

УДК 616.39:547.922-008.61-07:616.36-008.839.15

©Богдарин, Козлов

ВОЗМОЖНОСТИ КОРРЕКЦИИ ЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА У КРОЛИКОВ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ХОЛЕЛИТИАЗОМ.

Ю.А.Богдарин, Д.В.Козлов.

Научно-исследовательский институт детской гастроэнтерологии МЗ РФ
603005, г. Нижний Новгород, ул.Семашко, 22; тел.: 8-8312-35-56-59.

В опытах на кроликах-самках с экспериментальным холелитиазом, вызванным дозированной на 40 % перетяжкой общего желчного протока, установлено, что при ежедневном в течение 7 дней пероральном введении животным 16-20 % препарата "Эквален" с перерывом 3-4 дня при полном курсе до 120 дней (предпочтительно 90 дней) при дозе от 1,2 до 2,0 мл (предпочтительно 1,5 мл) в день из желчного пузыря кроликов исчезают образования холестерина больших и средних размеров, выявленные ранее и подтвержденные при ультразвуковом исследовании и результатами морфологических и биохимических анализов. Одновременно восстанавливается метаболизм липидов в органах и тканях энтерогепатической системы и состав липидов в желчи желчного пузыря.

Ключевые слова: эквален, холелитиаз, липиды.

ВВЕДЕНИЕ. За последние 10 лет увеличилась и продолжает неуклонно расти заболеваемость желчнокаменной болезнью (ЖКБ). В промышленно развитых странах Европы эта "болезнь благополучия" соревнуется по частоте с язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки и приобретает значение социальной проблемы [1,2]. Ежегодно в мире проводится около 7 миллионов операций по поводу холецистита, включая более 100 тысяч операций в России. Данным заболеванием чаще страдают женщины [3]. Клинические наблюдения показывают, что холецистэктомия не приносит облегчения больным более чем в 30% случаев [1]. Рецидивы болей после операций и развитие постхолецистэктомического синдрома обуславливают необходимость глубокого изучения проблемы холелитиаза.

В настоящее время принято считать, что патогенез желчнокаменной болезни комплексный и охватывает метаболические нарушения в органах и тканях, обеспечивающих энтерогепатическую циркуляцию различных биокomплексов, в первую очередь липидов. При рассмотрении вопроса об образовании холестеринových желчных камней предпочтение отдается теории нарушения метаболизма липидов [4-6]. Известно, что процесс нуклеации кристаллов моногидратов холестерина, предшествующий образованию холестеринových камней в желчном пузыре, возникает у пациентов с холелитиазом намного быстрее, чем у здоровых людей [7]. Это доказывает, что в такой патологически измененной желчи существуют дополнительные факторы, эффекты которых проявляются в определенных условиях. В то же время взаимодействие между различными липидными компонентами и процесс его регулирования еще недостаточно изучены. Противоречивы данные относительно роли холестерина. С одной стороны холестерин защищает эпителий желчных путей от потенциально

вредного воздействия желчных кислот (солей), поддерживает физиологические границы желчи по параметрам мицелл и везикул, регулируя физиологическую потребность в липидах тонкого кишечника при липидной перегрузке а с другой - способствует разрушению слизистой оболочки желчного пузыря. Этот процесс происходит при формировании липидных комплексов в энтероцитах и гепатоцитах и при выведении липидов из печени в желчь [8].

Лечебные мероприятия при терапии желчнокаменной болезни направлены в основном на нормализацию метаболизма липидов, в первую очередь холестерина и на восстановление баланса желчных кислот, такими препаратами как Хенофальк, Хенохол, Урсофальк и т.п., основу которых составляют хено- и урзодезоксихолевая кислоты. Гораздо меньше известно о влиянии водноспиртовых, так называемых галеновых препаратах, изготовленных на основе лекарственных трав.

Целью исследования является изучение показателей метаболизма липидов в органах и тканях, обеспечивающих их энтерогепатическую циркуляцию (ЭГС) у кроликов с экспериментальным холелитиазом и его коррекции новым лекарственным препаратом "Эквален".

МЕТОДИКА. В работе использованы кролики-самки массой 2,0-2,5 кг. Животные были разделены на 4 группы: 1 - контроль, 2 - животные с экспериментальным калькулезным холециститом (КФХ); 3,4 - животные с КФХ, получавшие различные галеновые препараты. Холецистит вызывали путем дозированной на 40% перетяжки общего желчного протока в области двенадцатиперстной кишки [9]. Животных оперировали под наркозом (2% раствор тиопентала натрия внутривенно в объеме 0,3-0,5 мл) после премедикации 1% растворами промедола и димедрола внутримышечно. Через 15-30 дней после операции методом ультразвукового обследования (прибор USI Tashiba Sonolayer Sal 38) регистрировали разные формы холецистита (калькулезная, акалькулезная).

После регистрации холестериновых конкрементов в желчном пузыре кролики 3-й группы получали галеновый препарат - 70% водноспиртовой экстракт лекарственных трав (сбор № 142), включающих чистотел, горец птичий, зверобой, фиалку, корни одуванчика, кукурузные рыльца, плоды аниса в соотношении 1:1,5:2:1:2:1 (по весу) [10]. Перед применением экстракт разводили водой до концентрации 12-16% раствора. Кролики 4-й группы получали препарат "Эквален" - 70% водноспиртовой экстракт лекарственных трав (патент Ю.А.Богдарина) [11] в виде 12-16% водно-спиртового раствора. Препараты вводили животным перорально ежедневно в течение 7 дней с последующим перерывом в 3-4 дня при общем курсе введения 120 дней, дробно (3-5 раз в сутки) в дозе 1,2 - 2,0 мл.

После проведения курса лечения животных умерщвляли с помощью внутривенного наркоза - 2% раствора тиопентала натрия в объеме 2-3 мл, вскрывали брюшную полость и последовательно забирали органы и ткани (кровь, печень, кишечник, желчь) для проведения биохимических и морфологических исследований. Срезы органов готовили по стандартным методикам в парафине, окрашивание производили гематоксилин-эозином по методу Селье и пикрофуксином по методу Ван-Гизона [12]. Получение изолированных клеток печени и тонкой кишки проводили по методу Канаевой и соавт. [13], используя ЭДТА и механическое воздействие.

Во всех объектах исследования определяли фракции липидов и их жирнокислотный состав. Анализ липидов проводили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле ЛС 5/40 мк + 13% гипса на стеклянных пластинах размером 18х35 см с толщиной слоя силикагеля 1,0-1,2 мм с применением разных систем органических растворителей. Для разделения нейтральных липидов использовали две системы: 1 - диэтиловый эфир: бензол: этиловый спирт: ледяная уксусная кислота (40:50:2:0,2 по объему), 2 - диэтиловый эфир: гексан (6:94, по объему), для отделения эфиров холестерина от

КОРРЕКЦИЯ ЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХОЛЕЛИТИАЗЕ

триацилглицеринов. Для разделения фосфолипидов применяли систему хлороформ: метиловый спирт: вода (65:24:4 по объему). Разделение проводили дважды в одном направлении движения растворителей. Количественную оценку проводили денситометрически на микрофотометре ИФО-451. Стандартами служили холестерин и фосфатидилхолин. В составе доминирующих фракций липидов (триацилглицерины, эфиры холестерина, фосфатидилхолин, лизофосфатидилхолин) анализировали жирнокислотный состав с использованием газожидкостной хроматографии (ГЖХ) [14].* Анализ желчных кислот в биохимических средах проводили газохроматографически [15].

Для изучения биохимического состава галенового препарата Эквален были применены известные качественные реакции, методики с использованием ТСХ, ГЖХ и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в режиме градиентного элюирования на жидкостном хроматографе "Spectra Physics", оснащенного УФ-детектором с переменной длиной волны и стеклянной колонкой с сорбентом нуклеосил Сиг (250+4,6 мм), 10 мкм, а также общие числовые показатели [16].

Результаты обрабатывали статистически с применением t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты исследования представлены в табл. 1 и 2.

Таблица 1. Показатели липидного обмена в экспериментах с кроликами.

Объект	Липидные фракции	Группы животных			
		Контроль группа 1	КФК (группа 2)	КФК + сбор 142 (группа 3)	КФК+эквален (группа 4)
Артерио-венозная разница (мм)	СЖК	-19±0,03	0,01±0,003	0,05±0,02*	-0,12±0,03*
	ЭХ	+0,1±0,02	+0,26±0,04*	+0,08±0,02**	+0,06±0,02
	ТГ	0,0	+0,13±0,03*	+0,04±0,01	-0,01±0,003*
	ФЛ	-0,07±0,01	+0,05±0,01	-0,02±0,004	-0,11±0,03
Энтероциты (мг/г)	СЖК	0,70±0,22	1,66±0,32*	1,22±0,31	0,92±0,16**
	ЭХ	0,20±0,04	1,95±0,4*	0,69±0,19**	0,48±0,09**
	ТГ	9,41±1,23	7,53±1,24	10,61±2,13	8,83±1,17
	ФЛ	11,73±0,72	7,25±0,58*	10,57±2,05	13,51±1,73**
Гепатоциты (мг/г)	СЖК	1,00±0,25	2,63±0,34*	1,45±0,24**	1,22±0,19**
	ЭХ	2,33±0,24	4,95±1,11*	3,61±0,64	2,05±0,36**
	ТГ	15,47±1,66	19,93±3,87	17,33±1,84	13,65±1,26
	ФЛ	17,92±0,82	7,24±0,75*	11,28±1,26	14,84±1,37**

Примечания: СЖК - свободные жирные кислоты, ЭХ - эфиры холестерина, ТГ - триацилглицерол, ФЛ - фосфолипиды; * - достоверное различие ($p < 0,05$) с результатами группы 1, ** - с группой 2. В каждой группе было 10 животных.

Наблюдения за оперированными кроликами свидетельствуют о возникновении у всех животных проявлений хронического холецистита в интервале от 14 до 30 дней после операции. В 37 % случаев у животных фиксировалась калькулезная форма холецистита (КФХ).

После проведенного курса лечения галеновым препаратом на основе сбора лекарственных трав № 142, у подопытных животных восстанавливалась складчатость слизистой желчного пузыря, значительно снизилось количество клеток инфильтратов, уменьшилась степень набухания эндотелия, сохранились множественные холестатические гранулы. Проведенные ранее морфологические исследования желчного пузыря у животных с калькулезной формой холецистита выявили глубокие структурные изменения: уменьшение складчатости слизистой слоя, появление участков десквамации эпителия и микрополипоидного его разрастания, появление участков фиброизирования и утолщение стенок кровеносных сосудов [17]. После применения сбора у кроликов в желчном пузыре

исчезали холестериновые конкременты больших размеров, превалировали конкременты среднего и, особенно, мелкого размеров. Появилась тенденция к нормализации ряда липидных показателей, в том числе определяющих литогенный индекс в пузырной желчи. В частности, по сравнению с данными у кроликов с КФХ возросли уровни желчных кислот, фосфолипидов, снизилось содержание холестерина [18]. В клетках печени и кишечника уменьшилось количество эфиров холестерина (ЭХ) и увеличилось содержание фосфолипидов (ФЛ). Показатели артерио-венозной разницы и энтероцитов для ЭХ, гепатоцитов для свободных жирных кислот (СЖК), а также специфический показатель - К (соотношение между уровнями пальмитиновой (16:0) и олеиновой (18:1) кислот) - достоверно различались с соответствующими результатами у кроликов с КФХ, в тоже время не выявлено изменений по содержанию арахидоновой (20:4) кислоты в изучаемых биосредах. (табл.2, группы 2 и 3).

Таблица 2. Содержание арахидоновой кислоты в различных биосредах и показатель соотношения уровней пальмитиновой (16:0) и олеиновой (18:1) кислот (К) в эфирах холестерина.

Показатели	Группы экспериментальных животных				
	Контроль		КФК	КФК+ сбор 142 группа 3 (n=10)	КФК+эквален группа 4 (n=10)
Арахидо- новая кислота (20:4) %	сыворотка крови	4,5±0,9	14,3±3,5*	12,6±2,2*	6,3±1,1**
	клетки слизистой кишечника	5,6±1,3	19,5±5,4*	17,4±4,3*	19,5±3,6*
	гепатоциты	3,2±0,7	8,8±1,1*	8,2±1,5*	4,7±0,8**
	К (16:0/18:1)	3,2±0,4	0,7±0,1*	1,2±0,3*	2,5±0,6**

Примечание: * - достоверное различие ($p < 0,05$) различие с результатами группы 1, ** - с группой 2

После курса лечения препаратом "Эквален" в желчном пузыре всех животных отмечались множественные микролиты из моногидратов холестерина, отсутствовали конкременты крупного размера, выявлялись единичные конкременты среднего размера. Слизистая желчного пузыря характеризовалась наличием единичных клеток инфильтрата, невыраженным набуханием эндотелия наличием единичных холестатических гранул, отсутствием выраженных структурных изменений. Количество индивидуальных липидных компонентов пузырной желчи соответствовало показателям, определяемым в группе контрольных животных; показатель литогенного индекса не отличался от контрольного [18]. В пределах контрольных величин были определены уровни липидных фракций (кроме триацилглицеролов) в клетках печени и кишечника, показатели артерио-венозной разницы для определяемых фракций (ЭХ, ФЛ) (табл. 1, группы 4 и I), показатель для 20:4 арахидоновой кислоты в ЭХ крови и гепатоцитов, а также К (табл.2 группы 4 и I). Воздействие препарата "Эквален" оказало существенное влияние на баланс желчных липидов у кроликов с КФХ, характеризующийся повышением показателя литогенного индекса желчи [14], накоплением СЖК и, особенно (в 8 раз) фракции ЭХ; уменьшением выведения из клеток кишечника в оттекающей от энтероцитов крови СЖК и увеличением поглощения ЭХ (табл.1, группа 2). Накопление ЭХ, свойственное клеткам печени, отсутствовало при применении препарата. Известно, что развитие холецистита сопровождается синдромом малабсорбции, степень тяжести которой можно дифференцировать с помощью К [19]. Данный показатель оказался информативным для выявления разных форм холецистита. В настоящей работе он положительно коррелирует с эффектами от использования изучаемых препаратов: сбор №142 г - 0,57, "Эквален" г - 0,62, при КФХ г - 0,2.

Основными биологически активными соединениями препарата "Эквален" являются флавоноиды, алкалоиды, органические кислоты, из которых нами выявлено 18 основных [16], эфирное масло, β -ситостерин, дубильные вещества и сапонины.

КОРРЕКЦИЯ ЛИПИДНОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ХОЛЕЛИТИАЗЕ

Кроме того, нами выявлено наличие веществ терпеновой природы - борнеол, цинеол и др., определена доминирующая группа биологически активных веществ - феноидные соединения. Однако пока точный механизм воздействия этих компонентов на липидный обмен остается невыясненным.

Таким образом, препарат "Эквален" оказывает выраженное положительное влияние на состав липидов в ЭГС при холелитиазе, а показатель К - соотношение уровней пальмитиновой и олеиновой кислот в составе общих липидов крови может быть использован в качестве критерия оценки эффективности лечения холецистита галеновыми препаратами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галкин В.А., Логинов А.С., Чебанов С.М. и др. (1993) Тер. архив, №2, 65-77.
2. Бурков С.Г., Гребнев А.Л. (1994) Клини. мед., №3, 59-62.
3. Дедерер Ю.М., Устинов Г.Г. (1984) Клини. мед., №10, 14-18.
4. Логинов А.С., Чебанов С.М. и др. (1989) Бюлл. экспер. биол. мед., №8, 251-254.
5. Мансуров Х.Х. (1987) Пробл. гастроэнтерол., №7, 9-20.
6. Grundy S.M. (1983) Semin. Liver Dis., 3, 127-141.
7. Gollish S.H., Burnstein J.M. et al. (1983) Gut, 24, 836-844.
8. Robins S.J., Brunengaber H. (1982) J.Lipid Res, 23, 604-608.
9. Тараховский М.А. (1977) Пат. физиол., №3, 72-74.
10. Соколов С.Я., Замотаев И.П. (1989) Справочник по лекарственным растениям. - М. - 254с.
11. Богдарин Ю.А., Столяреу В.И. (1995) Лекарственный препарат для профилактики и лечения холецистита и желчнокаменной болезни. Патент №2044546. Изобретения (заявки и патенты), №27, 167.
12. Меркулов Г.А. (1968) Курс патогистологической техники. Л., Медицина.
13. Канаева Н.П. и др. (1975) Цитология, №5, 545-557.
14. Богдарин Ю.А., Бояринов Г.А., Горбунова Л.В. (1982) Лаб. дело, №9, 17-20.
15. Богдарин Ю.А. (1988) Лаб. дело, №8, 22-25.
16. Прохорова Л.В., Богдарин Ю.А. и др. (1998) V Российский национальный конгресс "Человек и лекарство", М, с. 665.
17. Богдарин Ю.А. (1990) Особенности состава липидов энтерогепатической системы и пути его коррекции при холелитиазе. Дисс. докт. биол. наук, Горький.
18. Богдарин Ю.А., Виницкая О.В. (1996) Бюлл. экспер. биол. мед., №7, 117-120.
19. Богдарин Ю.А., Лазарева Т.С. (1988) Педиатрия, №11, 19-21.

Поступила 12.7.01.

OPPORTUNITY OF LIPID METABOLISM CORRECTION IN RABBITS WITH EXPERIMENTAL CHOLELITHIASIS.

Yu.A. Bogdarin, D.V. Kozlov

Institute of Infant Gastroenterology, Semashko st., 22,
Nizhny Novgorod, 603005 Russia; tel.: 8-8312-35-56-59.

The effect of 16-20% medicinal preparation "Equalen" on some parameters of lipid metabolism in female rabbits with cholelithiasis induced by 40% clamp of common bile duct was investigated. The total course of Equalen administration for 90-120 days included daily oral administration of Equalen for 7 days followed by 3-4 day interval. The optimal dose was 1.5 ml per day (the effective range of doses varied from 1.2 to 2.0 ml). Such treatment resulted in disappearance of large and medium sized cholesterol formations from gallbladder, normalization of lipid metabolism in organs of hepatointestinal system and lipid composition of bile.

Keywords: equalen, cholelithiasis, lipids.