D.C., Simon F.R. Bile acid increase Na,K-ATP-ase activity in cultured hepatoma cells // Gastroenterology. - 1980. - 79, № 5, Pt. 2. - P. 1002.
8. Burton K. A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid // Biochem. J. - 1956. - 62, № 2. - P.315-319.
9. Coleman R., Rahman K. Lipid flow in bile formation // Biochim. and Biophys. Acta. - 1992. - 1125. - P. 113-133.
10. Coleman R. Biochemistry of bile secretion // Biochem. J. - 1987. - 244, № 2. - P. 249-261.
11. Davis R.A., Musso C.A., Malone-McNeal M. et al. Examination of bile acid negative feedback regulation in rats // J. Lipid Res. - 1988. - 29, № 2. - P. 202-211.
12. Duane W.C., McHale A.P., Hamilton J.H. Studies of feedback suppression of bile salt synthesis in the bile-fistula rat // Ibid. - P. 212-214.
13. Lowry O.H., Resebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. - 1951. - 193.- P. 265-275.
14. Gonzalez M.C., Sutherland E., Simon F.R. Regulation of hepatic transport of bile salts. Effect of protein synthesis inhibition on excretion of bile salts and their binding to liver surface membrane fractions // J. Clin. Invest. - 1979. - 3, № 4. - P. 684-694.
15. Nathanson M.H., Boyer J.L. Mechanisms and regulation of bile secretion // Hepatology. - 1991. - 14, № 3. - P. 551 - 566.

16. Pondak W.M., Heuman D.M., Hylemon P.B. et al. Failure of intravenous infusion of taurocholate to down-regulate cholesterol 7 α -hydroxylase in rats with biliary fistulas // Gastroenterology. - 1995. - 108, № 2. - P. 533-545.
17. Ramizer M.J., Karaoglu D., Haro D. et al. Cholesterol and bile acids regulate cholesterol 7 α -hydroxylase expression at the transcriptional level in culture and in transgenic mice // Mol. Cel. Biol. - 1994. 14, № 4. - P. 2809-2821.
18. Simon F.R., Sutherland E.M., Gonzalez M. Regulation of bile salt transport in rat liver: Evidence that increased maximum bile salt secretory capacity is due to increased cholic acid receptors // J. Clin. Invest. - 1982. - 70, № 2. - P. 401-411.
19. Twisk J., de Wit E.C.M., Princen H.M.G. Suppression of sterol 27-hydroxylase mRNA and transcriptional activity by bile acids in cultured rat hepatocytes // Biochem J. - 1995. - 305, pt. 2. - P. 505-510.
20. Twisk J., Hoekman M.F.M., Muller Z.M. et al. Structural aspects of bile acids involved in the regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol 27-hydroxylase // Eur. J. Biochem. - 1995. - 228, № 3. - P. 596-605.

Наук.-дослід. ін-т фізіології Київ. ун-ту
ім. Тараса Шевченка М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 1.08.96