

Спектр жовчних кислот у жовчі щурів при дії субстанції Р

Т.П. Лященко¹, П.К. Цапенко², О.А. Коваленко¹, Л.С. Карбовська¹,
С.П. Весельський¹, М.Ю. Макачук¹

¹ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка;

²Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: taras.lyashchenko@knu.ua, olga_kovalenko1@knu.ua

Нейропептиди родини тахікінінів відіграють важливу роль у нейрогуморальній регуляції вісцеральних функцій, однак характер їхнього впливу на тонкі механізми біосинтезу жовчних кислот потребує подальшого уточнення. Мета нашої роботи встановити нелінійні дозозалежні закономірності впливу субстанції Р на динаміку холерезу та провести дискретний аналіз спектра конкретних фракцій жовчних кислот для ідентифікації шляхів їхнього біосинтезу в гепатоцитах і ентерогепатичного транспорту. Дослідження проведено на 56 нелінійних білих щурах-самцях масою 200–250 г при субперитоніальному введенні субстанції Р у дозах 0,1; 1,0 та 10,0 мкг/100 г. Оцінювали об'ємну швидкість холерезу, відносний біохімічний склад жовчі методом тонкошарової хроматографії з наступною денситометрією; розраховували дебіт жовчних кислот, а також коефіцієнти їх кон'югації та гідроксилювання. Встановлено, що субстанція Р виявляє диференційований вплив на секреторну активність печінки залежно від дози. Найбільш виражений гіперхолеретичний ефект та активація кон'югуючих ферментних систем (зростання дебіту тауро- та глікохолатів) спостерігалися при введенні пептиду в дозі 1,0 мкг/100 г. Натомість при застосуванні доз (0,1 та 10,0 мкг/100 г) виявлено зниження коефіцієнтів кон'югації та гідроксилювання, що може вказувати на переважання синтезу жовчних кислот de novo. Отримані результати розширюють сучасні уявлення про роль тахікінінів у регуляції жовчоутворювальної функції печінки, зокрема щодо перемикання шляхів біосинтезу жовчних кислот, змін коефіцієнтів їх кон'югації та особливостей рецепторопосередкованої регуляції холерезу за умов тривалих кризових і стресових станів, особливо які супроводжуються больовим відчуттям.

Ключові слова: жовчні кислоти; холерез; субстанція Р; тахікініни; кон'югація; таурин; гліцин.

ВСТУП

Субстанція Р – нейропептид, який разом з нейрокінінами А і В належить до родини тахікінінів – нині в сучасній фізіології переважно асоціюється з передачею болю [1,2]. При цьому слід згадати, що відкриття цієї сполуки було зроблено понад 90 років тому von Euler і Gaddum (1931) у кишечнику коней як такої, що хімічно відрізняється від дії ацетилхоліну. Але вона насамперед була здатна викликати скорочення кишечника. Саме це відкриття стало відправною точкою інтенсивного вивчення

гуморальних регуляторних факторів пептидного походження та зумовило появу і самого терміну «субстанція Р» (від англ. “powder” – порошок), оскільки не була відома формула самого «порошку». Секреція жовчі регулюється складним комплексом пептидів, серед яких тахікініни посідають особливе місце завдяки їхній розповсюженості в ЦНС і травному тракті. Певні аспекти впливу цих пептидів на показники холерезу та склад органічних компонентів жовчі детально розглядалися у попередніх працях нашої наукової групи де було обґрунтовано їхній статус як істинних холеретиків [3].

Проте системна зміна вмісту окремих фракцій холатів в жовчі та перемикання шляхів їхнього біосинтезу за умов дії різних концентрацій субстанції Р залишаються нез'ясованими в повному обсязі. З огляду на сучасні дані щодо пептидергічної регуляції синтезу жовчних кислот [4] роль ендогенних простаноїдів у віковому аспекті формування холерезу [5] та встановлений зв'язок секреторних процесів із електричною активністю печінки [6], вивчення дозозалежного впливу субстанції Р на якісний спектр холатів є логічним продовженням фундаментальних досліджень у цьому напрямі.

Жовчні кислоти є специфічними компонентами жовчі, які утворюються паренхіматозними клітинами печінки з холестерину та секретуються за допомогою активного транспорту в каналікули та жовчні шляхи і, потрапляючи у тонку кишку, емульгують жирні компоненти їжі, полегшуючи їх перетравлення панкреатичною ліпазою [7–9]. Крім того, жовчні кислоти мають виражений антилітогенний ефект, протидіють утворенню жовчного каміння, у всякому разі холестеринового генезу, тобто підвищують солібілізуючу активність жовчі [10]. Нині їх розглядають також як ендогенні сигнальні молекули, що беруть участь у регуляції метаболічних і нейрогуморальних процесів. Показано, що жовчні кислоти реалізують свої ефекти через специфічні ядерні та мембранні рецептори активація яких впливає на синтез і транспорт жовчних кислот, функціональний стан гепатоцитів і системну метаболічну регуляцію [11].

За фізіологічних умов системний вплив жовчних кислот обмежується ентерогепатичним кругообігом, у межах якого вони циркулюють між кишечником і печінкою через порталну систему, а лише незначна їх частка елімінується з організму з каловими масами [12]. Водночас при його порушенні або при підвищенні концентрації жовчних кислот у крові вони можуть проявляти системні біологічні ефекти, що зумовлено їхньою стероїдною природою та взаємодією

з білками-переносниками і рецепторними системами [13]. Експериментально показано наявність жовчних кислот у структурах центральної нервової системи, де їм приписують антиоксидантні та нейромодуючі властивості, а також участь у регуляції апетиту, емоційних реакцій і когнітивних функцій [14, 15].

Мета нашого дослідження полягала у встановленні дозозалежних закономірностей змін об'ємної швидкості холерезу та ідентифікації їх у співвідношенні розширеного спектра вільних і кон'югованих жовчних кислот під впливом субстанції Р.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 56 нелінійних білих щурах-самцях масою 200–250 г. Під час досліду тварини знаходилися під тіопенталовим наркозом (5 мг/100 г, інтраперитонеально). Перед ним тварини голодували впродовж доби без обмеження доступу до води. Усі процедури з лабораторними тваринами було погоджено Комісією з біоетики ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 3 від 3 квітня 2023) і виконано з дотриманням вимог Європейської конвенції із захисту хребетних тварин та Закону України № 3447 IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

У наркотизованих щурів розтинали черевну порожнину і у відпрепаровану загальну жовчну протоку вводили тонку металеву канюлю, з'єднану поліетиленовою трубкою з мікропіпеткою. Інтенсивність секреції жовчі визначали через кожні 10 хв впродовж 2,5 год після введення біологічно активної речовини. Об'ємну швидкість секреції жовчі розраховували в нанолітрах на 1 г маси тіла за 1 хв. У кожній 30-хвилинній пробі жовчі визначали вміст жовчних кислот у секреті.

Концентрацію жовчних кислот визначали хроматографічно [4]. Жовчні кислоти розподілялися таким чином: таурохолева

(ТХК), суміш таурохенодезоксихолевої і тауродезоксихолевої (ТХДХК і ТДХК), глікохолева (ГХК), суміш глікохенодезоксихолевої і глікодезоксихолевої (ГХДХК і ГДХК), холева (ХК), суміш хенодезоксихолевої і дезоксихолевої (ХДХК і ДХК).

Більш інформативним з точки зору оцінки біохімічного складу жовчі є вивчення дебіту її органічних компонентів, оскільки при зменшенні рівня холерезу на тлі підвищення концентрації складових секрету їх абсолютний вміст може залишатися незмінним чи змінюватися протилежним чином. Дебіт жовчних кислот визначали множенням кількості речовини в одиниці об'єму на весь об'єм отриманої проби секрету і розраховували у нанограмах на 1 г маси тіла за 1 хв.

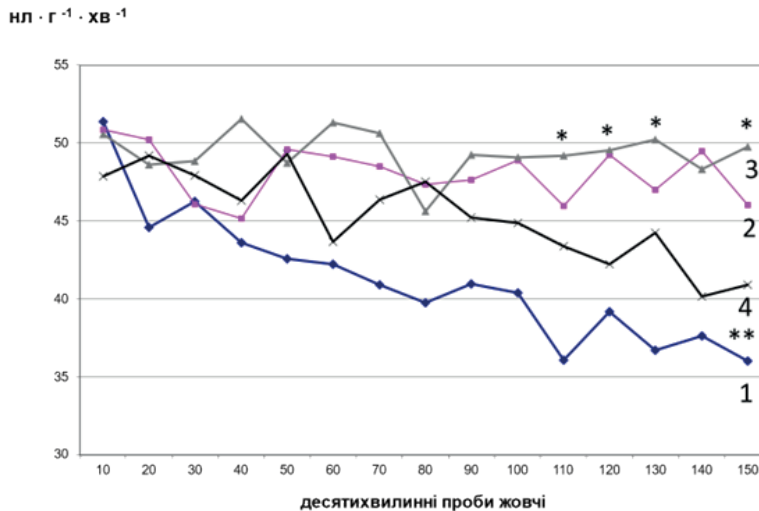
Субстанцію Р ("Sigma", США) вводили щурам субперитоніально в дозах 0,1; 1,0; 10,0 мкг/100 г. Контролем слугували тварини, яким у відповідній кількості вводили фізіологічний розчин без пептидного навантаження. Кількість і хімічний склад жовчі порівнювали з значеннями контрольних тварин, а за різницею судили про холеретичний вплив нейропептиду. Дослідження жовчоутворювальної функції у щурів мають деякі методичні особливості, оскільки їх проводили, зазвичай у гострих спробах на тваринах під загальним наркозом, у яких була канюльована загальна жовчна протока. Перш ніж досліджувати рівень холерезу і хімічний склад жовчі під впливом субстанції Р, ми з'ясували, як змінюється інтенсивність секреції жовчі протягом 2,5 год дослідження у тварин з канюльованою жовчною протокою, на яких не діяли ніякими біологічно активними чинниками, лише в черевну порожнину вводили 0,3 мл фізіологічного розчину, що і слугувало контролем.

Фактичний матеріал оброблено методом варіаційної статистики з використанням тесту Шапіро-Уїлка для перевірки нормальності розподілу та подальшим постфакторним аналізом за методом Шидака. Достовірними вважалися відмінності між контролем і дослідом при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Слід зазначити, що зміни секреторної активності печінки у контрольних тварин була досить складною – періоди зниження інтенсивності секреції жовчі змінювалися періодами її підсилення, насамперед це пов'язано зі зміною біосинтетичних і транспортних процесів у гепатоцитах, що слід розглядати як компенсаторну реакцію на постійну втрату організмом жовчних кислот – основних саморегуляторів холесекреції [16]. Але всі ці зміни мали чітку основну спрямованість до зменшення рівня холерезу (рисунок). Так, на початку дослідження інтенсивність секреції жовчі у контрольних щурів становила $51,48 \pm 2,68$ нл·г⁻¹·хв⁻¹, а в останній пробі – $36,02 \pm 4,11$ нл·г⁻¹·хв⁻¹, тобто рівень холерезу знизився на 29,9% ($P < 0,01$). Це ще раз підкреслює роль жовчних кислот як головного чинника саморегуляції жовчоутворювальної функції печінки.

При вивченні будь-якої фізіологічної функції за умов дії на організм біологічно активних речовин виникає питання щодо обґрунтування вибору доз, у яких відповідні препарати вводяться в організм тварин. Ми досліджували секреторну функцію печінки за умов субперитоніального введення субстанції Р у дозах 0,1; 1,0; 10,0 мкг/100 г. Наведені дози були обрані на підставі літературних даних, в яких йшлося про вивчення впливу цього пептидного регулятора на інші фізіологічні функції [3, 6, 8]. Показано, що печінка щурів чутлива до підвищення в крові концентрації субстанції Р (див. рисунок). Про це свідчить значна порівняно з контролем гіперхолесекреція, котра спостерігається впродовж 2,5 год після системного введення щурам цього нейропептиду. Так, субстанція Р у дозі 0,1 мкг/100 г впродовж усього дослідження підвищувала рівень холесекреції. Якщо результати контрольних вимірювань на початку дослідження сягали $51,48 \pm 2,68$ нл·г⁻¹·хв⁻¹, а наприкінці — $36,02 \pm 4,11$ нл·г⁻¹·хв⁻¹, то під впливом субстанції Р у дозі 0,1 мкг/100 г



Рівень холерезу у щурів під впливом субстанції Р у різних дозах: 1 – контроль; 2 – 0,1 мкг/100 г ; 3 – 1,0 мкг/100 г; 4 – 10,0 мкг/100 г відповідно; n = 14. *P < 0,05 порівняно з контролем, **P < 0,05 порівняно з початковим рівнем

становили $50,9 \pm 2,76$ та $46,04 \pm 3,25$ нл·г⁻¹·хв⁻¹ відповідно. Субстанція Р у більшій дозі (1,0 мкг/100 г) ще істотніше підсилювала секрецію жовчі.

Максимальною гіперхолесекреція була в 11, 12, 13 і 15-десятихвилинних проміжках і рівень холесекреції підвищувався на 36,3; 26,5; 36,8 і 38,1% відповідно (P < 0,05). Субстанція Р у дозі 10,0 мкг/100 г не так виражено змінювала рівень секреції жовчі, хоча стимулюючий характер її впливу зберігався. Максимальний рівень секреції в цих дослідах спостерігався через 110 хв після введення твариною препарату. Слід врахувати, що субстанція Р не тільки збільшує об'ємну швидкість жовчоутворення, а й змінює кут нахилу кривої динаміки холерезу впродовж дослідження. Про це свідчить співвідношення між показниками холесекреції останньої і першої проби жовчі, що виділялася в контролі і на фоні дії тахікініну. Так, у контрольних дослідах остання десятихвилинна проба жовчі на 29,9% була меншою за об'єм порівняно з першою, тоді як при застосуванні субстанції Р цей показник для доз 0,1 і 10,0 мкг/100 г сягав 11,5 і 23,1% відповідно, а в дозі 1,0 мкг/100 г відсоток змін становив 0,3%, але з протилежним знаком. Отже, субстанція Р зменшує кут

нахилу кривої динаміки холерезу впродовж дослідження, хоча її характер, притаманний контрольним спробам, зберігався.

Зважаючи на те, що субстанція Р та інші тахікініни в основному таким самим чином впливають на секреторну функцію шлунка, екзокринну функцію підшлункової залози і слинних залоз, можна дійти висновку, що вони відносяться до ендогенних регуляторів пептидної природи, функція яких полягає, зокрема, у підсиленні секреторних процесів в організмі [17, 18]. Гіперсекреторна реакція печінки щурів під впливом субстанції Р супроводжується підвищенням у жовчі концентрацій і дебіту хімічних складових секрету, особливо це стосується жовчних кислот. Аналіз отриманих даних дозволив встановити чітку дозозалежність впливу субстанції Р на холерез. Введення нейропептиду в дозі 1,0 мкг/100 г викликало стабільну гіперхолеретичну дію, тоді як використання мінімальної та максимальної доз (0,1 та 10,0 мкг/100 г) супроводжувалося менш вираженою реакцією, що вказує на недостатній чи надмірний вплив ліганду. Як було зазначено вище, методичні можливості дають змогу нам визначити у жовчі щурів із вільних жовчних кислот – окремо ХК і у

суміші – ХДХК і ДХК і із кон'югованих – окремо ТХК і ГХК, у суміші – ТХДХК і ТДХК; ГХДХК і ГДХК, загальний вміст яких у жовчі щурів контрольної групи становив $10,8 \pm 0,6$; $3,6 \pm 0,2$; $82,8 \pm 4,5$; $62,7 \pm 3,4$; $48,6 \pm 2,6$ і $4,6 \pm 0,2$ нл·г⁻¹·хв⁻¹ відповідно.

У відсотковому співвідношенні частка вільних жовчних кислот у жовчі щурів контрольної групи становила 7%. Частка таурокон'югатів була 62%, глікокон'югатів – 31% від загального вмісту жовчних кислот у жовчі. Слід зазначити, що метаболізм жовчних кислот при порушенні ентерогепатичного циклу змінюється впродовж кількох діб після припинення надходження жовчі у кишечник і повернення жовчних кислот у печінку. Перші прояви цих змін можуть бути зареєстровані вже через декілька годин від початку втрати жовчі твариною через канюлю. Але при впливі деяких нервових і гуморальних чинників вміст жовчних кислот при порушеній ентерогепатичній циркуляції не тільки не зменшується, а й зростає, частково через активацію їх біосинтезу в гепатоцитах, а також завдяки збільшенню поглинання з крові.

Враховуючи це, ми дослідили, чи змінюється кількісний і якісний склад жовчних кислот у жовчі щурів контрольної групи. Виявилось, що у них концентрація ТХК у жовчі практично не змінювалась, а наприкінці досліду мала тенденцію до зростання в предостанньому півгодинному періоді досліду (табл. 1). Концентрація інших таурокон'югатів, ТХДХК і ТДХК, впродовж всього досліду трималася на однаковому рівні, а в останній півгодині зменшилася на 14,2% ($P < 0,05$). Що стосується глікокон'югатів, то вміст ГХДХК і ГДХК практично не змінювався, а ГХК протягом досліду знижувалась, але не достовірно. Концентрації вільних жовчних кислот у жовчі без пептидного навантаження вірогідно не змінювалися, хоча мали певну тенденцію до зниження (див. табл. 1). Зміни рівня холерезу і концентрацій складових частин жовчі неминуче позначаються на їх дебіті у секреті.

В наших контрольних дослідах на фоні зниження рівня холесекреції концентрація холатів практично не змінювалась, а дебіт жовчних кислот значно зменшився (див. табл. 2).

Треба зазначити, що субстанція Р, збільшуючи об'ємну швидкість холерезу, майже у всіх дозах підвищувала концентрації більшості жовчних кислот (див. табл. 1), а, відповідно, і дебіт останніх у секреті. Так, тахікінін у дозі 0,1 мкг/100 г упродовж всього досліду збільшував концентрацію ТХК у жовчі щурів, в останній пробі ці зміни були вірогідними і становили 23,5%. Дебіт ТХК у жовчі тварин при дії речовини Р в цій дозі вірогідно зростав вже в другому півгодинному проміжку після введення препарату, і продовжував підвищуватися порівняно з контролем до закінчення досліду (див. табл. 3).

У дозі 1,0 мкг/100 г субстанція Р вірогідно підвищувала концентрацію ТХК у жовчі тварин в 2–5-й півгодинних пробах на 23, 29, 3, 28, 6 і 34, 7% відповідно (див. табл. 1). Таким самим чином змінюється дебіт жовчних кислот у секреті, і максимального значення збільшення загального вмісту ТХК у жовчі щурів при дії 1,0/100 г речовини Р набуває в останній пробі (на 104%; див. табл. 3). Стосовно більшої дози (10,0/100 г), то цей показник підвищувався впродовж години, а потім до закінчення досліду знижувався, але ці зміни були не значними (див. табл. 1). Дебіт ТХК при цьому мав тенденцію до зростання, але ці зміни не були достовірними.

Аналогічним чином змінювалися концентрації інших таурокон'югатів (ТХДХК і ТДХК) у жовчі при введенні субстанції Р. При застосуванні в дозах 0,1 і 1,0 мкг/100 г ці зміни постійно зростали, але вірогідними були тільки для другої дози в останній пробі досліду (47,8%; $P < 0,01$; див. табл. 1). При дозі речовини 10,0 мкг/100 г упродовж всього досліду концентрація ТХДХК і ТДХК зменшувалася, вірогідними ці зміни були в першій півгодинній пробі ($P < 0,05$), а наприкінці досліду збільшувалася до $96 \pm 1,13$ мг%

щодо $92 \pm 2,7$ мг% у контролі, але ці зміни були не вірогідними. Дебіт ТХДХК і ТДХК під впливом субстанції Р у дозах 0,1 і 1,0

мкг/100 г зростав упродовж усього терміну. Для дози 0,1 мкг/100 г вірогідними були зміни в другій (28,2%), третій (21%) і п'ятій (40,2%)

Таблиця 1. Концентрація жовчних кислот (мг%) у жовчі щурів під впливом субстанції Р у різних дозах ($M \pm m$; $n = 14$)

Схема дослідю	Тауро- холева	Суміш тауро- хенодезокси- холевої і тауро- дезоксихолевої	Глікохо- лева	Суміш гліко- хенодезокси- холевої і глікодезокси- холевої	Холева	Суміш хено- дезокси- холевої і дезокси- холевої
11:00 -11:30						
Контроль	168,8±8,1	107,0±1,4	138,0±11,3	10,2±1,6	23,7±4,4	7,8±0,7
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	176,6±5,8	109,1±8,9	124,3±15,9	13,0±1,4	22,0±0,6	8,3±1,2
1,0 мкг/100 г	203,6±25,2	117,7±10,6	127,0±11	11,8±1,1	21,2±2,7	8,5±0,7
10,0 мкг/100 г	176,9±5,3	94,0±4,6*	142,2±12,8	15,6±0,4*	27,0±2,8	12,6±1,9*
11:30 -12:00						
Контроль	174±2,6	99,9±2,6	131,8±12,4	10,1±1,2	24,1±5,1	7,0±0,7
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	197,6±9,5	124,1±13,3	124,2±13,8	13,2±1,6	24,2±0,8	9,2±1,0
1,0 мкг/100 г	226±20,2*	131,2±17,7	132,2±12,2	12,0±1,2	24,1±3,6	8,7±0,5
10,0 мкг/100 г	174±4,7	96,1±10,7	147,2±11,4	16,1±0,9*	32,3±1,3	12,6±1,3*
12:00 -12:30						
Контроль	173,3±2,5	104,5±4,0	135,8±13,0	9,5±1,2	22,6±5,4	7,5±0,9
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	189±7,7	111,7±14,2	116,1±10,4	12,6±1,7	21,8±1,6	8,7±1,1
1,0 мкг/100 г	245±21,5*	135,1±15,0	130,6±14,7	12,0±1,8	23,0±1,9	8,6±0,9
10,0 мкг/100 г	167,1±3,7	95,6±10,1	156,5±8,9	14,8±0,7*	32,3±3,3	13,1±0,4*
12:30 -13:00						
Контроль	179,3±7,0	107,1±7,7	131,0±12,8	9,4±1,4	21,4±5,0	7,2±0,9
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	201,3±16,9	113,8±13,2	116,4±11,7	12,3±1,7	22,9±1,7	8,8±1,6
1,0 мкг/100 г	251,3±28,3*	135,1±15,5	136,6±5,4	11,4±1,7	23,9±1,5	8,1±0,8
10,0 мкг/100 г	166,6±8,2	95,7±5,5	143,4±13,1	14,4±0,8*	32,9±2,8	13,6±0,5*
13:00 -13:30						
Контроль	170,3±4,5	91,8±2,73	126,1±12,4	9,9±0,5	20,6±4,8	7,4±1,3
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	210,2±15,3*	118,8±11,8	115,2±10,9	11,9±1,5	22,8±1,6	9,4±1,9
1,0 мкг/100 г	260,7±25,7*	135,9±8,2*	124,3±12,4	11,1±1,7	25,4±1,7	8,2±0,6
10,0 мкг/100 г	163,1±10,2	96,1±1,13*	147,3±5,8	15,0±0,7*	32,0±1,8*	13,7±0,8*

Примітка: тут і в табл. 3 * $P < 0,05$ щодо контролю.

півгодинних пробах жовчі ($P < 0,05$). При дозі пептиду 1,0 мкг/100 г вірогідно збільшувався дебіт ТХДХК і ГДХК, починаючи з другого півгодинного терміну і до його закінчення, але максимальним таке збільшення було, як і у разі з ТХК, в останній пробі жовчі (98,8%; $P < 0,05$; див. табл. 3).

Тахікнін у дозі 10,0 мкг/100 г вірогідно не змінював дебіт ТХДХК і ГДХК, хоча спостерігалась певна тенденція до збільшення. Субстанція Р збільшувала концентрацію ГХК, особливо при дозі 10,0 мкг/100 г (див. табл. 1). Аналогічні зміни і дебіту ГХК спостерігались у жовчі щурів, що виділялася під впливом субстанції Р. При спільній тенденції до збільшення загального вмісту цієї кислоти в секреті вірогідним це було лише для субстанції Р в дозі 1,0 мкг/100 г у четвертому півгодинному проміжку (25%; $P < 0,05$; див. табл. 3).

Встановлено нелінійну дозозалежність впливу субстанції Р на вміст глікокон'югатів (суміші ГХДХК і ГДХК) в жовчі. Попри загальну стимулюючу дію пептиду на холерез, характер відповіді не був прямо пропорційним: зокрема, введення низької дози (0,1 мкг/100 г) ініціювало більш суттєве зростання відсоткового вмісту цих кислот порівняно з ефектом дози 1,0 мкг/100 г. Найбільш виражена та тривала активація секреції спостерігалася при застосуванні 10,0 мкг/100 г, де концентрація суміші ГХДХК і ГДХК наприкінці спостереження перевищувала контроль на 34% ($P < 0,01$; див. табл. 1). Диференційований характер впливу

підтверджується і часовим зміщенням піку дебіту: для дози 0,1 мкг максимум припадав на другу півгодину проби (31,7%, $P < 0,001$), тоді як для 10,0 мкг — на третю (44,3%, $P < 0,01$; див. табл. 3). Така нелінійність секреторної відповіді на вплив субстанції Р в різних дозах може вказувати на складну реакцію кон'югуючих систем гепатоцитів та жовчовивідних шляхів, системи повернення жовчних в гепато-біліарній системі.

Відсотковий вміст ХК у жовчі щурів залишався незмінним при введенні субстанції Р у дозі 0,1 мкг/100 г, тоді як у дозах 1,0 і 10,0 мкг/100 г він стабільно підвищувався, хоча зміни ці не були вірогідними (див. табл. 1). Беручи до уваги гіперхолесекреторну реакцію печінки щурів під впливом субстанції Р, цілком закономірним є підвищення дебіту ХК у жовчі при незмінній чи дещо підвищеній її концентрації відносно контролю. Так, субстанція Р підвищувала загальний вміст ХК у секреті упродовж усього дослідження, але вірогідним це збільшення було в передостанньому півгодинному проміжку для доз 1,0 і 10,0 мкг/100 г, а в останньому — для всіх трьох доз. Максимальні значення при дії різних доз (0,1 мкг/100 г; 1,0 мкг/100 г; 10,0 мкг/100 г) становили збільшення на 42,1, 63,1 і 59,2% відповідно (див. табл. 3).

Секреція з жовчю щурів ХДХК і ДХК виявилася більш залежною від концентрації субстанції Р у крові. Нейропептид у всіх дозах суттєво підвищував їх, але лише при введенні 10,0 мкг/100 г майже впродовж

Таблиця 2. Дебіт жовчних кислот ($\text{нг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$) у жовчі щурів контрольної групи ($M \pm m$; $n = 14$)

Проби	Таурохолева	Суміш таурохолено-дезоксихолевої і тауродезоксихолевої	Глікохолева	Суміш глікохолено-дезоксихолевої і глікодезоксихолевої	Холева	Суміш хенодезоксихолевої і дезоксихолевої
Перша	82,8±4,5	48,6±2,6	62,7±3,4	4,6±0,2	10,8±0,6	3,6±0,2
Остання	62,6±6,4*	33,8±3,5*	46,4±0,2*	3,3±0,3*	7,6±0,8*	2,7±0,3*
% зміни	24,4	30,4	26	28,3	29,6	25

* $P < 0,05$ щодо значень першої проби.

Таблиця 3. Дебіт жовчних кислот ($\text{нг} \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{хв}^{-1}$) у жовчі щурів під впливом субстанції Р у дозах 0,1; 1,0; 10,0 мкг/100 г маси тіла тварини ($M \pm m$; $n = 14$)

Схема досліджу	Таурохолева	Суміш тауро-хенодезоксихолевої і тауродезоксихолевої	Глікохолева	Суміш гліко-хенодезоксихолевої і глікодезоксихолевої	Холева	Суміш хенодезоксихолевої і дезокси-холевої
11:00-11:30						
Контроль	82,8±4,5	48,6±2,6	62,7±3,4	4,6±0,2	10,8±0,6	3,6±0,2
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	83,7±7,7	51,7±4,7	58,9±5,4	6,2±0,6*	10,4±1,0	3,8±0,4
1,0 мкг/100 г	100,5±11,0	58,2±6,5	63,2±7,1	5,9±0,7	10,4±1,2	4,4±0,5
10,0 мкг/100 г	86,1±10,5	47,4±5,8	64,3±7,9	7,3±0,9	12,1±1,5	5,8±0,7*
11:30 -12:00						
Контроль	74,8±3,8	42,8±2,2	56,5±2,9	4,3±0,2	10,3±0,5	3,0±0,2
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	94,8±4,4*	59,6±2,5*	59,6±2,7	6,3±0,3**	11,6±0,5	4,4±0,2
1,0 мкг/100 г	114,3±11,2*	66,2±6,5*	66,7±6,5	6,1±0,6*	12,1±1,2	4,6±0,4*
10,0 мкг/100 г	92,9±13,2	56,2±8,0	65,5±9,3	7,4±1,1*	13,0±1,9	5,6±0,8*
12:00 -12:30						
Контроль	71,9±6,2	42,4±3,6	55,1±4,7	3,9±0,3	9,2±0,8	3,0±0,3
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	94,5±7,1*	53,4±4,2*	55,4±4,4	6,0±0,5*	10,4±0,8	4,2±0,3*
1,0 мкг/100 г	118,9±8,9*	65,5±4,9*	63,6±4,8	5,8±0,4*	11,2±0,8	4,4±0,3**
10,0 мкг/100 г	92,8±11,3	54,7±6,7	69,9±8,5	7,0±0,8*	13,0±1,6	5,6±0,7*
12:30 -13:00						
Контроль	69,3±7,3	41,3±4,3	50,5±5,3	3,6±0,4	8,3±0,9	2,8±0,3
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	96,7±9,5*	54,7±5,4	55,9±5,5	5,9±0,6*	11,0±1,1	4,2±0,4
1,0 мкг/100 г	123,9±8,2*	66,5±4,4*	67,5±4,4*	5,4±0,4*	11,8±0,8*	3,9±0,3*
10,0 мкг/100 г	85,3±11,3	49,6±6,6	59,2±7,8	6,1±0,8*	12,6±1,7*	5,2±0,7*
13:00 -13:30						
Контроль	361,4±28,2	208,9±16,2	271,2±21,1	19,7±1,4	46,2±3,6	15,1±1,3
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	469,6±38,9*	275,9±22,6*	284,5±28	30,1±2,6*	54,2±4,5	21,2±1,8*
1,0 мкг/100 г	586,5±49,7*	323,6±27,6*	322,3±27,7	28,6±2,5*	57,9±5,0	21,1±1,8*
10,0 мкг/100 г	440,2±56,8	255,9±33,2	318,4±41	34,1±4,2*	62,8±8,2	27,2±3,5*
11:00-13:30						
Контроль	361,4±28,2	208,9±16,2	271,2±21,1	19,7±1,4	46,2±3,6	15,1±1,3
Субстанція Р						
0,1 мкг/100 г	469,6±38,9*	275,9±22,6*	284,5±28	30,1±2,6*	54,2±4,5	21,2±1,8*
1,0 мкг/100 г	586,5±49,7*	323,6±27,6*	322,3±27,7	28,6±2,5*	57,9±5,0	21,1±1,8*
10,0 мкг/100 г	440,2±56,8	255,9±33,2	318,4±41	34,1±4,2*	62,8±8,2	27,2±3,5*

усього досліджу зміни концентрації були вірогідними (див. табл. 1). Максимального значення це підвищення набуває в передостанній півгодинній пробі (88,9%; $P < 0,001$). Починаючи з першої проби після введення тваринам нейропептиду в такій самій дозі вірогідно підвищувало дебіт ХДХК і ДХК, а вже з другої півгодинної проби змінювався загальний вміст цих вільних жовчних кислот при всіх трьох дозах, коли спостерігається максимальне значення (46,7; 53,3; 86,7% відповідно; $P < 0,01$; див. табл. 3).

Отже, субстанція Р максимально збільшувала продукцію жовчі при дозі 1,0 мкг/100г на 21,1%, дебіт сумарних холатів на 45,3%, ТХК на 62,3%, ТХДХК і ТДХК на 55%, ГХК на 18,8%, при дозі 10,0 мкг/100 г ГХДХК і ГДХК – на 73,1%, ХК на 35,9%, ХДХК і ДХК на 80,1%.

Субстанція Р у дозі 1,0 мкг/100 г підвищувала коефіцієнт кон'югації (14,14 – контроль, 15,94 – дослід), підсилюючи тим самим солібілізуючу здатність секрету і активність кон'югуючих ферментних систем у клітинах печінки. На коефіцієнт гідроксилювання пептид у такій дозі не впливав. У дозах 0,1 і 10,0 мкг/100 г він зменшував значення цих коефіцієнтів, що свідчить про переважання в гепатоцитах синтезу жовчних кислот *de novo* через мітохондріальнозалежний шлях синтезу жовчних кислот. Механізм гіперхолеретичного ефекту субстанції Р базується на активації нейрокінінових рецепторів (NK1, NK2, NK3) та каскадних реакцій за участю автономної нервової системи [19, 20]. Такий тип відповіді характерний для стресіндукованих змін функціонального стану печінки, що підтверджується кореляцією між електричною активністю органа та динамікою обміну холатів [6]. Отже, беручи до уваги, що речовина Р є основним (важливим) нейромедіатором болю і її дія не обмежується тільки синаптичними щілинами, а й може бути системною, збільшення її титру в крові призводить до посилення травної здатності

жовчі активацією економічного біосинтезу вільних жовчних кислот та їх подальшої кон'югації [21]. Це посилює солібілізаційні властивості секрету, підвищуючи емульгацію жирів, що є важливим адаптивним механізмом при стресових станах [22]. Таким чином, субстанція Р виступає регулятором, який адаптує холерез як функцію відповідно до фізіологічних потреб організму при системній відповіді на подразнення. Особливої уваги заслуговує зміна спектра індивідуальних жовчних кислот. Нами встановлено, що розраховані коефіцієнти кон'югації та гідроксилювання демонструють різноспрямовані вектори залежно від концентрації субстанції Р. Так, при дозі 1,0 мкг/100 г спостерігалось зростання дебіту таурокон'югатів, тоді як при 10,0 мкг/100 г вектор метаболізму зміщувався в бік синтезу вільних холатів *de novo*. Такий детальний аналіз фракцій дозволяє переглянути попередні узагальнені уявлення про роль тахікінінів у гепатобіліарній системі, додаючи нові знання про дозозалежну модуляцію функцій паренхіми печінки.

Виявлена нелінійна дозозалежна перебудова спектра жовчних кислот дозволяє розглядати отримані результати в ширшому фізіологічному контексті. За умов критичних і стресових станів, зокрема таких, що супроводжуються больовим чинником, на тлі виснаження симпато-адреналової системи, яка в нормі ініціює глікогеноліз і глюконеогенез, субстанція Р зумовлює підвищення вмісту ліпідів у крові. Це забезпечує додаткове джерело енергії за рахунок стимуляції емульгуючої функції жовчі. Відповідно, тахікінін можна віднести до чинників стрес-реалізуючих систем а антагоністи тахікінінових рецепторів вивчалися як новий клас антидепресантів [23].

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що модулювальний вплив субстанції Р на жовчосекреторну функцію

печінки має нелінійний дозозалежний характер. Найвищу функціональну активність гепатоцитів ініціює пептид у дозі 1,0 мкг/100 г, тоді як використання межових концентрацій (0,1 та 10,0 мкг/100 г) супроводжується ефектом недостатності регулятора чи «рецепторного насичення» або «вислизання», що обмежує інтенсивність холеретичної відповіді.

2. Під дією нейропептиду відбувається якісна перебудова спектра холатів через диференційовану активацію ферментних систем. Якщо доза 1,0 мкг/100 г спрямована на оптимізацію процесів кон'югації жовчних кислот з гліцином і таурином тим самим підвищуючи сольобілізуючу здатність жовчі, то у дозах 0,1 та 10,0 мкг/100 г регулятор активує енергетично-економний шлях біосинтезу вільних жовчних кислот *de novo*.

3. Аналіз співвідношення триокси- та диоксихоланових структур свідчить про вибірково активацію альтернативного (мітохондріального) шляху формування пулу жовчних кислот під впливом тахікініну. Це вказує на здатність субстанції P відігравати роль «метаболического перемикача», який адаптує активність холестерин-7 α -гідроксилази до поточних потреб організму.

4. Субстанція P реалізує істинно холеретичний ефект, комплексно змінюючи динаміку фільтраційно-дифузійних процесів у печінці. Це дає змогу розглядати його як критичну ланку адаптації холерезу до умов системної відповіді організму, що забезпечує підтримку колоїдної стабільності секрету.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**T.P. Liashchenko¹, P.K. Tsapenko²,
O.A. Kovalenko¹, L.S. Karbovska¹, S.P. Veselsky¹,
M.Yu. Makarchuk¹**

BILE ACID SPECTRUM IN RAT BILE AT THE ACTION OF SUBSTANCE P

¹ ESC "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv;

² Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;

e-mail: taras.lyashchenko@knu.ua, olga_kovalenko1@knu.ua

Tachykinin neuropeptides play a crucial role in the neurohumoral regulation of visceral functions; however, the nature of their influence on the fine mechanisms of bile acid biosynthesis requires further clarification. The study aimed to establish non-linear dose-dependent patterns of the effect of substance P on choleresis dynamics and to conduct an analysis of specific bile acid fractions to identify their biosynthetic pathways in hepatocytes and enterohepatic transport. The study was conducted on 56 non-linear male white rats (weighing 200–250 g) under subperitoneal administration of substance P at doses of 0.1, 1.0, and 10.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ of body weight. The volumetric rate of choleresis and the relative biochemical composition of bile were evaluated using thin-layer chromatography followed by densitometry. The bile acid output, as well as conjugation and hydroxylation coefficients, were calculated. It was established that substance P exerts a differentiated effect on the secretory activity of the liver depending on the dose. The most pronounced hypercholeric effect and activation of conjugating enzyme systems (increased output of tauro- and glycocholates) were observed at a dose of 1.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$. In contrast, the use of extreme doses (0.1 and 10.0 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) revealed a decrease in conjugation and hydroxylation coefficients, suggesting a metabolic switch towards the *de novo* synthesis of free cholates. The results expand current understanding of the role of tachykinins in the regulation of liver bile formation, particularly regarding the switching of bile acid biosynthetic pathways, changes in their conjugation coefficients, and the specifics of receptor-mediated regulation of choleresis under conditions of prolonged crisis and stress states, especially those accompanied by pain.

Key words: bile acids; choleresis; substance P; tachykinins; conjugation; taurine; glycine.

REFERENCES

1. MacDonald D, Jayabalan M, Seaman J, Balaji R, Nickolls A, Chesler A. Pain persists in mice lacking both Substance P and CGRP α signaling. *eLife*. 2024;13:RP93754. doi:10.7554/elife.93754
2. Sato K, Kato T, Aizawa T. Substance P in pain transmission and neurogenic inflammation. *Int J Mol Sci*. 2022;23(3):1584. doi:10.3390/ijms23031584.

3. Spivak LS, Makarchuk MY, Liashchenko TP, Veselsky SP. Influence of natural tachykinins on bile formation in rats. *Fiziol Zh.* 2005;51(4):61-4. [Ukrainian].
4. Moroz OF, Veselsky SP, Liashchenko TP. Age-related effects of bombesin on bile secretory function of the liver. *Fiziol Zh.* 2020;66(5):46-54. doi:10.15407/fz66.05.046.
5. Liashchenko TP, Zavhorodnii MP, Zhydyk MYu, Pohrebna AV, Veselsky SP, Tsapenko PK. Influence of endogenous prostanoids on the bile secretory function in rats of different age groups. *Bull Taras Shevchenko Natl Univ Kyiv Ser Biol.* 2020;80(1):63-8. doi:10.17721/1728_2748.2020.80.63-8.
6. Tsapenko PK, Liashchenko TP, Vesel'sky SP. Liver electrical activity upon epinephrine action. *Fiziol Zh.* 2024;70(4):63-71. doi:10.15407/fz70.04.063.
7. Jia W, Wei M, Rajani C, Zheng X. Targeting the alternative bile acid synthetic pathway for metabolic diseases. *Protein Cell.* 2021;12(5):411-25. doi:10.1007/s13238-020-00804-9.
8. Di Gregorio, M, Cautela, J, Galantini, L. Physiology and physical chemistry of bile acids. *Int J Mol Sci.* 2021, 22(4), 1780. <https://doi.org/10.3390/ijms22041780>.
9. Omer E, Chiodi C. Fat digestion and absorption: Normal physiology and pathophysiology of malabsorption, including diagnostic testing. *Nutr Clin Pract.* 2024;39 Suppl 1:S6-S16. <https://doi.org/10.1002/ncp.11130>.
10. Fleishman J, Kumar S. Bile acid metabolism and signaling in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Sig Transduct Target Ther.* 2024;9(1):97. doi: 10.1038/s41392-024-01811-6.
11. Thibaut M, Bindels LB. Crosstalk between bile acid-activated receptors and microbiome in entero-hepatic inflammation. *Trends Mol Med.* 2022;28(3):223-36. doi: 10.1016/j.molmed.2021.12.006.
12. Jia W, Li Y, Cheung K, Zheng X. Bile acid signaling in the regulation of whole-body metabolic and immunological homeostasis. *Sci China Life Sci.* 2024;67(5):865-78. doi:10.1007/s11427-023-2353-0.
13. Kiriya Y, Nochi H. The biosynthesis, signaling, and neurological functions of bile acids. *Biomolecules.* 2019; 9(6):232. <https://doi.org/10.3390/biom9060232>.
14. Xing C, Huang X, Wang D, Yu D, Hou S, Cui H, et al. Roles of bile acids signaling in neuromodulation under physiological and pathological conditions. *Cell Biosci.* 2023;13:101. doi:10.1186/s13578-023-01053-z.
15. dahosa S, Diarra R, Ranu H, Nasiri R, Higuchi S. Evidence and mechanism of bile acid-mediated gut-brain axis in anxiety and depression. *Am J Pathol.* 2024 Oct 24:S0002-9440(24)00381-1. doi:10.1016/j.ajpath.2024.10.019.
16. Perino A, Demagny H, Velazquez-Villegas L, Schoonjans K. Molecular physiology of bile acid signaling in health, disease, and aging. *Physiol Rev.* 2021;101(2):683-731. doi: 10.1152/physrev.00049.2019.
17. Ceci L, Francis H, Zhou T, Giang T, Yang Z, Meng F, et al. Knockout of the tachykinin receptor 1 in the *Mdr2*^{-/-} mouse model of primary sclerosing cholangitis reduces biliary damage and liver fibrosis. *Am J Pathol.* 2020;190(10):2062-78. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.07.007.
18. Nässel DR, Zandawala M, Kawada T, Satake H. Tachykinins: Neuropeptides that are ancient, diverse, widespread and functionally pleiotropic. *Front Neurosci.* 2019;13:1262. doi: 10.3389/fnins.2019.01262.
19. García-Aranda M, Téllez T, McKenna L, Redondo M. Neurokinin-1 receptor (NK-1R) antagonists as a new strategy to overcome cancer resistance. *Cancers.* 2022;14(9):2255. doi:10.3390/cancers14092255.
20. Petersen J, Pavlovskiy A, Madsen J, Schwartz T, Frimurer T, Olsen O. Challenging activity and signaling bias in tachykinin NK1 and NK2 receptors by truncated neuropeptides. *J Biol Chem.* 2025;301:108522. doi: 10.1016/j.jbc.2025.108522.
21. Humes C, Sic A, Knezevic NN. Substance P's impact on chronic pain and psychiatric conditions—a narrative review. *Int J Mol Sci.* 2024;25(11):5905. doi:10.3390/ijms25115905.
22. Durník R, Sindlerova L, Babica P, Jurce O. Bile acids transporters of enterohepatic circulation for targeted drug delivery. *Molecules.* 2022;27(9):2961. doi:10.3390/molecules27092961.
23. Li M, Zhang H, Zhang S, Peng Y, Ding L, Zhang Y, Min P. Potential therapeutic effect of NK1R antagonist in diabetic non-healing wound and depression. *Front Endocrinol.* 2023;13:1077514. doi:10.3389/fendo.2022.1077514.

*Матеріал надійшов
до редакції 25.12.2025*