

УДК 612.357.1:577.175.44

І.П. Вашека, С.П. Весельський, З.А. Горенко, Л.С. Карбовська

ВПЛИВ КАЛЬЦИТОНІНУ НА ЛІПІДНИЙ СКЛАД ЖОВЧІ ЩУРІВ

В гострих дослідях на щурах з канюльованою загальною жовчною протокою досліджено вплив кальцитоніну на рівень холерезу та ліпідний склад жовчі. Впродовж трьох годин спроби визначали інтенсивність секреції жовчі та методом тонкошарової хроматографії вміст в ній окремих жовчних кислот та основних ліпідних компонентів. Показано, що синтетичний кальцитонін лосося в дозі 200 нг/кг маси тіла збільшує об'єм секретованої жовчі. Всього за три години досліду таке збільшення становило 17,4% ($p < 0,05$) щодо контрольних показників. Результати досліджень свідчать, що під впливом кальцитоніну спостерігається збільшення концентрації вільних жирних кислот та холестеролу. При цьому концентрації фосфоліпідів, тригліцеридів та ефірів холестеролу не мають статистично вірогідних відмінностей від контролю. При дії кальцитоніну з перебігом спроби значення коефіцієнта етерифікації холестеролу зменшуються. Проте при цьому зростає концентрація сумарних холатів, тобто колоїдні властивості жовчі не порушуються. Значення холато-холестеролового співвідношення після застосування кальцитоніну впродовж всього періоду спостереження перевищують відповідні значення контролю, що свідчить про покращення сольобілізуючих властивостей жовчі.

Ключові слова: кальцитонін, жовчоутворення, ліпіди, фосфоліпіди, тригліцериди, вільні жирні кислоти, холестерол, ефіри холестеролу.

Постановка проблеми. Аналіз останніх досліджень і публікацій. Кальцитонін – це гормон, котрий секретується парафолікулярними клітинами щитоподібної залози і є одним з гормонів, що забезпечують кальцієвий гомеостаз в організмі людини і тварин. Його основна фізіологічна функція полягає у регуляції рівня кальцію в крові шляхом посилення його екскреції нирками та зменшенні резорбції кісткової речовини остеобластами [5, 11]. Іншим важливим ефектом кальцитоніну є його вплив на діяльність органів шлунково-кишкового тракту. Так показано, що кальцитонін справляє протективний вплив на слизову оболонку шлунка [6, 8] пригнічує шлункову секрецію та секрецію ацинарних клітин підшлункової залози. На противагу цьому в кишечнику кальцитонін стимулює секрецію води та іонів натрію, калію та хлору [6]. В літературі є дані про вплив кальцитоніну на зовнішньосекреторну функцію печінки [2]. Так в експериментах на мурчаках було показано, що кальцитонін не впливає на об'єм виділеної жовчі, її рН, концентрацію білків, глюкози, небілкового азоту та жовчних кислот в печінковій жовчі [12]. В літературі є повідомлення про вплив кальцитоніну на ліпідний обмін в печінці. Так, показано, що в культурі гепатоцитів кальцитонін пригнічує синтез холестеролу та тригліцеридів з [14С]-ацетату або пальмітату [13]. Також, кальцитонін знижує рівень холестеролу та тригліцеридів в сироватці крові у щурів та кролів з ожирінням. Інші автори в дослідях на мурчаках показали, що кальцитонін не впливає на концентрацію холестеролу в печінковій жовчі [12]. Проте, роботи присвячені впливу кальцитоніну на ліпідний обмін є не чисельними та містять суперечливі дані.

Мета роботи - дослідити вплив кальцитоніну на ліпідний склад жовчі у щурів.

Методика

Досліди проведені за умов гострої спроби на самцях білих лабораторних щурів масою 200-250 г. Оперативне втручання проводили під тіопенталовим наркозом (75 мг/кг маси тіла тварини в 1 мл фізіологічного розчину, внутрішньочеревно), в ході якого у відпрепаровану загальну жовчну протоку вводили тонку канюлю, з'єднану з

мікропіпеткою, в яку збирали жовч. Тваринам дослідної групи внутрішньом'язово вводили синтетичний кальцитонін лосося (Міакальцик, Новартіс Фарма АГ, Швейцарія) в дозі 200 нг/кг маси тіла, розчинений у фізіологічному розчині з розрахунку об'єму 1 мл/кг маси тіла. Після чого збирали 6 півгодинних порцій жовчі, враховуючи її об'єм (в мікролітрах). Контролем слугували спроби із внутрішньом'язовим введенням тваринам відповідного об'єму фізіологічного розчину. В кожній відібраній пробі жовчі методом тонкошарової хроматографії та за допомогою денситометра ДО-1М визначали концентрації окремих жовчних кислот [1], вільних жирних кислот, фосфоліпідів, тригліцеридів, холестеролу та його ефірів [3].

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою пакету прикладних програм Statistica 6.0, використовуючи t-критерій Стьюдента, оскільки дані мали нормальний розподіл при перевірці їх за тестом Шапіро-Уїлка. Статистично значущими вважались відмінності між контролем і дослідом при $P < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Результати наших досліджень показали, що після внутрішньом'язового введення кальцитоніну в дозі 200 нг/кг маси тіла рівень секреції жовчі впродовж перших 1,5 годин досліду зріс, але ці зміни не були статистично вірогідними. В наступні 1,5 години спостерігається достовірне підвищення рівня холерезу щодо контролю (рис.1).

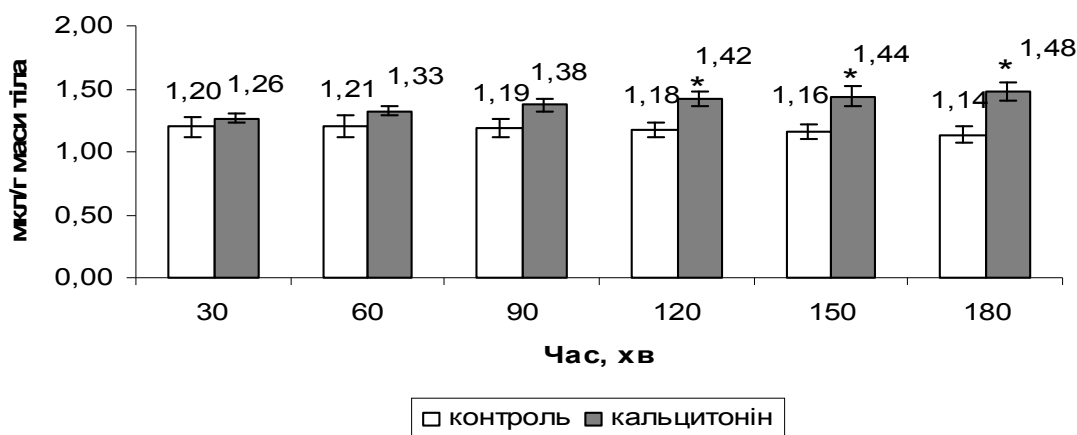


Рис.1. Динаміка змін секреції жовчі у щурів під впливом кальцитоніну ($M \pm m$; $n=36$) * - $p < 0,05$ щодо контролю.

Так, в першу півгодину досліду кількість секретованої печінкою щурів жовчі збільшилась на 5%; в другу – на 9,9%; в третю – на 16%, в четверту - на 20,3% ($p < 0,05$); в п'яту – на 24,1% ($p < 0,05$) і в шосту – на 29,8% ($p < 0,05$). В цілому за дослід жовчі секретувалось на 17,4% ($p < 0,05$) більше, ніж у інтактних тварин. Тобто кальцитонін, введений внутрішньом'язово, впливає на жовчоутворювальну функцію печінки, підвищуючи рівень секреції жовчі.

Порівнюючи отримані нами результати з даними джерел літератури слід зазначити, що вони не узгоджуються з повідомленнями інших авторів щодо впливу кальцитоніну на об'єм секретованої жовчі. Так за даними Jonderko K. та Bueno L. [8] у собак скоротлива активність жовчного міхура та викид жовчі у дванадцятипалу кишку, стимульованих споживанням їжі, пригнічувались після внутрішньовенного застосування кальцитоніну. За даними інших авторів внутрішньом'язове введення цього гормону мурчакам не призводило до статистично значущих змін об'єму виділеної жовчі [12]. Проте ці дослідження проводились на інших лабораторних тваринах або стимульованій холесекреції, а в якості гормонального чинника застосовувався кальцитонін свині.

Результати наших досліджень показали, що після внутрішньом'язового введення кальцитоніну в дозі 200 нг/кг маси тіла спостерігається тенденція до збільшення концентрації фосфоліпідів в жовчі щурів, але ці зміни не були статистично вірогідними (Табл.1).

Таблиця 1

Вплив кальцитоніну на концентрацію ліпідних компонентів в жовчі щурів ($M \pm m$; $n=18$)

Показник	Півгодинні проміжки часу	Серія дослідів	
		Контроль	Кальцитонін
Концентрація фосфоліпідів, мг%	1	71,25±3,67	75,95±6,34
	2	70,45±3,16	84,63±5,88
	3	71,53±4,28	85,28±4,96
	4	70,80±4,02	82,88±5,60
	5	72,15±2,96	78,48±5,20
	6	73,23±3,89	71,25±3,98
Концентрація тригліцеридів, мг%	1	2,30±0,30	2,15±0,26
	2	2,20±0,11	2,60±0,29
	3	2,08±0,21	2,55±0,20
	4	1,90±0,24	2,35±0,25
	5	1,95±0,19	2,13±0,20
	6	1,80±0,18	1,90±0,20
Концентрація вільних жирних кислот, мг%	1	11,68±0,72	16,73±0,80**
	2	11,55±0,85	14,18±0,79
	3	12,20±1,07	13,35±0,42
	4	12,00±0,95	13,60±0,74
	5	11,75±1,37	14,78±0,60
	6	11,78±0,88	16,35±0,55**

Примітки: ** - $p < 0,01$ щодо контролю

Основною формою депонування ліпідів в організмі є тригліцериди. В печінці відбувається синтез тригліцеридів з гліцеролу і жирних кислот та формування ліпопротеїдів низької щільності з холестеролу та тригліцеридів. Проводячи біохімічний аналіз жовчі, доцільним було з'ясувати зміни концентрації тригліцеридів в жовчі щурів після введення кальцитоніну. Так під впливом гормону показники концентрації тригліцеридів були меншими за контрольні впродовж всього періоду спостереження (Табл.1). Це зменшення становило в першому півгодинному проміжку часу 6,5%, в другому 18,2%, в третьому 22,6%, в четвертому 23,7%, в п'ятому 9,2% і в шостому 5,6%. Проте статистично значущими ці зміни не були.

Результати біохімічного аналізу жовчі показали тенденцію до збільшення концентрації вільних жирних кислот, але достовірним це збільшення було лише в першій та останній півгодинах дослідження (Табл.1). Так в першій пробі жовчі концентрація вільних жирних кислот збільшилася на 43,2% ($p < 0,01$), в другій – на 22,8%, в третій – на 9,4%, в четвертій – на 13,4%, в п'ятій – на 25,8% і в шостій – на 38,8% ($p < 0,01$).

Значну частку серед ліпідів, які метаболізуються в печінці становить холестерол та його ефіри. Як показали наші дослідження концентрація вільного холестеролу збільшувалася впродовж всього дослідження але достовірним це збільшення було лише в другій та третій півгодинних пробах (Табл.2.). Так концентрація холестеролу в перші

30 хв збільшилася на 13,2%, в другі – на 23,1%($p<0,05$), в треті – на 20,6%($p<0,01$), в четверті – 21,9%, в п'яті – на 11,8% і в шості – на 2,6% щодо контрольних показників.

Таблиця 2

Зміни коефіцієнта етерифікації та холато-холестеролового коефіцієнта в жовчі щурів під впливом кальцитоніну ($M\pm m$; $n=18$)

Показник	Півгодинні проміжки часу	Серія дослідів	
		Контроль	Кальцитонін
Концентрація сумарних жовчних кислот (мг%)	1	443,82 ± 27,05	526,29 ± 21,83*
	2	419,50 ± 25,02	525,41 ± 25,09*
	3	428,30 ± 28,20	503,40 ± 22,89
	4	414,48 ± 28,34	490,61 ± 24,25
	5	403,82 ± 26,05	464,24 ± 25,26
	6	394,62 ± 24,33	432,27 ± 25,55
Концентрація вільного холестеролу (мг%)	1	19,50 ± 1,14	22,08 ± 1,59
	2	19,33 ± 0,57	23,80 ± 1,51*
	3	20,13 ± 0,78	24,28 ± 0,43**
	4	18,85 ± 0,99	22,98 ± 1,56
	5	18,78 ± 1,12	21,00 ± 0,99
	6	18,55 ± 1,22	19,03 ± 0,93
Холато-холестероловий коефіцієнт	1	22,76	23,84
	2	21,70	22,08
	3	21,28	20,73
	4	21,99	21,35
	5	21,50	22,11
	6	21,27	22,72
Концентрація Ефірів холестеролу (мг%)	1	2,70±0,33	2,48±0,33
	2	2,65±0,21	1,93±0,27
	3	2,55±0,24	1,70±0,23*
	4	2,38±0,25	1,90±0,23
	5	2,35±0,26	1,88±0,25
	6	2,20±0,18	1,73±0,20
Коефіцієнт етерифікації	1	0,138	0,112
	2	0,137	0,081
	3	0,127	0,070
	4	0,126	0,083
	5	0,125	0,090
	6	0,119	0,091

Примітки: * - $p<0,05$; ** - $p<0,01$ щодо контролю.

Важливе значення для оцінки літогенності жовчі має співвідношення між сумарними жовчними кислотами і холестеролом. Тому ми дослідили як змінилось холато-холестеролове співвідношення, при дії кальцитоніну (Табл.2). З'ясувалось, що в жовчі щурів впродовж контрольних дослідів концентрація як сумарних жовчних кислот, так і холестеролу зменшується. Проте відсоткове співвідношення між ними практично не змінюється – в першій пробі жовчі таке становило 95,7:4,3%, а в останній 95,5:4,5%. Внаслідок чого значення холато-холестеролового коефіцієнта впродовж спроби коливалися від 22,76 на початку дослідю до 21,27 наприкінці. Тобто з перебігом

спроби відбувається пропорційне зменшення концентрацій як сумарних жовчних кислот, так і холестеролу. Після введення щурам кальцитоніну спостерігається збільшення щодо контролю концентрації як сумарних жовчних кислот, так і холестеролу. Так, якщо в першому півгодинному проміжку часу співвідношення сумарні холати/холестерол становило 96:4%, то в останньому таке було 95,8:4,2%. Це призвело до зменшення з перебігом спроби холато-холестеролового коефіцієнта - від 23,84 в першій півгодинній пробі до 22,72 в останній. Проте, порівняльний аналіз значень холато-холестеролового коефіцієнта в контролі і досліді, показав, що при дії кальцитоніну значення коефіцієнта перевищують такі контролю. Тобто під впливом кальцитоніну відбувається збільшення показника холато-холестеролового співвідношення, а отже колоїдні властивості жовчі покращуються.

Важливу частку серед ліпідів, які метаболізуються в печінці становлять ефіри холестеролу. Біохімічний аналіз жовчі показав, що концентрація ефірів холестеролу зменшувалася впродовж всього досліді, але достовірним це зменшення було лише в третій півгодинній пробі (Табл.2). В першій пробі зменшення становило 8,1%, в другій 27,2%, в третій 33,4% ($p < 0,05$), в четвертій 20,2%, в п'ятій 20% і в шостій 21,4%.

Одним з важливих показників функціонального стану печінки є значення коефіцієнта етерифікації. Оскільки зміна співвідношення між етерифікованою і вільною формою холестеролу та збільшення вмісту в жовчі останнього може свідчити про порушення колоїдних властивостей жовчі та розвиток холестазу. Результати наших досліджень показали, що в жовчі контрольних дослідів концентрація як етерифікованого, так і вільного холестеролу з перебігом спроби зменшується (Табл.2). При цьому відсоткове співвідношення між цими групами становило в першій пробі 12,2:87,8%, а в останній 10,6:89,4%. Внаслідок чого значення коефіцієнта етерифікації становило на початку досліді 0,138 і наприкінці – 0,119. Після введення щурам кальцитоніну спостерігається зменшення концентрації ефірів холестеролу і збільшення концентрації його вільної форми. Відсоткове співвідношення, як і значення коефіцієнта етерифікації також змінюється. Так якщо в першій пробі співвідношення становило 10,1% до 89,9%, а значення коефіцієнта етерифікації дорівнювало 0,112, то в останній таке було 8,4% до 91,6% і коефіцієнт етерифікації дорівнював 0,091. Отже, під впливом кальцитоніну спостерігається зменшення значень коефіцієнта етерифікації. Проте слід зазначити, що при цьому зростає концентрація сумарних холатів, тобто колоїдні властивості жовчі не порушуються.

За даними джерел літератури в процесах екскреції холестеролу з гепатоцитів у жовч беруть участь транспортери ABCG5/ABCG8 та ABCA1. Транспортер холестеролу ABCA1 є у макрофагах, ентероцитах та гепатоцитах, а транспортер ABCG5/ABCG8 локалізований лише на каналікулярній мембрані гепатоцитів. При збільшенні внутрішньоклітинного пулу цАМФ спостерігається активація обох транспортерів - ABCG5/ABCG8 та ABCA1, внаслідок чого посилюється екскреція холестеролу з гепатоцитів у жовч і зростає його концентрація в секреті [9]. Оскільки на гепатоцитах локалізовані кальцитонінові рецептори C1b типу [4, 10], активація яких призводить до збільшення рівня внутрішньоклітинного цАМФ, ми можемо припускати, що збільшення концентрації холестеролу, показане в наших дослідженнях, є наслідком зв'язування кальцитоніну з власними рецепторами, внаслідок чого збільшується концентрація цАМФ з подальшою активацією транспортерів холестеролу ABCG5/ABCG8 і ABCA1 та посиленням екскреції холестеролу у жовч.

Висновки

Отже, кальцитонін введений внутрішньом'язово змінює хімічний склад жовчі, зокрема, вміст ліпідних компонентів в ній. На фоні зростання зівня холерезу

спостерігається збільшення концентрації вільного холестеролу. Разом з цим, підвищується концентрація сумарних жовчних кислот, тобто колоїдні властивості жовчі не порушуються.

Література

1. А.с. 1624322 СССР, МБИ G 01 N 33/50 Способ определения желчных кислот в биологической жидкости / С.П.Весельский, П.С.Ляшенко, И.А.Лукияненко (СССР); - № 4411066/14; заявл. 25.01.1988; опубл.30.01.1991, Бюл.№ 4.
2. Горенко З.А. Вплив кальцитоніну на зовнішньосекреторну функцію печінки у щурів (The influence of calcitonin on the liver bile formation function in rats) / З.А.Горенко, Л.С.Карбовська., І.П.Вашека [та ін.] // Фізіол.журн. – 2011. – Т.57, №3. – С.40-48
3. Патент 33564 А Україна, МПК А 61В 5/14. Спосіб підготовки проб біорідин для визначення вмісту речовин ліпідної природи / Весельський С.П., Ляшенко П.С., Костенко С.І., Горенко З.А., Куровська Л.Ф.; заявник та власник патенту Київський університет імені Тараса Шевченка - № 99031324; заявл.11.03.99; опубл.15.02.2001, Бюл.№ 1.
4. Bracq S. Calcitonin gene expression in normal in normal human liver / S.Bracq., M.Machairas, B.Clement [et al.] // FEBS. – 1993. – V.331. – P.15-18.
5. Davey R. Calcitonin receptor plays a physiological role to protect against hypercalcemia in mice / R.Davey., A.Turner., J.McManus [et al.] // J.Bone Miner. Res. – 2008. – V.23(8). – P.1182-1193.
6. Dubay D. Intracerebroventricular calcitonin prevents stress-induced gastric dysfunction / D.Dubay., K.Ephgrave., J.Cullen. // J. Surg. Res. – 2003. – V.110, Iss.1. – P.188-192.
7. Hotz J. Calcitonin and exocrine pancreatic secretion in man: inhibition of enzymes stimulated by CCK-pancreozymin, caerulein, or calcium – no response to vagal stimulation / J.Hotz., H.Goebell., R.Ziegler // Gut. – 1977. – V.18. – P.615-622.
8. Jonderko K. Effect of peripherally and centrally administered calcitonin on gallbladder emptying in dogs / K.Jonderko., L.Bueno // J. Gastroenterol. – 1997. – V.32. – P.380-388.
9. Kullak-Ublick G. Enterohepatic bile salt transporters in normal physiology and liver disease / G.Kullak-Ublick., B.Stieger, P.Meier // Gastroenterol. – 2004. – V.126(1). – P.322-342.
10. Poyner G. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonins receptors / G.Poyner., P.Sexton, I.Mashall [et al.] // Pharmacol. Rev. – 2002. – V.54, №2. – P.233-246.
11. Sommerville B. Changes in renal function of the chicken associated with calcitonin and parathyroid hormone / B.Sommerville., J.Fox // Gen. Comp. Endocrinol. – 1987. –V.66. – P.381-386.
12. Tarnawski A.. Effect of calcitonin on the formation, composition, and enzymatic activity of the hepatic bile in guinea pigs / A.Tarnawski., J.Bogdal., K.Dura [et al.] // Gut. – 1974. – V.15, № 9. – P.703-705.
13. Werner S. Inhibitory effects of calcitonin on lipolysis and calcium accumulation in rat adipose tissue in vivo / S.Werner., H.Low // Horm. Metab. Res. – 1974. – V.6. – P.30-36.

Аннотация. *Вашека И.П., Весельский С.П., Горенко З.А., Карбовская Л.С. Влияние кальцитонина на липидный состав желчи крыс. В острых опытах на крысах с канюлированным общим желчным протоком исследовано влияние кальцитонина на уровень холереза и липидный состав желчи. В течение 3 часов опыта учитывали интенсивность секреции желчи и методом тонкослойной хроматографии определяли содержание в ней основных липидных компонентов. Показано, что синтетический кальцитонин лосося, введённый внутримышечно в дозе 200 нг/кг, увеличивает объем отделяемой желчи. Вего за три часа опыта такое увеличение составило 17,4% ($p < 0,05$) по отношению к контролю. Результаты исследований свидетельствуют, что под влиянием кальцитонина происходит увеличение концентрации свободных жирных кислот и холестерола. При этом концентрации фосфолипидов, триглицеридов и эфиров холестерола не имеют статистически значимых отличий от контрольных показателей. При действии кальцитонина в течение опыта значения коэффициента этерификации холестерола уменьшаются. При этом возрастает концентрация суммарных холатов, то есть коллоидные свойства желчи не нарушаются. Значения холато-холестеролового соотношения после введения кальцитонина в течение всего периода наблюдения превышают соответствующие значения в контроле, что свидетельствует об улучшении солюбилизирующих свойств желчи.*

Ключевые слова: кальцитонин, желчеобразование, липиды, фосфолипиды, триглицериды, свободные жирные кислоты, холестерол, эфиры холестерола.

Summary. *Vasheka I., Veselsky S., Gorenko Z., Karbovska L. The influence of calcitonin on bile lipidic composition in rats.* The influence of calcitonin on the choleresis level and bile lipidic composition was investigated in acute experiments on the rats with common biliary duct cannulated. We determined the intensity of bile secretion during 3 hours and quantitative content of lipids component using thin-layer chromatography. It was shown that intramuscular introduction of synthetic salmon calcitonin (200 ng/kg) increases the amount of bile secreted. In result bile volume has increased on 17,4% ($p < 0,05$) as compared with control. The results of investigation indicate that under calcitonin influence to increase the concentration of free fatty acids and cholesterol. The concentration of phospholipids, triglycerides and cholesterol esters does not change. Value of cholesterol etherification index have decreased under the administration of calcitonin. But concentration of total bile acids is increased. However colloidal properties of bile is not broken. Value of cholato/cholesterol index have increased under the influence of calcitonin. It shows about improving of solubilization characteristic of bile.

Key words: calcitonin, bile formation, lipids phospholipids, triglycerides, free fatty acids, cholesterol, cholesterol esters.

Київський національний університет імені Богдана Хмельницького

Одержано редакцією 14.11.2012
Прийнято до публікації 9.01.2013