

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛИТОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ УРСОДЕЗОКСИХОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ И КСИЛОЛА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ КОНТАКТНОМ ХИМИЧЕСКОМ ЛИТОЛИЗЕ КАМНЕЙ ЖЕЛЧНОГО ПУЗЫРЯ

<sup>1</sup>Волкова О.В., <sup>2</sup>Магомедов Р.Г., <sup>1</sup>Тимановский А.С., <sup>1</sup>Павлинов Н.Д., <sup>1</sup>Щеглова Н.Е.

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь, e-mail: info@tvgtmu.ru;

<sup>2</sup>ГБУЗ «Клиническая больница скорой медицинской помощи», Тверь, e-mail: gkbsmp@yandex.ru

Цель работы – определение литолитической активности урсодезоксихолевой кислоты и ксилола методом контактного химического литолиза. В основе образования камней лежит избыточная концентрация желчи, дисбаланс ее химического состава и снижение эвакуаторной функции желчного пузыря. В эксперименте использовались пигментные камни, полученные от пациентов с хроническим калькулезным холециститом в результате лапароскопической холецистэктомии. Для подтверждения состава камней проводилась качественная реакция на билирубин с применением раствора нитрата натрия. Исследование было выполнено на 20 свиных желчных пузырях, в которые помещались пигментные билирубиновые камни с добавлением препарата урсодезоксихолевой кислоты и ксилола разных концентраций. В результате проведенного экспериментального контактного химического литолиза было установлено наличие незначительного положительного литолитического эффекта препарата «Урсосан» в отличие от раствора ксилола, который показал 100% литолитический эффект. Однако при исследовании *in vivo* прямого действия ксилола на слизистую оболочку желчного пузыря был выявлен некроз. С учетом полученных результатов можно сделать вывод, что разработка препаратов на основе производных ксилола, обладающего литолитическими свойствами, может стать перспективным направлением при изучении новых возможных способов консервативного лечения пациентов с желчнокаменной болезнью.

Ключевые слова: желчный пузырь, контактный химический литолиз, ксилол, урсодезоксихолевая кислота.

## DETERMINATION OF THE LITHOLYTIC ACTIVITY OF URSODEOXYCHOLIC ACID AND XYLENE IN EXPERIMENTAL CONTACT CHEMICAL LITHOLYSIS OF GALLBLADDER STONES

<sup>1</sup>Volkova O.V., <sup>2</sup>Magomedov R.G., <sup>1</sup>Timanovskiy A.S., <sup>1</sup>Pavlinov N.D., <sup>1</sup>Shcheglova N.E.

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of TVER State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tver, e-mail: info@tvgtmu.ru;

<sup>2</sup>State budgetary healthcare institution "Clinical Hospital of Emergency Medicine", Tver, e-mail: gkbsmp@yandex.ru

The aim of the work is to determine the litholytic activity of ursodeoxycholic acid and xylene by contact chemical litholysis. The formation of stones is based on an excessive concentration of bile, an imbalance in its chemical composition and a decrease in the evacuation function of the gallbladder. The experiment used pigment stones obtained from patients with chronic calculous cholecystitis as a result of laparoscopic cholecystectomy. To confirm the composition of the stones, a qualitative reaction to bilirubin was carried out using a solution of sodium nitrate. The study was performed on 20 pig gall bladders, in which pigmented bilirubin stones were placed with the addition of ursodeoxycholic acid and xylene of different concentrations. As a result of the experimental chemical contact litholysis, it was found that there was a slight positive litholytic effect of the drug Ursosan, in contrast to the xylene solution, which showed a 100% litholytic effect. However, an *in vivo* study of the direct effect of xylene on the mucous membrane of the gallbladder revealed necrosis. Taking into account the results obtained, it can be concluded that the development of drugs based on xylene derivatives with litholytic properties may become a promising direction in the study of new possible methods of conservative treatment of patients with cholelithiasis.

Keywords: gallbladder, contact chemical litholysis, xylene, ursodeoxycholic acid.

### Введение

Желчнокаменная болезнь (ЖКБ), холелитиаз – многофакторное хроническое заболевание с генетической предрасположенностью, при котором наблюдается образование камней в желчных путях [1]. В развитых странах данная патология имеет очень широкое

распространение, около 10-15% случаев на 100 тыс. населения. В то же время в Африке, странах Азии и Японии распространенность этого заболевания 3,5-5%. В процессе проведения эпидемиологического исследования NANESH III были выявлены значительные различия в частоте распространенности ЖКБ у разных рас, что подтверждает значительную роль генетической предрасположенности в патогенезе холелитиаза. Существуют своеобразные народы-лидеры по встречаемости ЖКБ, например у мексиканцев и чилийских индейцев вероятность образования камней составляет 45-80% [2].

Выделяют многообразие факторов риска ЖКБ, но к самым распространенным относят, безусловно, возраст. Так, максимальную частоту клинических проявлений холелитиаза регистрируют в возрасте 40–69 лет [2]. У женщин риск развития ЖКБ примерно в 2-3 раза выше, чем у мужчин, что обусловлено повышением литогенных свойств желчи под действием эстрогенов [3]. При беременности у 20-30% пациенток развивается билиарный сладж, а в 5-12% случаев образуются желчные конкременты [2]. Назначение заместительной гормональной терапии у женщин в постменопаузе увеличивает риск ЖКБ в 3,7 раза [4]. Ожирение, гипертриглицеридемия, метаболический синдром, нерегулярное, неправильное, а также парентеральное питание тоже являются значимыми факторами риска холелитиаза [3; 5; 6]. У лиц, страдающих циррозом печени, риск развития ЖКБ возрастает в 10 раз [2]. Быстрое снижение массы тела, бариатрические вмешательства также увеличивают вероятность развития ЖКБ в среднем на 30% [7].

Таким образом, ЖКБ является серьезной проблемой медицины в развитых странах. Она занимает третье место после сердечно-сосудистых заболеваний и сахарного диабета, является самой частой причиной госпитализации среди всех заболеваний пищеварительной системы в странах Европы [8].

В основе образования камней лежит избыточная концентрация желчи, дисбаланс ее химического состава и снижение эвакуаторной функции желчного пузыря. По происхождению выделяют два основных типа камней: холестериновые, содержат в своем составе более 60% холестерина (ХС), желчные пигменты, соли кальция, белковые соединения (муцины); и пигментные, имеют в своем составе менее 20% холестерина, содержат в основном кальция билирубинат и другие полимеры кальция, а также гликопротеины слизи [9]. 2/3 пациентов имеют холестериновые камни [10].

В связи с появлением новых технологий в современной гастроэнтерологии прослеживается тенденция к развитию и использованию органосохраняющих методов, в том числе и для терапии холелитиаза. Из общей популяции больных ЖКБ 20–30% могут быть подвергнуты литолитической терапии [10]. Наряду с активным применением пероральной литолитической терапии, активно изучаются методы контактного химического литолиза –

растворения камней в желчном пузыре с использованием химических соединений с сохранением его как анатомического органа и, естественно, его функции [2; 11]. Химическими соединениями, которые описаны в литературе, в подобных исследованиях были, например, метилтретбутиловый эфир, октановая кислота [11; 12]. Поэтому в настоящем исследовании были предприняты попытки изучить свойства иного химического соединения, которое было бы способно растворить соединения билирубина с кальцием в составе желчных камней путем контактного химического литолиза, что и определяет актуальность работы.

### **Цель исследования**

Определение литолитической активности урсодезоксихолевой кислоты и ксилота методом экспериментального контактного химического литолиза.

### **Материалы и методы исследования**

В эксперименте использовались пигментные камни, полученные от пациентов с хроническим калькулезным холециститом в результате лапароскопической холецистэктомии (ЛХЭ). Исследование проводилось на 20 свиных желчных пузырях, предоставленных ООО «Заволжский мясокомбинат».

Для подтверждения состава камней проводилась качественная реакция на билирубин с применением раствора нитрата натрия 75 ммоль/л и раствора, содержащего сульфаниловую кислоту – 29 ммоль/л и соляную кислоту – 17 ммоль/л.

В первой части нашей работы решено было определить литолитический эффект уже существующих препаратов на основе урсодезоксихолевой кислоты. В качестве такого препарата был взят «Урсосан» («ЗиО-Здоровье», Россия). С этой целью желчные камни предварительно взвешивались (m1 мг) и помещались в желчные пузыри, содержащие желчь. Всего было взято 10 желчных пузырей, в каждый из которых было помещено по 2 камня. Начальная концентрация «Урсосана» составляла 250 мг, далее концентрацию «Урсосана» постепенно увеличивали.

Были проведены следующие серии опытов:

- 1.1 опыт: концентрация препарата – 250 мг = 1 капсула;
- 1.2 опыт: концентрация препарата – 500 мг = 2 капсулы;
- 1.3 опыт: концентрация препарата – 750 мг = 3 капсулы;
- 1.4 опыт: концентрация препарата – 1000 мг = 4 капсулы;
- 1.5 опыт: концентрация препарата – 1250 мг = 5 капсул;
- 1.6 опыт: концентрация препарата – 1500 мг = 6 капсул;
- 1.7 опыт: концентрация препарата – 1625 мг = 6,5 капсулы;
- 1.8 опыт: концентрация препарата – 1750 мг = 7 капсул;
- 1.9 опыт: концентрация препарата – 1875 мг = 7,5 капсулы;

1.10 опыт: концентрация препарата – 2000 мг = 8 капсул.

Все желчные пузыри помещали в термостат и проводили инкубацию при температуре 37 °С в течение 24 часов. По истечении 24 часов времени ( $t = 1440$  мин.) эксперимент прерывался, остатки конкрементов извлекались из желчных пузырей, высушивались и повторно взвешивались ( $m_2$  мг).

Во второй части эксперимента пигментные камни (по 2 штуки), предварительно взвешивая ( $m_1$  мг), также помещали в желчные пузыри с последующем добавлением раствора ксилола («ПромХим», Россия) разной концентрации, разведенного в физиологическом растворе хлорида натрия («Гротекс», Россия). Также было взято 10 желчных пузырей.

Проведена следующая серия опытов:

- 2.1 опыт: концентрация ксилола – 10%;
- 2.2 опыт: концентрация ксилола – 20%;
- 2.3 опыт: концентрация ксилола – 30%;
- 2.4 опыт: концентрация ксилола – 40%;
- 2.5 опыт: концентрация ксилола – 50%;
- 2.6 опыт: концентрация ксилола – 60%;
- 2.7 опыт: концентрация ксилола – 70%;
- 2.8 опыт: концентрация ксилола – 80%;
- 2.9 опыт: концентрация ксилола – 90%;
- 2.10 опыт: концентрация ксилола – 100%.

Желчные пузыри помещали в термостат и инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов. По истечении 24 часов времени ( $t = 1440$  мин.) остатки конкрементов извлекались из желчных пузырей, высушивались и повторно взвешивались ( $m_2$  мг).

Для оценки результатов проводимого эксперимента авторами был использован описанный в литературе коэффициент литолитической активности (К), отражающий время растворения конкремента в пересчете на 1 мг массы камня, который рассчитывали по формуле:  $K=t/m_2-m_1$  [12].

После постановки опытов на уже изъятых желчных пузырях было решено провести исследование *in vivo* на желчном пузыре здорового кролика. Целью этой операции было определение морфологических изменений слизистой оболочки желчного пузыря в результате прямого действия ксилола.

Операция проводилась в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных, под общей анестезией (Золетил 100, Virbac, Франция).

Кролику в желчный пузырь был введен раствор ксилола с наименьшей эффективной концентрацией, равной 10%. Пузырный проток кролика был перевязан для избежания выброса

раствора вместе с желчью в кишечник. После чего кролик был оставлен на два часа для обеспечения действия препарата на слизистую. Спустя 2 часа кролик был выведен из эксперимента путем введения летальных доз тиопентала натрия. Желчный пузырь был изъят, помещен на 24 часа в 10% раствор формальдегида, далее доставлен на патоморфологическое исследование, гистологические срезы окрашивались гематоксилином-эозином.

Математические расчеты производили с помощью Microsoft Excel.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В результате качественной реакции на билирубин с применением раствора нитрата натрия было выявлено красное окрашивание раствора, содержащего реагент и камни, что говорит о положительной качественной реакции на общий билирубин.

Далее оценивался литолитический эффект урсодезоксихолевой кислоты в разных ее концентрациях путем расчета коэффициента литолитической активности (К) (табл. 1).

Таблица 1

Литолитическая активность (К) «Урсосана» различной концентрации

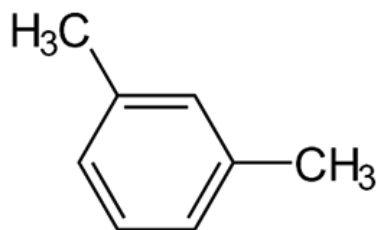
<b>Растворитель</b>	<b>К (мин./мг)</b>
Урсосан, 250 мг (1 капсула)	0,072
Урсосан, 500 мг (2 капсулы)	0,072
Урсосан, 750 мг (3 капсулы)	0,072
Урсосан, 1000 мг (4 капсулы)	0,076
Урсосан, 1250 мг (5 капсул)	0,080
Урсосан, 1500 мг (6 капсул)	0,080
Урсосан, 1625 мг (6,5 капсулы)	0,090
Урсосан, 1750 мг (7 капсул)	0,096
Урсосан, 1875 мг (7,5 капсулы)	0,102
Урсосан, 2000 мг (8 капсул)	0,111

Растворимость конкрементов была прямо пропорциональна дозе «Урсосана», легче всего растворялись камни, помещенные в желчный пузырь с добавлением 1000 и более мг препарата.

Таким образом, настоящее исследование показывает слабые свойства урсодезоксихолевой кислоты как растворителя в отношении пигментных камней желчного пузыря, особенно в низких концентрациях.

Вторая серия опытов заключалась в растворении камней в растворе ксилола.

Согласно данным литературы, ксилол относится к углеводородам ароматического ряда и состоит из двух метильных групп и одного бензольного кольца (рис.).



Формула ксилола:  $(CH_3)_2C_6H_4$

Ксилол представляет собой бесцветную жидкость с характерным запахом, малорастворим в воде, при этом хорошо растворяется в органике. Обладает свойствами ароматических соединений, легко алкилируется, хлорируется, сульфируется и нитруется [13]. Таким образом, ксилол представляет собой универсальный органический растворитель, в том числе и в отношении конкрементов желчного пузыря.

В ходе проведения эксперимента были получены следующие коэффициенты литолитической активности раствора ксилола в зависимости от его концентрации (табл. 2).

Таблица 2

Литолитическая активность (К) ксилола в различной концентрации

Растворитель	К (мин./мг)
Ксилол, 10% раствор	0,085
Ксилол, 20% раствор	0,096
Ксилол, 30% раствор	0,144
Ксилол, 40% раствор	0,144
Ксилол, 50% раствор	0,160
Ксилол, 60% раствор	0,160
Ксилол, 70% раствор	0,180
Ксилол, 80% раствор	0,288
Ксилол, 90% раствор	0,360
Ксилол, 100% раствор	0,720

На основании данной серии опытов можно сделать заключение, что раствор ксилола даже в минимальной используемой концентрации (10%) оказал значимый литолитический эффект по отношению к желчным пигментным камням.

Однако, по результатам патоморфологического исследования, при окрашивании гематоксилином-эозином были выявлены классические признаки некроза слизистой оболочки

желчного пузыря, что указывает на необходимость изучения безопасности применения ксиллола и его производных.

### **Выводы**

1. Таким образом, в ходе проведенных опытов установлены статистически значимые отличия литолитической активности раствора ксиллола в сравнении с препаратом урсодезоксихолевой кислоты «Урсосан» ( $p=0,013$ ).
2. С учетом полученных результатов можно сделать вывод, что разработка препаратов на основе ксиллола, обладающего литолитическими свойствами, может стать перспективным направлением при изучении новых возможных способов консервативного лечения пациентов с ЖКБ. Однако результаты настоящего исследования требуют дальнейшего более подробного изучения как местного воздействия ксиллола и его производных, в частности на слизистую оболочку желчного пузыря (ее жизнеспособность, риск возникновения дистрофических и атрофических процессов), так и оценки риска возникновения системных эффектов (канцерогенный, токсический и др.).

### **Заключение**

В результате настоящего исследования установлен абсолютный литолитический эффект раствора ксиллола в отношении пигментных конкрементов желчного пузыря в сравнении с лекарственным препаратом урсодезоксихолевой кислоты «Урсосан», литолитические свойства которого оказались менее значимы. Таким образом, дальнейшее изучение свойств ксиллола и его производных может стать перспективным вектором в поиске новых направлений консервативной терапии пациентов с ЖКБ.

### **Список литературы**

1. Скворцов В.В., Халилова У.А. Диагностика и лечение желчнокаменной болезни // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018. № 9. С. 142-150.
2. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Баранская Е.К., Охлобыстин А.В., Шульпекова Ю.О., Трухманов А.С., Шептулин А.А., Лапина Т.Л. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению желчнокаменной болезни // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2016. № 26(3). С.64-80.
3. Грищенко Е.Б. Терапия желчнокаменной болезни: трудности и перспективы // Consilium Medicum. 2018. № 20(8). С.42–52. DOI: 10.26442/2075-1753\_2018.8.42-52.
4. Marjoribanks J., Farquhar C., Roberts H., Lethaby A. Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women // Cochrane Database Syst Rev. 2017. Vol. 1. P. CD004143.

5. Shabanzadeh D.M., Skaaby T., Sørensen L.T., Eugen-Olsen J., Jørgensen T. Metabolic biomarkers and gallstone disease - a population-based study // *Scand J Gastroenterol.* 2017. Vol. 52(11). P. 1270-1277. DOI:10.1080/00365521.2017.1365166.
6. Di Ciaula A., Wang D.Q., Portincasa P. Cholesterol cholelithiasis: part of a systemic metabolic disease, prone to primary prevention // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2019. Vol. 13(2). P. 157-171. DOI:10.1080/17474124.2019.
7. Скворцов В.В., Халилова У.А. Диагностика и лечение желчнокаменной болезни // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2018. № 9(157). С.142-150. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-157-9-142-150.
8. Farthing M., Roberts S.E., Samuel D.G., Williams J.G., Thorne K., Morrison-Rees S., John A., Akbari A., Williams J.C. Survey of digestive health across Europe: final report. Part 1: The burden of gastrointestinal diseases and the organization and delivery of gastroenterology services across Europe // *UEGJ.* 2014. Vol. 2(6). P. 539-543. DOI:10.1177/2050640614554154.
9. Никитин И.Г., Волнухин А.В. Желчнокаменная болезнь: эпидемиологические данные, ключевые аспекты патогенеза и коморбидности, актуальные терапевтические мишени // *PMЖ. Медицинское обозрение.* 2020. № 4(5). С. 290–296. DOI: 10.32364/2587-6821-2020-4-5-290-296.
10. Селезнева Э.Я., Быстровская Е.В., Орлова Ю.Н., Коричева Е.С., Мечетина Т.А. Алгоритм диагностики и лечения желчнокаменной болезни // *PMЖ.* 2015. № 13. С. 730–737.
11. You D.D., Cho S.J., Kim O.H., Song J.S., Hwang K.S., Lee S.C., Kim K.H., Choi H.J., Hong H.E., Seo H., Hong T.H., Park J.H., Lee T.Y., Ahn J., Jung J.K., Jung K.Y., Kim S.J. Superior gallstone dissolubility and safety of tert-amyl ethyl ether over methyl-tertiary butyl ether // *World J Gastroenterol.* 2019. Vol. 25(39). P. 5936-5952. DOI: 10.3748/wjg.v25.i39.5936.
12. Размахнин Е.В., Коновалова О.Г. Октановая кислота в лечении желчнокаменной болезни (экспериментальное исследование) // *Сибирское медицинское обозрение.* 2014. № 5. С. 36-40.
13. ГОСТ 30333-2007. Ксилол (изомеры). Паспорт безопасности. Пересмотр 02.03.2024.