

Альона Ляшевич,
Євдокія Решетнік,
Віра Колбасинська,
Станіслав Весельський,
Микола Макарчук

Вплив корвітину на ліпідний спектр жовчі щурів з експериментальною гіперхолестеринемією

У роботі досліджено ліпідний спектр жовчі самців щурів із доксициклін-індукованою гіперхолестеринемією та при застосуванні корвітину в умовах експериментальної гіперхолестеринемії. Дослідження впливу корвітину (1 мг/кг, 7 днів) на ліпідний спектр жовчі в умовах доксициклінового навантаження (540 мг/кг, 5 днів) проводили на щурах-самцях масою 185–230 г (n=29). У гострих дослідках у тварин, що перебували під тіопенталовим наркозом (70 мг/кг), отримували жовч, у якій методом тонкошарової хроматографії, модифікованим у нашій лабораторії, визначали вміст фосфоліпідів, холестеролу та його етерів, вільних жирних кислот, тригліцеридів. Виявлено, що при доксициклін-індукованій гіперхолестеринемії в крові самців щурів зростає рівень загального холестеролу крові та зменшується концентрація вільного холестеролу жовчі. Корвітин усуває гіперхолестеринемічний ефект доксициклінового навантаження, знижуючи рівень загального холестеролу в крові й викликає істотне збільшення концентрації етерів холестеролу в жовчі самців щурів. В умовах доксициклін-індукованої гіперхолестеринемії в жовчі самців щурів знижується концентрація фосфоліпідів, а при застосуванні корвітину у тварин, що зазнали попереднього доксициклінового навантаження, вміст фосфоліпідів у печінковому секреті наближається до контрольних значень. Концентрація вільних жирних кислот у жовчі щурів із доксициклін-індукованою гіперхолестеринемією та при застосуванні корвітину виявляється істотно вищою, ніж у тварин контрольної групи.

Ключові слова: печінка, жовч, ліпіди, корвітин, доксициклін, гіперхолестеринемія.

Постановка наукової проблеми та її значення. Аналіз досліджень цієї проблеми. Дисліпідеміями потрібно вважати порушення функції або складу ліпідів та ліпопротеїнів крові, що виникають унаслідок багатьох причин та здатні самостійно або у взаємодії з іншими факторами ризику спричинити маніфестацію атеросклеротичного процесу. Насамперед ураховується рівень загального холестеролу та холестеролу ліпопротеїнів низької щільності, тому що саме з ними пов'язане зростання ризику серцево-судинних захворювань. Найбільше значення має так звана атерогенна ліпідна тріада, що характеризується зростанням ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ) та пов'язаним із цим підвищенням рівня тригліцеридів і ліпопротеїнів низької щільності (ЛПНЩ) та зменшенням рівня холестеролу ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) крові [1, 2]. Гіперліпідемія та її небезпечні для життя наслідки – це сьогодні проблема, до якої прикуто увагу лікарів і вчених усього світу, оскільки доведено пряму залежність абсолютних та відносних показників смертності внаслідок ішемічної хвороби серця від рівня загального холестеролу крові, взаємозв'язок між гіперхолестеринемією, метаболічним синдромом і цукровим діабетом [3, 4]. Водночас, як свідчать експериментальні, епідеміологічні та клінічні дослідження, проведенні за останні 50 років, існує тісний зв'язок не лише між дисліпідеміями й виникненням синдропа уражень серцево-судинної системи на ґрунті атеросклерозу, але й такими хворобами органів травної системи, як жировий гепатоз (стеатогепатит) і внутрішньопечінковий холестаза, які корелюють із гіперхолестеринемією та гіпертригліцеридемією [5, 6, 7]. Печінка відіграє ключову роль у метаболізмі холестеролу й саме в її клітинах функціонують ключові ферменти, пов'язані з холестероловим гомеостазом, а найрізноманітніші ураження печінки викликають розвиток різних форм дисліпідемії та відповідні ризики розвитку супутніх патологій [8, 9, 10, 11]. Одним зі шляхів холестеролового обміну є синтез жовчних кислот у гепатоцитах та виведення в складі жовчі як цих метаболітів холестеролу, так і його самого у вільній і етерифікованій формах [12]. Тому актуальним є дослідження різних аспектів ліпідного й, зокрема, холестеролового обміну в умовах експериментального ураження печінки та змодельованої гіперхолестеринемії.

Мета роботи – дослідити ліпідний спектр жовчі самців щурів із доксициклін-індукованою гіперхолестеринемією та при застосуванні корвітину в умовах експериментальної гіперхолестеринемії.

Методика. Дослідження впливу корвітину на ліпідний спектр жовчі в умовах доксициклінового навантаження проводили на щурах-самцях масою 185–230 г (n=29). Тварин утримували в приміщенні віварію за постійної температури 22–24°C із 14-годинним світловим періодом доби, годування проводили за стандартним раціоном і з вільним доступом до води. Тварини контрольної групи пере-

бували на стандартному раціоні віварію. Щурі однієї з дослідних груп отримували з їжею впродовж п'ять днів доксициклін (540 мг/кг маси тіла тварини). Тварини іншої дослідної групи (n=5) отримували доксициклін (540 мг/кг маси тіла тварини) впродовж п'яти днів, а потім – корвітин (1 мг/кг маси тіла тварини) – сім днів [13, 14, 15]. Перед початком гострого експерименту тварин зважували та відсаджували в окрему клітку без доступу до їжі (харчова депривація впродовж доби), але з вільним доступом до води. Тварин наркотизували введенням тіопенталу натрію в дозі 70 мг на кг маси тіла внутрішньоочеревно. Після цього проводили лапаротомію. Увійшовши в черевну порожнину, знаходили гепато-дуоденальну зв'язку й підводили лігатури під відпрепаровану жовчну протоку, через надріз стінки якої вводили зонд (зігнута тупа металева голка) і канюлювали протоку. Пластикову канюлю з'єднували з мікропіпеткою для збору проб жовчі. Після завершення оперативних утручань для підтримання сталої температури тіла тварини та запобігання пересиханню стінки черевної порожнини стягували лігатурами, а на поверхню оперативного поля накладали марлеву серветку, змочену фізіологічним розчином. Стабілізація стану тварини тривала перших 30 хв після операції. Протягом цього періоду ніяких вимірів не проводили. Об'єм секретованої печінкою щурів жовчі ресстрували, збираючи наступні вісімнадцять десятихвилинних проб за 3 години гострого досліду. Кожні три десятихвилинні проби жовчі зливали разом в одну ємкість, отримуючи шість півгодинних зразків печінкового секрету. У них методом тонкошарової хроматографії, модифікованим у нашій лабораторії, визначали вміст фосфоліпідів, холестеролу та його етерів, вільних жирних кислот, тригліцеридів [16].

По завершенню гострого досліду збирали зразки сироватки крові щурів, у яких визначали холестерол, використовуючи набір Human (Human GmbH, Німеччина) [17].

Статистичну обробку даних проводили з використанням пакета Statistica 7.0 (Stat Soft, США) з урахуванням критерію t-Ст'юдента. Нормальність розподілу оцінювали за допомогою тесту Шапіро-Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$ [18, 19, 20].

Проведені експериментальні дослідження не суперечать загальноприйнятим біоетичним нормам і здійснені з дотриманням відповідних міжнародних положень проведення експериментальних робіт та клінічних досліджень.

Виклад основного матеріалу й обґрунтування отриманих результатів дослідження. При моделюванні доксициклін-індукованої гіперхолестеринемії вміст загального холестеролу в крові щурів був на 85,9 % ($p < 0,05$) вищим від контрольних значень, а саме, $2,64 \pm 0,6$ ммоль/л, порівняно з $1,42 \pm 0,28$ ммоль/л у контрольній групі тварин (рис. 1 А).

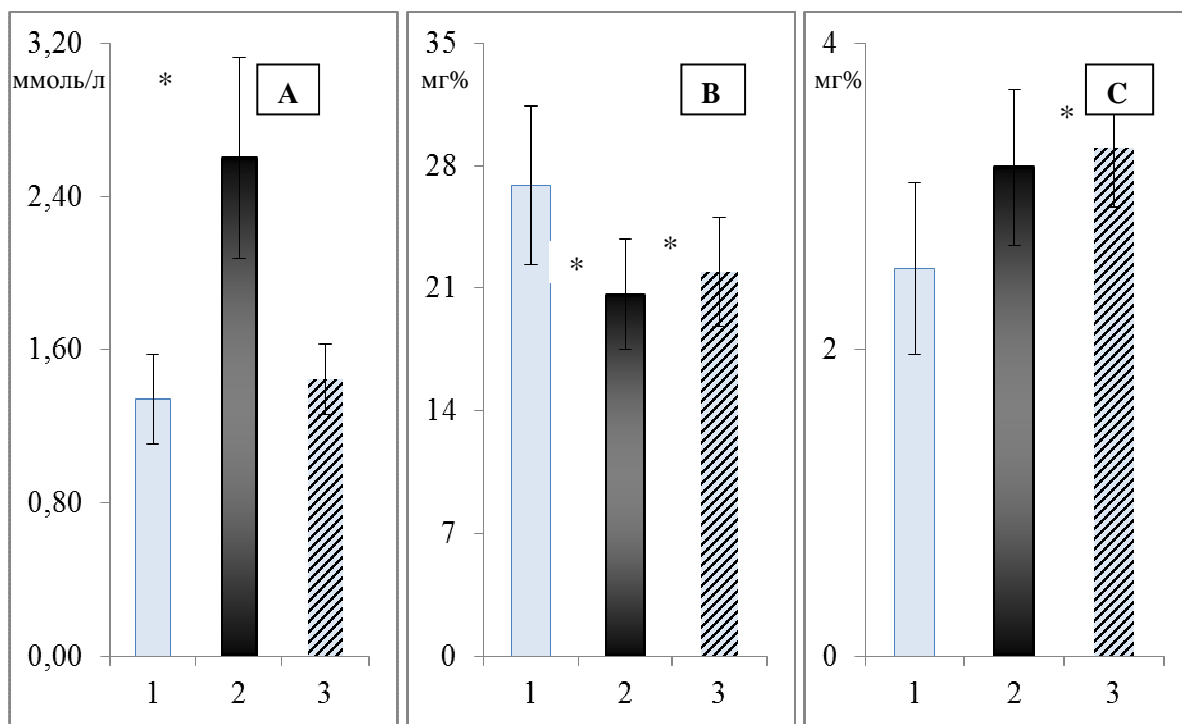


Рис. 1. Уміст загального холестеролу в крові (А) та вільного (В) і етерифікованого (С) холестеролу жовчі в щурів контрольної групи (1) при моделюванні доксициклін-індукованої гіперхолестеринемії (2) та після застосування корвітину в умовах експериментальної гіперхолестеринемії (3) ($M \pm SD$, * $p < 0,05$)

Концентрація вільного холестеролу в жовчі щурів, які зазнавали впливу лише доксицикліну, та в тих, яким, окрім антибіотику, вводили корвітин, статистично значимо зменшується (рис. 1В). Отже, усунення доксициклін індукованої гіперхолестеринемії корвітином не пов'язане з посиленням виведення вільного холестеролу з жовчю (табл. 1). Однак потрібно відзначити істотне збільшення концентрації ефірів холестеролу в жовчі щурів, які зазнали впливу і доксицикліну, і корвітину (рис. 1С; табл. 1).

Таблиця 1

Концентрація ліпідів у жовчі щурів самців із доксицикліновою гіперхолестеринемією та при дії корвітину, $M \pm SD$, мг %

Проба жовчі	Серія	Фракції ліпідів				
		фосфоліпіди	холестерол	вільні жирні кислоти	тригліцериди	етери холестеролу
1	контроль	69,74±6,66	28,60±3,87	12,14±2,15	2,33±0,93	2,64±0,49
	доксициклін	52,88±11,61*	20,50±3,17**	22,47±4,39***	2,17±0,37	2,73±0,60
	доксициклін+корвітин	65,38±10,47	23,60±3,60*	18,11±4,36**	1,75±0,50	3,32±0,50*
2	контроль	68,73±6,05	28,83±3,82	12,59±2,51	2,30±0,61	2,51±0,45
	доксициклін	54,63±12,24*	21,77±2,62**	22,27±4,18***	2,10±0,38	2,73±0,65
	доксициклін+корвітин	66,22±9,78	23,45±2,98*	17,00±4,21*#	1,78±0,55	3,22±0,39**
3	контроль	67,19±4,15	27,11±3,21	12,57±2,02	2,29±0,83	2,53±0,46
	доксициклін	55,78±16,84	21,98±4,14*	21,43±4,03***	2,12±0,40	2,60±0,54
	доксициклін+корвітин	66,23±11,13	22,52±3,63*	16,09±3,96 [#]	1,70±0,65	3,22±0,21**#
4	контроль	66,31±3,76	26,06±4,86	12,37±1,64	2,19±0,68	2,39±0,48
	доксициклін	50,53±10,99**	20,65±3,32*	20,95±4,12***	2,00±0,39	2,77±0,48
	доксициклін+корвітин	63,45±7,55 [#]	21,10±2,64*	16,31±3,06**#	1,73±0,58	3,25±0,36*
5	контроль	64,10±4,44	24,54±4,84	12,74±1,52	1,96±0,69	2,39±0,55
	доксициклін	48,0±11,04**	19,78±2,88	19,88±3,64***	1,87±0,36	2,78±0,61
	доксициклін+корвітин	61,00±8,37 [#]	20,83±2,71	16,99±3,13**	1,75±0,47	3,10±0,47*
6	контроль	62,67±4,01	24,16±4,76	12,97±1,59	1,96±0,63	2,50±0,60
	доксициклін	47,12±11,15**	19,23±3,08	18,85±2,92***	1,85±0,34	2,68±0,71
	доксициклін+корвітин	59,48±8,13	20,15±2,64	16,93±16,9**	1,77±0,36	3,03±0,42

Примітка. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ – статистично значимі відмінності, порівняно з контролем; [#] $p < 0,05$ – статистично значимі відмінності, порівняно з показниками жовчі тварин із доксицикліновою гіперхолестеринемією.

Можливо, що стимуляція виведення етерифікованого холестеролу з жовчю є одним із механізмів, що зумовлюють здатність корвітину зменшувати рівень холестеролу в крові тварин із доксициклін-індукованою гіперхолестеринемією.

Під впливом доксициклінового навантаження в самців щурів істотно зменшується вміст фосфоліпідів у жовчі, зокрема в жовчі, зібраній упродовж гострого експерименту у тварин із доксициклін-індукованою гіперхолестеринемією, концентрація фосфоліпідів виявляється на 20,5–26,2 % ($p < 0,05$) нижчою, ніж у контролі. Застосування корвітину в щурів, що зазнали попереднього доксициклінового навантаження, веде до нормалізації вмісту фосфоліпідів у їх жовчі (табл. 1). Фосфоліпіди в жовчі відіграють важливу фізіологічну роль, оскільки разом із жовчними кислотами забезпечують утримання холестеролу в змішаних жовчних міцелах, тобто сприяють його сольобілізації. Також фосфоліпіди захищають апікальну мембрану клітин печінки від детергентної дії жовчних кислот [21]. Оскільки доксициклін у великих дозах має прооксидантні властивості й сприяє накопиченню в тканині печінки альдегідів, кетонів, гідроперексидів, то під його впливом посилюється перекисне окислення ліпідів, змінюються структура та проникність клітинних мембран і, як наслідок, порушуються тран-

спортні процеси, які складають основу жовчоутворення [22]. Тому важливою є виявлена здатність корвітину усувати дію доксицикліну на надходження до жовчних каналців таких функціонально активних компонентів жовчі, як фосфоліпіди. Натомість концентрація вільних жирних кислот у жовчі щурів обох дослідних груп виявляється істотно вищою, ніж у тварин контрольної групи (табл. 1). У жовчі щурів, зібраній упродовж гострого експерименту, не змінюється лише концентрація тригліцеридів (табл. 1).

Висновки та перспективи подальшого дослідження. При доксициклін-індукованій гіперхолестеринемії в крові самців щурів зростає рівень загального холестеролу крові та зменшується концентрація вільного холестеролу жовчі. Корвітин усуває гіперхолестеринемічний ефект доксициклінового навантаження, знижуючи рівень загального холестеролу в крові, та викликає істотне збільшення концентрації естерів холестеролу в жовчі самців щурів. В умовах доксициклін-індукованої гіперхолестеринемії в жовчі самців щурів зменшується концентрація фосфоліпідів, а при застосуванні корвітину у тварин, що зазнали попереднього доксициклінового навантаження, уміст фосфоліпідів у печінковому секреті наближається до контрольних значень. Концентрація вільних жирних кислот у жовчі щурів із доксициклін-індукованою гіперхолестеринемією та при застосуванні корвітину виявляється істотно вищою, ніж у тварин контрольної групи. Механізми дії корвітину на ліпідний склад жовчі при доксициклін-індукованій гіперхолестеринемії потребують подальшого вивчення.

Джерела та література

1. Manjunath C. N. Atherogenic dyslipidemia / C. N. Manjunath, Jayesh R. Rawal, Paurus Mehelli Irani, K. Madhu // *Indian. J. Endocrinol. Metab.* – 2013. – V 17(6). – P. 969–976.
2. The High Prevalence of Low HDL-Cholesterol Levels and Dyslipidemia in Rural Populations in Northwestern China / Pengfei Ge, Caixia Dong, Xiaolan Ren et al // *PLoS One.* – 2015. – V 10 (12). – e0144104.
3. Klop B. Dyslipidemia in Obesity: Mechanisms and Potential Targets / B. Klop, J. W. F. Elte, M. C. Cabezas // *Nutrients.* – 2013. – V 5(4). – P. 1218–1240.
4. Bitzur R. Triglycerides and HDL Cholesterol. Stars or second leads in diabetes? / R. Bitzur, H. Cohen, Y. Kamari, A. Shaish, D. Harats // *Diabetes Care.* – 2009. – V 32 (Supp 12). – P. S373–S377.
5. Абрагамович О. О. Гіперліпідемія: сучасний погляд на проблему з позиції гастроентеролога (огляд літератури та опис клінічного випадку) / О. О. Абрагамович, М. О. Абрагамович, Я. Л. Лещук, С. А. Кристопчук, А. Б. Федець // *Львівський медичний часопис /Acta Medica Leopoliensia.* – 2014. – № 1. – С. 95–103.
6. Black D. D. Chronic cholestasis and dyslipidemia: What is the cardiovascular risk? / D. D. Black // *The Journal of Pediatrics.* – 2005. – V 146, Issue 3. – P. 306–307.
7. The Metabolic Profile of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy Is Associated With Impaired Glucose Tolerance, Dyslipidemia, and Increased Fetal Growth / M. G. Martineau, C. Raker, P. H. Dixon // *Diabetes Care.* – 2015. – V 38(2). – P. 243–248.
8. Chatrath H. Dyslipidemia in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease / H. Chatrath, R. Vuppalanchi, N. Chalasani // *Semin Liver Dis.* – 2012. – V 32(1). – P. 22–29.
9. Cai Z. Effect of testosterone deficiency on cholesterol metabolism in pigs fed a high-fat and high-cholesterol diet / Z. Cai, H. Xi, Y. Pan [et al.] // *Lipids in Health and Disease.* – 2015. – V 14, № 1. – P. 14–18.
10. Zhang Qing-Qing Nonalcoholic Fatty Liver Disease: Dyslipidemia, Risk for Cardiovascular Complications, and Treatment Strategy / Qing-Qing Zhang, Lun-Gen Lu // *J Clin Transl Hepatol.* – 2015. – V 3(1). – P. 78–84.
11. Dajani A. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: Where do we stand? an overview / A. Dajani, A. AbuHammour // *Saudi J Gastroenterol.* – 2016. – V 22(2). – P. 91–105.
12. Тяжка О. В. Значення біохімічного дослідження жовчі як індикатора порушень метаболізму жирних кислот, фосфоліпідів та холестерину в дітей з холелітазом / О. В. Тяжка, В. В. Сміщук, Т. С. Брюзгіна // *Перинатологія і педіатрія.* – 2015. – №1 (61). – С. 63–67.
13. Орёл Н. М. Влияние излучения полупроводниковых лазеров с длинами волн 877 нм, 847 нм и 670 нм на уровень холестерина в тканях и сыворотке крови крыс с экспериментальной гиперхолестеринемией / Н. М. Орёл, С. И. Чубаров, О. Л. Автосеенко // *Сигнальные механизмы регуляции физиологических функций* : сб. науч. ст. – Минск : РИВШ, 2007. – С. 29–31.
14. Гордиенко А. Д. Гепатопротекторный механизм действия / А. Д. Гордиенко // *Фармация.* – 1990. – № 3. – С. 75–79.
15. Вовкун Т. В. Зовнішньосекреторна функція печінки щурів при дії корвітину / Т. В. Вовкун, П. І. Янчук, Л. Я. Штанова, С. П. Весельський, А. С. Шаламай // *Фізіологічний журнал* – 2016. – Т. 62, № 3. – С. 30–38.

16. Патент 99031324, Україна, МБН А61В5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи : Пат. 9901324 Україна, МБН А61В5/14 / С. П. Весельський, П. С. Лященко, С. І. Костенко, З. А. Горенко, Л. Ф. Куровська – № 33564А : заявл. 05.10.1999 ; опубл. 15.02.2001. – Бюл. № 1.
17. Development and Validation of an Enzymatic Method for Total Cholesterol Analysis Using Whole Blood Spot / G. Corso, F. Papagni, M. Gelzo et al // J. Clin. Lab. Anal. – 2015. doi : 10.1002/jcla.21890.
18. Гойко О. В. Практичне використання пакета STATISTIKA для аналізу медико-біологічних даних : навч. посіб. / О. В. Гойко. – Київ : Київська мед. акад. післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, 2004. – 76 с.
19. Філімонова Н. Б. Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обгрунтованої медицини. Первинний аналіз кількісних даних, подання результатів експерименту / Н. Б. Філімонова, І. О. Філь, Т. С. Михайлова // Медицина залізничного транспорту України. – 2004. – № 4. – С. 30–38.
20. Філімонова Н. Б. Статистичний аналіз даних відповідно до засад науково обгрунтованої медицини. Порівняння груп за кількісними показниками / Н. Б. Філімонова, І. О. Філь // Медицина транспорту України. – 2005. – № 4. – С. 86–93.
21. Morita Shin-ya Molecular Mechanisms for Biliary Phospholipid and Drug Efflux Mediated by ABCB4 and Bile Salts / Shin-ya Morita, Tomohiro Terada // Biomed Res Int. – 2014: 954781. Published online doi : 10.1155/2014/954781 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4123595/>
22. Tang D. M. Acute Hepatocellular Drug-Induced Liver Injury From Bupropion and Doxycycline / D. M. Tang, C. Koh, W. S. Twaddell, E. C. von Rosenvinge, H. Han // ACG Case Rep J. – 2015 – V 3(1). – P. 66–68.

Ляшевич Алёна, Решетник Евдокия, Колбасинская Вера, Весельский Станислав, Макаrchук Николай.

Влияние корвитина на липидный спектр желчи крыс с экспериментальной гиперхолестеринемией. В работе исследован липидный спектр желчи самцов крыс с доксициклин-индуцированной гиперхолестеринемией и при применении корвитина в условиях экспериментальной гиперхолестеринемии. Исследование влияния корвитина (1 мг/кг, 7 дней) на липидный спектр желчи в условиях доксициклиновой нагрузки (540 мг/кг, 5 дней) проводились на крысах-самцах с массой тела 185–230 г (n=29). В острых опытах у животных, находящихся под тиопенталовым наркозом (70 мг/кг), получали желчь, в которой методом тонкослойной хроматографии, модифицированным в нашей лаборатории, определяли содержание фосфолипидов, холестерина и его эфиров, свободных жирных кислот, триглицеридов. Выявлено, что при доксициклин-индуцированной гиперхолестеринемии в крови самцов крыс возрастает уровень общего холестерина крови и уменьшается концентрация свободного холестерина желчи. Корвитин устраняет гиперхолестеринемический эффект доксициклиновой нагрузки, снижая уровень общего холестерина в крови, и вызывает существенное увеличение концентрации эфиров холестерина в желчи самцов крыс. В условиях доксициклин-индуцированной гиперхолестеринемии в желчи самцов крыс снижается концентрация фосфолипидов, а при применении корвитина у животных, которые предварительно были подданы воздействию доксициклиновой нагрузки, содержание фосфолипидов в печёночном секрете приближается к контрольным значениям. Концентрация свободных жирных кислот в желчи крыс с доксициклин-индуцированной гиперхолестеринемией и при применении корвитина оказывается существенно выше, чем у животных контрольной группы.

Ключевые слова: печень, желчь, липиды, корвитин, доксициклин, гиперхолестеринемия.

Liashevych Aliona, Reshetnik Evdokia, Kolbasyns'ka Vira, Veselsky Stanislav, Makarchuk Mykola. Corvitin Effect on Bile Lipid Profile in Rats with Experimental Hypercholesterolaemia. Lipid bile profile of male rats with doxycycline-induced hypercholesterolemia and the application Corvitin under experimental hypercholesterolemia was investigated. Corvitin (1 mg/kg, 7 days) influence on the lipid composition of bile was studied in male rats (185–230 g, n = 29) with doxycycline load (540 mg/kg, 5 days). In acute experiments on rats with cannulated bile duct (anesthesia sodium tiopental, 70 mg/kg) bile was collected. TLC modified in our laboratory five lipids fractions (phospholipids, cholesterol and its esters, free fatty acids, triglycerides) in rat bile were determined. It was found that in male rats with doxycycline-induced hypercholesterolemia blood levels of the total cholesterol increased and free cholesterol concentration in the bile reduced. Corvitin eliminated effects of doxycycline-induced hypercholesterolemia and caused increase in the concentration of cholesterol ethers in the bile. Phospholipids concentration in the bile was reduced in the male rats with doxycycline-induced hypercholesterolemia. Concentration of phospholipids in the bile was normalized after Corvitin application. After doxycycline-induced hypercholesterolemia and Corvitin application the concentration of free fatty acids in the rat bile was significantly higher than the control.

Key words: liver, bile, lipids, Corvitin, doxycycline, hypercholesterolemia.

Стаття надійшла до редколегії
11.03.2017 р.