

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.12.093>

УДК 612.357.15; 612.357.32; 616.36-003.826

**В.А. Томчук¹, В.А. Грищенко¹, С.П. Весельський²,
Є.М. Решетнік², М.Ю. Євтушенко¹**

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування, Київ

² Київський національний університет ім. Тараса Шевченка

E-mail: viktoriya_004@ukr.net

Холестерол і його естери в жовчі щурів при тетрацикліндукованому гепатозі та застосуванні фосфоліпідів молока

Представлено членом-кореспондентом НАН України М.Ю. Євтушенком

Зростання частоти розладів метаболізму холестеролу та жовчоутворення обумовлює необхідність пошуку можливих засобів корекції його обміну в печінці. Так, встановлено, що в лабораторних щурів з експериментальною медикаментозною формою жирового гепатозу пригнічується екскреція холестеролу і, особливо, його естерів до жовчних каналців та істотно порушується їх співвідношення в жовчі. Застосування щурям біодобавки "FLP-MD" на основі фосфоліпідів молока виявляє корегувальний вплив на вміст холестеролу та його естерів у жовчі за перебігу вказаної гепатопатії. Це дає підставу рекомендувати зазначену біодобавку для пришвидшення відновлення обміну холестеролу в пацієнтів з клінічними випадками медикаментозного ураження печінки.

Ключові слова: холестерол та його естери, фосфоліпідів молока, жовч, тетрациклін, жировий гепатоз, щури.

Порушення обміну ліпідів, і зокрема, холестеролу, відмічається в патогенезі багатьох захворювань ссавців, наприклад, патології серцево-судинної і травної систем та печінки [1, 2]. Ключові етапи метаболізму холестеролу забезпечують ензимні системи печінки, ураження якої супроводжується появою різних форм дисліпідемії та розвитком супутніх захворювань [3]. Тому гепатопатії, як правило, характеризуються розладами в метаболізмі та екскреції холестеролу, а також його метаболітів у складі жовчі [4]. З жовчних кислот, фосфоліпідів і холестеролу в жовчі формуються комплекси — міцели. У разі порушення співвідношення концентрацій цих компонентів, можлива кристалізація холестеролу з подальшим літогенезом [5, 6]. У клінічній практиці фосфоліпідів розглядаються як можливі корегувальні засоби при ураженнях печінки, розладах жовчоутворення, а також порушеннях

Цитування: Томчук В.А., Грищенко В.А., Весельський С.П., Решетнік Є.М., Євтушенко М.Ю. Холестерол і його естери в жовчі щурів при тетрацикліндукованому гепатозі та застосуванні фосфоліпідів молока. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2020. № 12. С. 93—99. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2020.12.093>

обміну холестеролу [7–9]. Вони виявляють здатність пригнічувати абсорбцію холестеролу на рівні ентероцитів слизової оболонки тонкого відділу кишечника, що стримує його надмірне засвоєння в організмі. Механізми біологічної дії фосфоліпідів на засвоєння холестеролу в кишечнику можуть бути пов'язані з інгібуванням включення харчового холестеролу до хіломікрон і подальшого його надходження в кров, а також запобіганням взаємодії цього ліпиду з NPC1L1 – ключовим холестерол-транспортуючим протеїном ентероцитів [10, 11]. Тому *мета нашого дослідження* полягала у визначенні закономірностей щодо секреції з жовчю холестеролу та його естерів, характерних для тетрациклініндукованого ураження печінки, і корегувальної ефективності біологічно активної добавки (БАД) “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока.

Матеріали та методи. У дослід залучали білих лабораторних щурів (самців) лінії *Wistar* з масою тіла 200 ± 50 г ($n = 13$), що утримувалися у віварії за температурного режиму $22–24$ °C з 14-годинним світловим періодом доби, на стандартному раціоні та з вільним доступом до води. У досліді з щурами дотримувалися “Загальних принципів експериментів на тваринах”, схвалених VI Національним конгресом з біоетики (Київ, 2016) та узгоджених з положеннями “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986).

Експериментальне відтворення жирового гепатозу здійснювали за авторською методикою [12] шляхом внутрішньошлункового введення щурам 4 % розчину тетрацикліну гідрохлориду в дозі 0,5 г/кг маси тіла тварини впродовж 7 діб (група “самореабілітація”). Визначення корегувальної ефективності БАД “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока щодо холатотвірної функції печінки передбачало її щодобове внутрішньошлункове застосування піддослідним щурам за 1 год до введення тетрацикліну та наступні дві доби після припинення його введення (група “корекція”). Щодобова доза БАД “FLP-MD” становила 13,5 мг/кг маси тіла тварини [13]. Щури контрольної групи отримували еквівалентний об'єм дистильованої води.

За добу до початку гострого експерименту із канюлюванням жовчної протоки тварини були зважені, утримувались без корму та мали вільний доступ до води. Щурів наркотизували шляхом внутрішньочеревного введення натрію тіопенталу (7 мкг/100 г маси тіла). Після лапаротомії та канюлювання жовчної протоки за допомогою пластикової канюлі, сполученої з мікропіпеткою, кожні 30 хв упродовж 3 год гострого досліді відбирали зразки жовчі. Кожну отриману пробу жовчі аналізували на вміст холестеролу та його естерів методом тонкошарової хроматографії в авторській модифікації [14]. Для оцінки інтенсивності естерифікації холестеролу розраховували співвідношення в жовчі його вільної форми до естерифікованої.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням програми “Statistica 5.0” (“StatSoft Inc.”, США), враховуючи критерій *t*-Стьюдента при нормальному розподілі даних. Нормальність розподілу оцінювали за допомогою тесту Шапіро–Уїлка. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$

Результати та їх обговорення. У щурів з тетрациклініндукованим ураженням печінки (група “самореабілітація”) встановлено знижений вміст холестеролу в четвертому, п'ятому та шостому зразках жовчі, відповідно на 13,9, 14 і 17,7 % порівняно з контролем (рис. 1).

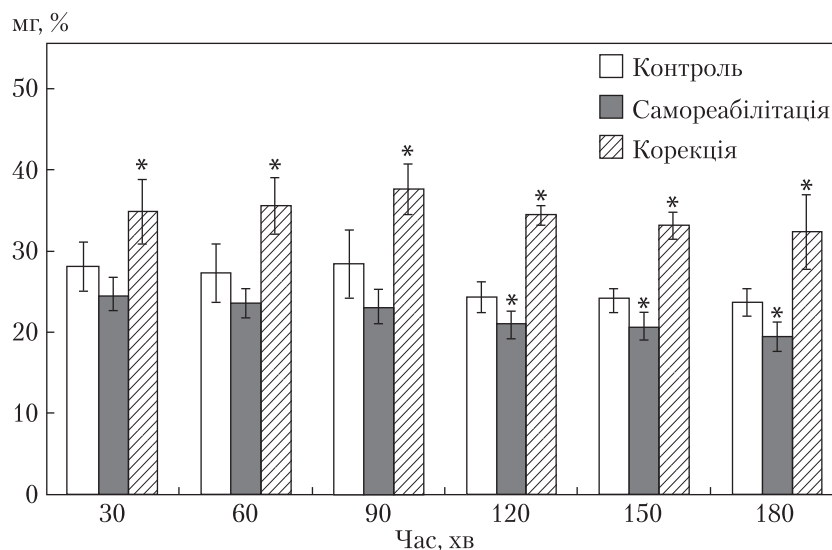


Рис. 1. Вміст холестеролу в зразках жовчі щурів при тетрацикліндукованому гепатозі (“самореабілітація”) та застосуванні фосфоліпідів молока у формі БАД “FLP-MD” (“корекція”). * — статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$), $n = 13$

Застосування піддослідним тваринам БАД “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока (група “корекція”) стимулює екскрецію вільного холестеролу з жовчю (див. рис. 1). Вказаний біологічний ефект фосфоліпідів молока підтверджується збільшенням концентрації вільного холестеролу в усіх зразках жовчі тварин групи “корекція”. Так, у першій пробі жовчі вміст вільного холестеролу був вищий за контрольний рівень на 23,8 %, а в останньому зразку печінкового секрету — на 37,4 %. Отже, БАД “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока не лише усуває спричинене тетрацикліном пригнічення надходження вільного холестеролу в жовч, а й виявляє істотний стимулюючий вплив на його транспортування до жовчних каналців.

Вміст естерів холестеролу в жовчі щурів з тетрацикліндукованим жировим гепатозом виявляється значно меншим, ніж у контролі (рис. 2). Так, вже в першому зразку жовчі, отриманої від тварин групи “самореабілітація”, концентрація естерів холестеролу менша від контрольних значень на 57,8 %. У наступних зразках жовчі показники вмісту естерів холестеролу також виявлялися значно нижчими від контрольних значень і наприкінці дослідження, у шостій півгодинній пробі жовчі, концентрація естерів холестеролу була меншою від контролю на 52,1 %. Відомо, що метаболічні перетворення холестеролу в печінці полягають у синтезі з нього жовчних кислот за участю унікальних гепатоспецифічних ензиматичних систем з подальшою екскрецією холатів у складі жовчі. А також холестерол надходить у жовчні каналці у вільній та естерифікованій формах, причому естери холестеролу більше утримуються в жовчних міцелах, що зменшує ризик літогенезу [5, 6]. Доречно припустити, що в умовах змодельованого жирового гепатозу порушуються як активність ключових ензиматичних систем клітин печінки, так і процеси транспорту, оскільки саме останні забезпечують надходження специфічних компонентів до жовчних каналців [15].

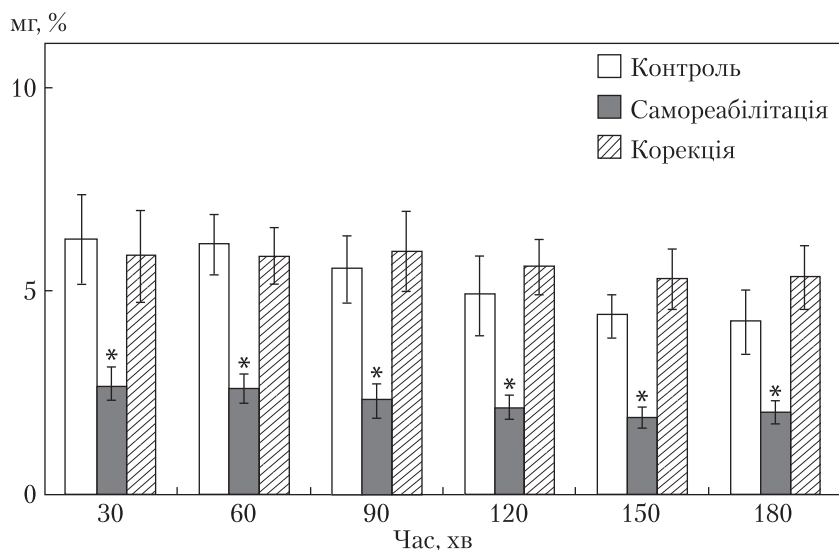


Рис. 2. Вміст естерів холестеролу в зразках жовчі щурів при тетрациклініндукованому жировому гепатозі (“самореабілітація”) та застосуванні БАД “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока (“корекція”). * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$), $n = 13$

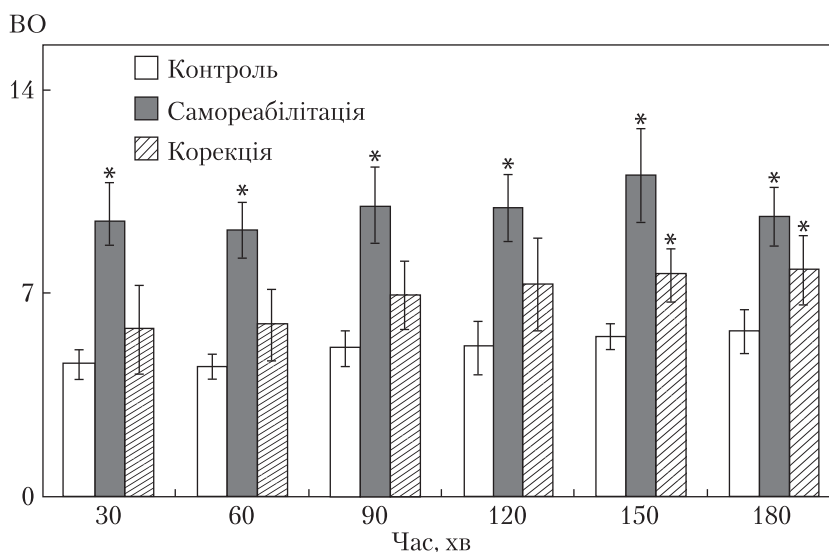


Рис. 3. Співвідношення в жовчі щурів вільної форми холестеролу до естерифікованої при тетрациклініндукованому жировому гепатозі (“самореабілітація”) та застосуванні БАД “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока (“корекція”). * – статистично значущі відмінності порівняно з контролем ($p < 0,05$), $n = 13$

Застосування БАД “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока за 1 год до введення тваринам тетрацикліну усуває інгібуючий вплив антибіотика на вміст естерів холестеролу в жовчі. У таких зразках не виявлено статистично значущих відмінностей концентрації естерів холестеролу порівняно з контролем (див. рис. 2).

Пригнічення естерифікації холестеролу, яке спостерігається у щурів з експериментальним жировим гепатозом, проявляється зростанням величини співвідношення вільного

холестеролу до його естерифікованих форм більш ніж удвічі відносно контролю. Це свідчить про значне порушення співвідношення вільного холестеролу та його естерів у жовчі тварин групи “самореабілітація” (рис. 3). Водночас слід відзначити, що поряд із вираженим стимулюючим впливом фосфоліпідів молока БАД “FLP-MD” на вміст вільного холестеролу в жовчі, концентрація його естерів поверталася до контрольного рівня, а не зростала. У зв’язку з цим значення співвідношення вільного холестеролу до його естерифікованої форми у жовчі тварин групи “корекція” істотно перевищувало його параметри в контролі у третій, п’ятій та шостій пробах відповідно на 36, 39 і 37,5 %. У першому, другому та четвертому зразках жовчі, відібраної від щурів, які отримували БАД “FLP-MD” в умовах моделювання тетрациклінового ураження печінки, істотних відмінностей величин цього показника від контролю не виявлено (див. рис. 3).

Отже, у ході дослідження встановлено, що у разі використання авторської методики відтворення у лабораторних щурів медикаментозної форми жирового гепатозу відбувається пригнічення процесів синтезу, біотрансформації і транспорту холестеролу клітинами печінки, що зрештою відображається у нерівнозначному зменшенні екскреції вільного та естерифікованого холестеролу до жовчних каналців і у порушенні їх співвідношення в жовчі. При цьому застосування хворим щурам БАД “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока виявляє виражений корегувальний вплив на вміст холестеролу та його естерів у жовчі за перебігу цієї гепатопатії. Оскільки фізико-хімічні та біологічні властивості жовчі залежать від співвідношення таких її компонентів, як жовчні кислоти, фосфоліпіди, холестерол та його естери, доцільно продовжити вивчення складу печінкового секрету та молекулярних механізмів жовчоутворення за медикаментозної форми жирового гепатозу та при корегувальній дії БАД “FLP-MD” на основі фосфоліпідів молока. У перспективі це дасть підставу рекомендувати зазначену біодобавку для пришвидшення відновлення обміну холестеролу в пацієнтів з клінічними випадками медикаментозного ураження печінки.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Zhang Q.-Q., Lu L.-G. Nonalcoholic fatty liver disease: dyslipidemia, risk for cardiovascular complications, and treatment strategy. *J. Clin. Transl. Hepatol.* 2015. **3**, № 1. P. 78–84. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00037>
2. Wang Y., Ding W.-X., Li T. Cholesterol and bile acid-mediated regulation of autophagy in fatty liver diseases and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2019. **1863**, № 7. P. 726–733. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2018.04.005>
3. Püschel G.P., Henkel J. Dietary cholesterol does not break your heart but kills your liver. *Porto Biomed J.* 2018. **3**, № 1. e12. <https://doi.org/10.1016/j.pbj.0000000000000012>
4. Kaiser T., Kinny-Köster B., Bartels M., Berg T., Scholz M., Engelmann C., Seehofer D., Becker S., Ceglarek U., Thiery J. Cholesterol esterification in plasma as a biomarker for liver function and prediction of mortality. *BMC Gastroenterol.* 2017. **17**, № 1. 57. <https://doi.org/10.1186/s12876-017-0614-9>
5. Dikkers A., Tietge U.J.F. Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World J. Gastroenterol.* 2010. **16**, № 47. P. 5936–5945. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i47.5936>
6. Rudling M., Laskar A., Straniero S. Gallbladder bile supersaturated with cholesterol in gallstone patients preferentially develops from shortage of bile acids. *J. Lipid Res.* 2019. **60**, № 3. P. 498–505. <https://doi.org/10.1194/jlr.S091199>
7. Грищенко В.А. Жовчно-кислотний склад крові та жовчі в телят за ентеропатології та застосування фосфоліпідів молока. *Часопис вет. наук.* 2019. **10**, № 4. С. 36–42. <https://doi.org/10.31548/ujvs.2019.04.005> (in Ukrainian).

8. Varganova D.L., Pavlov C.S., Casazza G., Nikolova D., Glud C. Essential phospholipids for people with non-alcoholic fatty liver disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2019. № 4. CD013301. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013301>
9. Maev I.V., Samsonov A.A., Palgova L.K., Pavlov C.S., Shirokova E.N., Vovk E.I., Starostin K.M. Effectiveness of phosphatidylcholine as adjunctive therapy in improving liver function tests in patients with non-alcoholic fatty liver disease and metabolic comorbidities: real-life observational study from Russia. *BMJ Open Gastroenterol.* 2020. 7, № 1. e000368. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2019-000368>
10. Jesch E.D., Carr T.P. Food ingredients that inhibit cholesterol absorption. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2017. 22, № 2. P. 67–80. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.2.67>
11. Zhang P., Chen Y., Cheng Y., Hertervig E., Ohlsson L., Nilsson A., Duan R.-D. Alkaline sphingomyelinase (NPP7) promotes cholesterol absorption by affecting sphingomyelin levels in the gut: A study with NPP7 knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2014. 306, № 10. P. G903– G908. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00319.2013>
12. Gryshchenko V., Danchenko O., Musiychuk V. Modification of modeling method of toxic dystrophy of liver in rats. Modern development paths of agricultural production: Nadykto V. (Eds). Cham: Springer. 2019. P. 689–697. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14918-5_67
13. Ветеринарна біологічно активна добавка ліпосомальної форми та спосіб репаративної терапії в гематології: пат. 86516 Україна. МПК А 61К 35/20, А23К 1/00; заявл. 14.09.2007. Опубл. 27.04.2009.
14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи: пат. 99031324 Україна. МПК А61В5/14; заявл. 05.10.1999. Опубл. 15.02.2001.
15. Schulze R.J., Micah B., Schott M.B., Carol A., Casey C.A., Pamela L., Tuma P.L., Mark A., McNiven M.A. The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *J. Cell Biol.* 2019. 218, № 7. P. 2096–2112. <https://doi.org/doi:10.1083/jcb.201903090>

Надійшло до редакції 14.11.2020

REFERENCES

1. Zhang, Q.-Q. & Lu, L.-G. (2015). Nonalcoholic fatty liver disease: dyslipidemia, risk for cardiovascular complications, and treatment strategy. *J. Clin. Transl. Hepatol.*, 3, No. 1, pp. 78-84. <https://doi.org/10.14218/JCTH.2014.00037>
2. Wang, Y., Ding, W.-X. & Li, T. (2019). Cholesterol and bile acid-mediated regulation of autophagy in fatty liver diseases and atherosclerosis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1863, No. 7, pp. 726-733. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2018.04.005>
3. Püschel, G.P. & Henkel, J. (2018). Dietary cholesterol does not break your heart but kills your liver. *Porto Biomed. J.*, 3, No. 1, e12. <https://doi.org/10.1016/j.pbj.0000000000000012>
4. Kaiser, T., Kinny-Köster, B., Bartels, M., Berg, T., Scholz, M., Engelmann, C., Seehofer, D., Becker, S., Ceglarek, U. & Thiery, J. (2017). Cholesterol esterification in plasma as a biomarker for liver function and prediction of mortality. *BMC Gastroenterol.*, 17, No. 1, 57. <https://doi.org/10.1186/s12876-017-0614-9>
5. Dikkers, A. & Tietge, U.J.F. (2010). Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World J. Gastroenterol.*, 16, No. 47, pp. 5936-5945. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i47.5936>
6. Rudling, M., Laskar, A. & Straniero, S. (2019). Gallbladder bile supersaturated with cholesterol in gallstone patients preferentially develops from shortage of bile acids. *J. Lipid Res.*, 60, No. 3, pp. 498-505. <https://doi.org/10.1194/jlr.S091199>
7. Gryshchenko, V. A. (2019). Blood and acid composition of blood and biles in calves at enteropatology and application of milk phospholipids. *Ukr. J. Vet. Sci.*, 10, No. 4, pp. 36-42 (in Ukrainian). <https://doi.org/10.31548/ujvs2019.04.005>
8. Varganova, D. L., Pavlov, C. S., Casazza, G., Nikolova, D. & Glud, C. (2019). Essential phospholipids for people with non-alcoholic fatty liver disease. *Cochrane Database Syst Rev.*, No. 4, CD013301. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013301>
9. Maev, I. V., Samsonov, A. A., Palgova, L. K., Pavlov, C. S., Shirokova, E. N., Vovk, E. I. & Starostin, K. M. (2020). Effectiveness of phosphatidylcholine as adjunctive therapy in improving liver function tests in patients with non-alcoholic fatty liver disease and metabolic comorbidities: real-life observational study from Russia. *BMJ Open Gastroenterol.*, 7, No. 1, e000368. <https://doi.org/10.1136/bmjgast-2019-000368>

10. Jesch, E. D. & Carr, T. P. (2017). Food ingredients that inhibit cholesterol absorption. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 22, No. 2, pp.67-80. <https://doi.org/10.3746/pnf.2017.22.2.67>
11. Zhang, P., Chen, Y., Cheng, Y., Hertervig, E., Ohlsson, L., Nilsson, A. & Duan, R.-D. (2014). Alkaline sphingomyelinase (NPP7) promotes cholesterol absorption by affecting sphingomyelin levels in the gut: A study with NPP7 knockout mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 306, No. 10, pp. G903-G908. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00319.2013>
12. Gryshchenko, V., Danchenko, O. & Musiyshchuk, V. (2019). Modification of modeling method of toxic dystrophy of liver in rats. In Nadykto, V. (Eds). *Modern development paths of agricultural production* (pp. 689-697). Cham: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14918-5_67
13. Pat. 86516 UA, ICP 61K 35/20, A23K 1/00. Veterinary bioactive addition of liposomal form and method of reparative therapy in hepatology, Melnychuk, D. O., Gryshchenko, V. A. & Lytvynenko, O. M., Publ. 27.04.2009 (in Ukrainian).
14. Pat. 99031324 UA, IPC A61B5/14, Method of preparation of samples of bioridines to determine the content of substances of lipid nature, Vesel's'kyy, S. P., Lyashchenko, P. S., Kostenko, S. I., Horenko, Z. A. & Kurovs'ka, L. F., Publ. 15.02.2001 (in Ukrainian).
15. Schulze, R. J., Micah, B., Schott, M. B., Carol, A., Casey, C. A., Pamela, L., Tuma, P. L., Mark, A. & McNiven, M. A. (2019). The cell biology of the hepatocyte: A membrane trafficking machine. *J. Cell Biol.*, 218, No. 7, pp. 2096-2112. <https://doi.org/10.1083/jcb.201903090>

Received 14.11.2020

V.A. Tomchuk¹, V.A. Gryshchenko¹, S.P. Veselsky²,
Ye.M. Reshetnik², M.Y. Yevtushenko¹

¹National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv

²Taras Shevchenko National University of Kyiv

E-mail: viktoriya_004@ukr.net

CHOLESTEROL AND ITS ESTERS IN THE BILE OF RATS UNDER TETRACYCLINE-INDUCED HEPATOSIS AND AT THE USE OF MILK PHOSPHOLIPIDS

The increase of disorders of the cholesterol metabolism and the bile formation determines the need of the search for possible substances correcting the cholesterol metabolism in the liver. It is found that, in laboratory rats with an experimental drug form of steatosis, the excretion of cholesterol and, especially, cholesterol esters to the bile ducts is inhibited, and their ratio in bile is significantly impaired. The use of bioadditive "FLP-MD" made on milk phospholipids has a corrective effect on the concentration of cholesterol and its esters in bile of rats with tetracycline-induced steatosis. This allows us to recommend bioadditive "FLP-MD" made on milk phospholipids to improve the cholesterol metabolism in patients with clinical cases of drug-induced liver damage.

Keywords: *cholesterol, cholesterol's esters, milk phospholipids, bile, tetracycline, steatosis, rats.*