

F. CANTALAMESSA
C. NASUTI
E. GRANDI

Effetti dell'acqua "San Giovanni" sulla funzionalità epatica del ratto ipercolesterolemico

The effects of "San Giovanni" water on the hepatic function of hypercholesterolaemic rats

Parole chiave:

Ipercolesterolemia
Acqua Sulfurea
Acidi biliari
Coleresi
Calcoli biliari

Key Words:

Hypercholesterolaemia
Sulphureous water
Biliary acids
Choleresis
Gallstones

RIASSUNTO

Tra le diverse patologie che interessano la funzionalità epatica, l'ipercolesterolemia è di notevole interesse per la stretta correlazione che ha con l'arteriosclerosi e l'infarto miocardio.

L'assunzione *ad libitum*, di acqua sulfurea denominata "San Giovanni" induce, nei ratti alimentati con dieta ipercolesterolemica, un minore innalzamento dei livelli plasmatici del colesterolo, dei fosfolipidi e degli acidi biliari ed un aumento della coleresi e del metabolismo del colesterolo.

Il trattamento, stimolando la produzione di una bile più diluita e ricca di sostanze solubilizzanti il colesterolo, può ostacolare l'organicizzazione dei componenti biliari che rappresenta il primo stadio nello sviluppo dei calcoli biliari.

SUMMARY

Among the various pathologies of hepatic function, hypercholesterolaemia is of considerable interest because of its close correlation with arteriosclerosis and myocardial infarction. Ad libitum consumption of "San Giovanni" sulphureous water induces in rats fed a hypercholesterolemic diet, a lower elevation of blood cholesterol levels, of phospholipids and of biliary acids, and an increase in choleresis and in cholesterol metabolism.

This treatment, by stimulating production of a more diluted bile that is rich in substances that solubilize cholesterol, can block the organization of biliary components, the first stage of gallstone formation.

INTRODUZIONE

La letteratura idrologica, le applicazioni clinico-terapeutiche e la pratica termale riservano alle acque termali un ruolo di primo piano nel trattamento di alcune malattie del fegato e delle vie biliari, sia acute sia croniche.

Lo studio degli effetti terapeutici a livello epatico delle acque minerali è reso difficile dagli stretti rapporti anatomici, fisiologici e patologici che la ghiandola epatica ha sia con il tubo digerente sia con il metabolismo organico, con funzioni talora comuni e sinergiche e spesso inscindibili.

Tali rapporti rendono difficile non solo stabilire quale sia la sede specifica dell'azione tera-

peutica, ma anche l'interpretazione dei meccanismi attraverso i quali agiscono molte acque minerali.

I rapporti che il fegato ha con gli altri apparati devono essere sempre tenuti presenti dal medico termale per sapere quando, dove e come va prescritta una cura idrotermale.

In questi ultimi anni nella letteratura dell'idrologia medica si registra un notevole interesse alla legittimazione scientifica delle proprietà coleretiche, colagoghe e colecisticocinetiche di molte acque minerali, sia sulla base di elevate casistiche cliniche, sia attraverso la dimostrazione sperimentale.

L'impiego terapeutico della maggior parte delle acque che

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CAMERINO
Dipartimento di Scienze Farmacologiche
e Medicina Sperimentale
Direttore: Prof. M. Massi

sono ritenute capaci o che sono proclamate di agire sul fegato e sulle vie biliari, si appoggia, purtroppo, su nozioni empiriche e vaghe, e/o su risultati ottenuti con protocolli sperimentali non perfettamente definiti.

Tra le diverse acque termali è oramai acquisito che le acque bicarbonate hanno un effetto sia coleretico che colagogo, mentre quelle cloruro-sodiche e solfato-calciche presentano un'azione colagoga escrettrice, e quelle solfato calciche-magnesiache posseggono oltre all'azione colagoga anche quella colecistocinetica (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

SCOPO DELLO STUDIO

Scopo della ricerca è stato quello di studiare gli effetti di un trattamento idropinico con acqua termale sulfurea salso-solfato-bicarbonato calcica sulla funzionalità epatica dell'animale da esperimento, reso ipercolesterolemico attraverso un'alimentazione ricca di colesterolo. Tool farmacologico del nostro studio è l'acqua "San Giovanni", captata nel bacino imbrifero di Acquasanta Terme (AP).

Dal punto di vista chimico-fisico tale acqua è da considerarsi ipotermale (temperatura alla sorgente di 26,5 °C), con un pH = 6,43, un residuo fisso a 180°C di 5232 mg/l ed un grado solfidrimetrico di 24,8 mg / l.

La sua composizione ionica risulta essere: Cl⁻ = 1650 mg/l; Na⁺ = 793 mg/l; HCO₃⁻ = 714 mg / l; SO₄⁻ = 1287 mg/l; Ca⁺⁺ = 485 mg/l; S⁻ = 24,8 mg / l, da essere classificata, secondo Marotta e Sica (13) come acqua clorurato-sodica-bicarbonato-solfato calcica sulfurea, con

quantità ponderali di ferro e di oligoelementi quali F⁻, Sr⁺⁺, Li⁺, Br⁻, As⁺⁺.

I dati analitici evidenziano quindi una composizione tipica per le acque solfuree, costituite in prevalenza, oltre che da solfuri, anche da sali alcalino e alcalino terrosi e ricche di oligoelementi.

MATERIALI E METODI

Animali

Per tutti gli esperimenti sono stati utilizzati 100 ratti maschi, di ceppo CD, in perfette condizioni di salute ed esenti da parassiti, forniti dalla Charles River, Calco, LC.

Le condizioni di stabulazione erano quelle dettate dal D.L. n. 116 del 27 gennaio 1992 e che sono quelle abituali del nostro stabulario.

In particolare gli animali sono stati stabulati a temperatura (21 ± 1°C) ed umidità (50 ± 10 %) costanti, ciclo giorno-notte programmato (07-19 luce artificiale; 19 - 07 buio).

Quando esigenze sperimentali non richiedevano diversamente, i ratti in gruppi di cinque, erano tenuti in gabbie di Makrolon, delle dimensioni di 59 x 38 x 20 cm, con il fondo in rete metallica di acciaio inossidabile. Come richiesto dal protocollo sperimentale l'abbeveraggio avveniva o con acqua in esame o con acqua di fonte.

Composizione della dieta ipercolesterolemica purificata per ratti e topi DP1014 (ALTROMIN-RIEGER, Bz):

Drakettproteina 150 g/kg; Casei-

na 50 g / kg; Saccarosio 440 g/kg; Cellulosa 40 g/kg; Olio di cocco 200 g/kg; Miscela minerale 52 g/kg; oligoelementi 8 g /kg; miscela vitaminica 20 g/kg; Colesterolo 20 g/kg, Acido colico sale sodico 20 g/kg.

Composizione della dieta standard G.L.P. (MUCEDOLA, Mi):

Umidità 11,12%, Proteina greggia 16,74%; Grassi greggi 2,00%; Fibra grezza 7,17%, Ceneri gregge 6,33%.

Composizione dell'acqua di controllo

L'acqua usata come controllo è stata quella dell'acquedotto locale avente la seguente composizione: Residuo fisso 230 mg/l; Cl⁻ 5,9 mg/l; Na⁺ 58 mg / l; HCO₃⁻ 120 mg/l; SO₄⁻ 64,8 mg/l; Ca⁺⁺ 64,8 mg/l.

Composizione dell'acqua San Giovanni

La composizione chimica completa dell'acqua San Giovanni è riportata in *tabella 1*.

Trattamento degli animali

Settanta animali sono stati alimentati con una miscela di dieta ipercolesterolemica e dieta standard per animali da laboratorio, nel rapporto 9:1 per indurre in loro uno stato di ipercolesterolemia. Trenta ratti ricevevano, nelle stesse condizioni, dieta standard per animali da laboratorio e costituivano il gruppo di controllo.

L'assegnazione degli animali ai gruppi dei trattati o a quelli dei controlli è stata fatta mediante procedimento di randomizzazione.

Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi e trattati secondo

Gruppo	N. Animali	Alimentazione	Trattamento per 120 giorni
CC	30	Dieta standard G.L.P	Acqua comune
TC	35	Dieta ipercolesterolemica	Acqua comune
TT	35	Dieta ipercolesterolemica	Acqua sulfurea "San Giovanni"

il seguente schema:

Sulla base di questo schema dopo 120 giorni di trattamento si sono avuti a disposizione: un gruppo di 30 ratti di controllo (Gruppo CC), alimentati con dieta standard ed abbeverati con acqua comune e due gruppi di 35 animali ciascuno, resi ipercolesterolemici mediante la dieta (gruppi TT e TC).

I ratti ipercolesterolemici del gruppo TT sono stati trattati, per tutta la durata dell'esperimento, con acqua sulfurea "San Giovanni", mentre quelli del gruppo TC sono stati trattati sempre con acqua comune.

Durante tutto il periodo di trattamento, gli animali sono stati stabulati come di norma, e tenuti quotidianamente sotto osservazione al fine di verificarne le condizioni generali, l'atteggiamento comportamentale e l'eventuale incidenza di segni tossici o di effetti letali.

Gli animali sono stati pesati, dopo un digiuno di 16 ore, prima dell'esperimento e periodicamente per determinare la loro curva di accrescimento ponderale.

Preparazione degli animali per la determinazione dell'attività coleretica

Dopo 120 giorni di trattamen-

to 10 ratti di ogni gruppo, digiuni da 18 ore, sono stati anestetizzati con uretano etili-

co (1,25 mg/kg i.p.) e sottoposti a laparotomia per la cateterizzazione del coledoco con un catetere PE 10. La bile è stata raccolta in provettine di plastica ogni 30 minuti ed il volume accuratamente misurato con microsiringa con un'accuratezza di 0,01 ml. Ogni 30 minuti agli animali era somministrato i.p. un volume di soluzione fisiologica, pari al volume di bile secreta nei trenta minuti precedenti. La raccolta della

Tabella 1. COMPOSIZIONE CHIMICA DELL'ACQUA SAN GIOVANNI

Parametri	Unità di misura	Risultati
pH	unità pH	6,43
Temperatura alla sorgente	°C	25,5
Conducibilità alla sorgente	mS/cm	6870
Potenziale (REDOX) alla sorgente	mV	-240
Residuo fisso a 180°	mg/l	5232
Ossidabilità (O ₂)	"	12,7
Durezza	°F	208
Ione idocarbonico	mg/l	714
Ione cloruro	"	1650
Ione solfato	"	1287
Ione ammonio	"	2,76
Ione nitrico	"	10,7
Ione nitroso	"	< 0,03
Ione iodio	"	0,22
Ione fluoro	"	1,6
Grado solfidrometrico	"	24,8
Cianuri (ione cianuro)	"	< 0,001
Fenoli totali (C ₆ H ₅ OH)	"	< 0,005
Ione sodio	"	793
Ione potassio	"	50,9
Ione calcio	"	485
Ione magnesio	"	209
Ione ferro disciolto	"	0,038
Ione stronzio	"	13,1
Ione litio	"	0,537
Ione arsenico	"	0,002
Ione bario	"	0,034
Borati (H ₃ BO ₃)	"	34,1

bile è stata protratta per 180 minuti. Gli animali sono stati tenuti a temperatura costante per tutta la durata dell'esperimento. Per ciascun gruppo la bile raccolta durante le tre ore, da ogni animale, è stata riunita in un unico campione.

I campioni sono stati conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Prelevi di sangue

Sempre alla fine del trattamento dieci animali di ciascun gruppo anestetizzati con CO₂ sono stati sottoposti, attraverso puntura cardiaca a un prelievo di 5 ml di sangue. I campioni di siero sono stati conservati a -80 °C fino al momento dell'analisi.

Determinazione dei parametri biochimici

Tutti i parametri biochimici ematici, biliari sono stati determinati ricorrendo a metodi standard impiegati nell'analisi chimico-clinica.

I parametri determinati a livello ematico sono stati: Colesterolo; Bilirubina, totale, diretta ed indiretta; Fosfolipidi; Acidi biliari.

Nella bile sono stati determinati: Colesterolo; Fosfolipidi; Acidi biliari ed elettroliti.

ANALISI STATISTICA

Di ogni gruppo di dati sono state calcolate le medie, le deviazioni standard e i relativi errori standard.

La valutazione statistica è stata eseguita con il Newman-Keul-test. Due medie sono state considerate statisticamente diverse per $P < 0,05$.

RISULTATI

Osservazioni generali

Andamento ponderale

Nel *graf. n. 1* viene riportato l'incremento ponderale degli animali appartenenti ai tre gruppi sottoposti ai diversi trattamenti. Il peso iniziale di tutti i ratti era di 105 ± 5 gr. Gli animali di controllo del gruppo CC, nei 120 giorni di osservazione, hanno avuto un accrescimento corporeo regolare e costante nel tempo, arrivando alla fine tutti in buone condizioni ponderali e morfologiche.

L'accrescimento corporeo dei ratti dei gruppi TC e TT, alimentati con dieta ipercolesterolemica, è risultato essere inferiore ($p < 0,05$), rispetto a quello del gruppo CC. Questi animali inoltre durante il periodo di trattamento hanno presentato evidenti segni di sofferenza quali: arruffamento del pelo, disturbi della cenestesi, lacrimazione, diarrea, disturbi comportamentali, che si sono accentuati verso la fine dell'esperimento. La curva di accrescimento dei ratti del gruppo TT è sempre superiore a quella dei ratti del gruppo TC. Con il progredire del trattamento l'andamento delle due curve tende a differenziarsi sempre di più, tanto da diventare, dopo 80 giorni, statisticamente diversa ($p < 0,05$).

Parametri serici indicatori della funzionalità epatica e biliare

Nella *tabella n. 2* sono riportate le concentrazioni plasmatiche dei parametri determinati nei tre gruppi di ratti diversamente

trattati. I valori determinati nei ratti di controllo, gruppo CC, rientrano nei range dei valori standard propri del ratto.

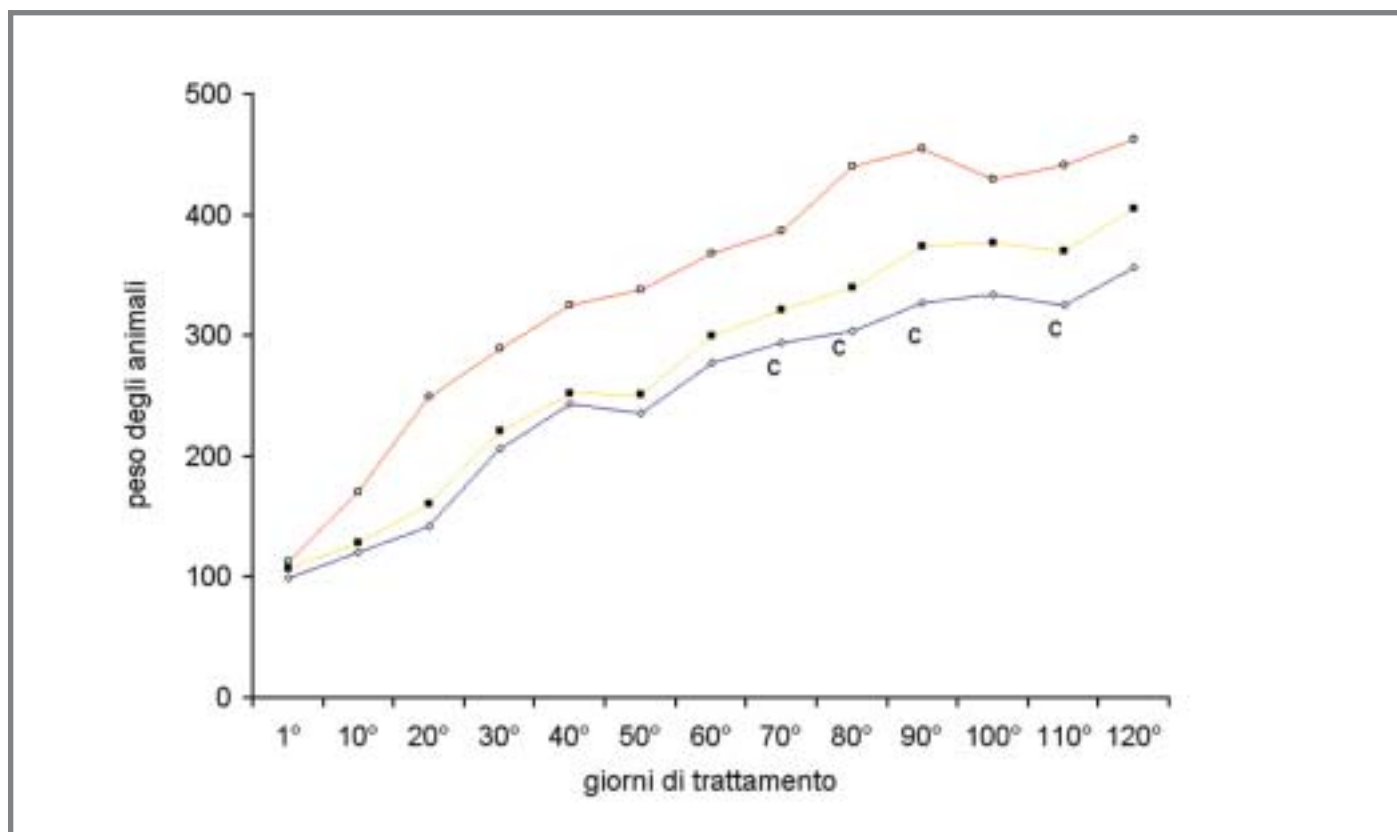
Al contrario tutti gli animali alimentati per quattro mesi con dieta ipercolesterolemica presentano, rispetto ai ratti di controllo, un quadro decisamente ipercolesterolemico. Infatti nei ratti del gruppo TC la colesterolemia è risultata essere 4,76 volte superiore ai valori standard, con $p < 0,001$ come livello di significatività statistica, mentre nei ratti del gruppo TT la concentrazione di colesterolo determinata è 2,95 volte superiore, con $p < 0,05$, sempre rispetto ai valori di controllo.

Anche i valori degli altri parametri plasmatici come, bilirubina totale e indiretta, fosfolipidi ed acidi biliari determinati negli animali alimentati con dieta ipercolesterolemica, con $p < 0,05$, sono risultati essere statisticamente superiori ai valori standard dei controlli.

Sempre dall'analisi dei risultati riportati in *tabella n. 2* si evidenziano differenze statisticamente significative anche tra i ratti del gruppo TT e quelli del gruppo TC, indotte dal trattamento con acqua sulfurea. Prima tra tutte è quella riscontrata nei livelli di colesterolo che sono risultati significativamente più bassi negli animali del primo gruppo rispetto a quelli del secondo ($p < 0,05$).

L'elaborazione statistica ha rilevato inoltre che nei ratti alimentati con dieta ricca di colesterolo, l'assunzione *ad libitum*, di acqua sulfurea induce anche un minore innalzamento dei valori plasmatici sia degli acidi

Figura 1. INCREMENTO PONDERALE DEI RATTI IPERCOLESTEROLEMICI E DI CONTROLLO



○ CC = ratti di controllo; ◇ TC = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua comune; ■ TT = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua sulfurea; c = p < 0,05 verso TT.

biliari (p<0,05) che dei livelli dei fosfolipidi (p<0,01).

ATTIVITÀ COLERETICA

L'andamento delle curve riportate in figura n. 2 evidenzia i µl di bile/100 gr/30 minuti eliminati, durante le tre ore di raccolta, dai gruppi di ratti diversamente trattati. I ratti ipercolesterolemici dei gruppi TC e TT, presentano curve di eliminazione statisticamente superiori (P <0,05) a quelle dei ratti del gruppo CC di controllo.

L'elaborazione statistica inoltre evidenzia che i quantitativi (µl/100 gr/30 minuti) di bile eliminati dopo 90 e 150 minuti dal

carico, dai ratti del gruppo TT sono statisticamente superiori a quelli raccolti dai ratti del gruppo TC (p < 0,05).

I ratti del gruppo TT, durante tutto il periodo di raccolta delle tre ore, hanno secreto complessivamente: 807,79 ± 35,1 µl di bile/100 g; quelli del gruppo TC 659,60 ± 23,4 µl di bile/100 g; mentre in quelli del gruppo CC la bile raccolta è stata di 470,86 ± 43,7 µl di bile/100 g. La quantità totale di bile raccolta dai ratti del gruppo TT è risultata essere statisticamente maggiore non solo di quella secreta dai ratti del gruppo CC (p <0,01), ma anche di quella

eliminata dagli animali del gruppo TC (p <0,05).

PARAMETRI BILIARI

Le concentrazioni dei metaboliti determinati nella bile raccolta dai ratti appartenenti ai tre gruppi diversamente trattati sono riportati in tabella 3.

La dieta ipercolesterolemica a livello biliare induce nei ratti non trattati, del gruppo TC, un aumento, del 40,6 % del colesterolo biliare, del 17% dei fosfolipidi e del 61,9% degli acidi biliari, rispetto ai controlli del gruppo CC.

Nei ratti ipercolesterolemici trattati per 120 giorni con l'acqua

Tabella 2. PARAMETRI PLASMATICI IN RATTI IPERCOLESTEROLEMICI ED IN RATTI DI CONTROLLO

Gruppo	N. ratti		Colesterolo tot. (mg/100ml)	Bilirubina tot. (mg/100ml)	Bilirubina diretta (mg/100ml)	Bilirubina indiretta (mg/100ml)	Fosfolipidi (mg/100ml)	Ac.biliari (umol/l)
CC	10	media	67,13	0,13	0,02	0,11	94,13	0,08
		es	3,84	0,01	0,01	0,01	4,37	0,02
		ds	12,16	0,02	0,02	0,02	13,82	0,05
TC	10	media	319,75 ^{bd}	0,19 ^b	0,04	0,15 ^b	163,87 ^{bc}	0,32 ^b
		es	28,40	0,01	0,01	0,01	10,10	0,05
		ds	89,98	0,04	0,02	0,03	31,87	0,19
TT	10	media	198,00 ^b	0,18 ^a	0,03	0,15 ^a	126,6 ^a	0,26 ^a
		es	18,80	0,01	0,01	0,00	7,94	0,02
		ds	59,75	0,03	0,02	0,01	25,11	0,05

Tabella 3. BILE E METABOLITI BILIARI IN RATTI IPERCOLESTEROLEMICI E IN RATTI DI CONTROLLO

Gruppo	N. ratti		Bile (ul/100 gr/ 3 h)	Colesterolo (mg/100ml)	Fosfolipidi (mg/100ml)	Ac.biliari (umol/l)
CC	10	media	470,9	15,80	536,70	23,68
		es	42,1	1,90	30,80	1,93
		ds	133,1	6,00	97,41	6,11
TC	10	media	659,6 ^b	22,22 ^a	627,89 ^{ac}	38,34 ^b
		es	23,3	0,81	19,20	2,40
		ds	73,9	2,59	60,73	7,60
TT	10	media	807,7 ^b	19,75	546,50	40,60 ^b
		es	55,1	0,65	7,20	1,60
		ds	174,4	2,06	22,71	5,08

CC = ratti di controllo; TC = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua comune; TT = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua solfurea
 a = p < 0,05 verso CC; b = p < 0,01 verso CC; c = p < 0,05 verso TT; d = p < 0,01 verso TT

“San Giovanni” del gruppo TT le concentrazioni del colesterolo e dei fosfolipidi biliari risultano essere più basse rispettivamente del 11,1% e del 12,9% di quelle riscontrate nei ratti sempre ipercolesterolemici, ma trattati con acqua comune del gruppo TC. Il trattamento, in questi animali riduce il livello di colesterolo biliare e annulla l'aumento dei

fosfolipidi biliari indotto dalla dieta ipercolesterolemica. Il trattamento invece ha effetti opposti sui livelli degli acidi biliari secreti nella bile dagli epatociti dei ratti ipercolesterolemici. Negli animali del gruppo TT si registrano infatti concentrazioni di acidi biliari superiori non solo a quelli dei ratti di controllo (p<0,01), ma anche

rispetto ai ratti ipercolesterolemici trattati con acqua comune del gruppo TC.

ELETTROLITI BILIARI

La bile dei ratti ipercolesterolemici dei gruppi TT e TC (tab. 4) presenta concentrazioni di ioni Na⁺ e K⁺, Mg⁺⁺ significativamente più basse rispetto a quella dei ratti di controllo (p < 0,01), men-

tre le concentrazioni di Ca^{++} sono più elevate ($p < 0,05$). L'unico parametro che viene alterato in modo statisticamente significativo dal trattamento con acqua sulfurea, è la concentrazione dei bicarbonati biliari che nei ratti ipercolesterolemici trattati con acqua sulfurea risulta essere statisticamente più elevata di quella registrata nei ratti sempre ipercolesterolemici ma trattati con acqua comune ($p < 0,05$).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Numerose evidenze cliniche e termali hanno oramai stabilito una relazione diretta tra acque

minerali e funzionalità epato-biliare.

La legittimazione delle azioni farmacodinamiche delle acque minerali purtroppo non è sempre supportata da un numero consistente di studi sperimentali, anche se in questi ultimi anni si assiste ad un aumento progressivo dei riferimenti bibliografici a tale riguardo.

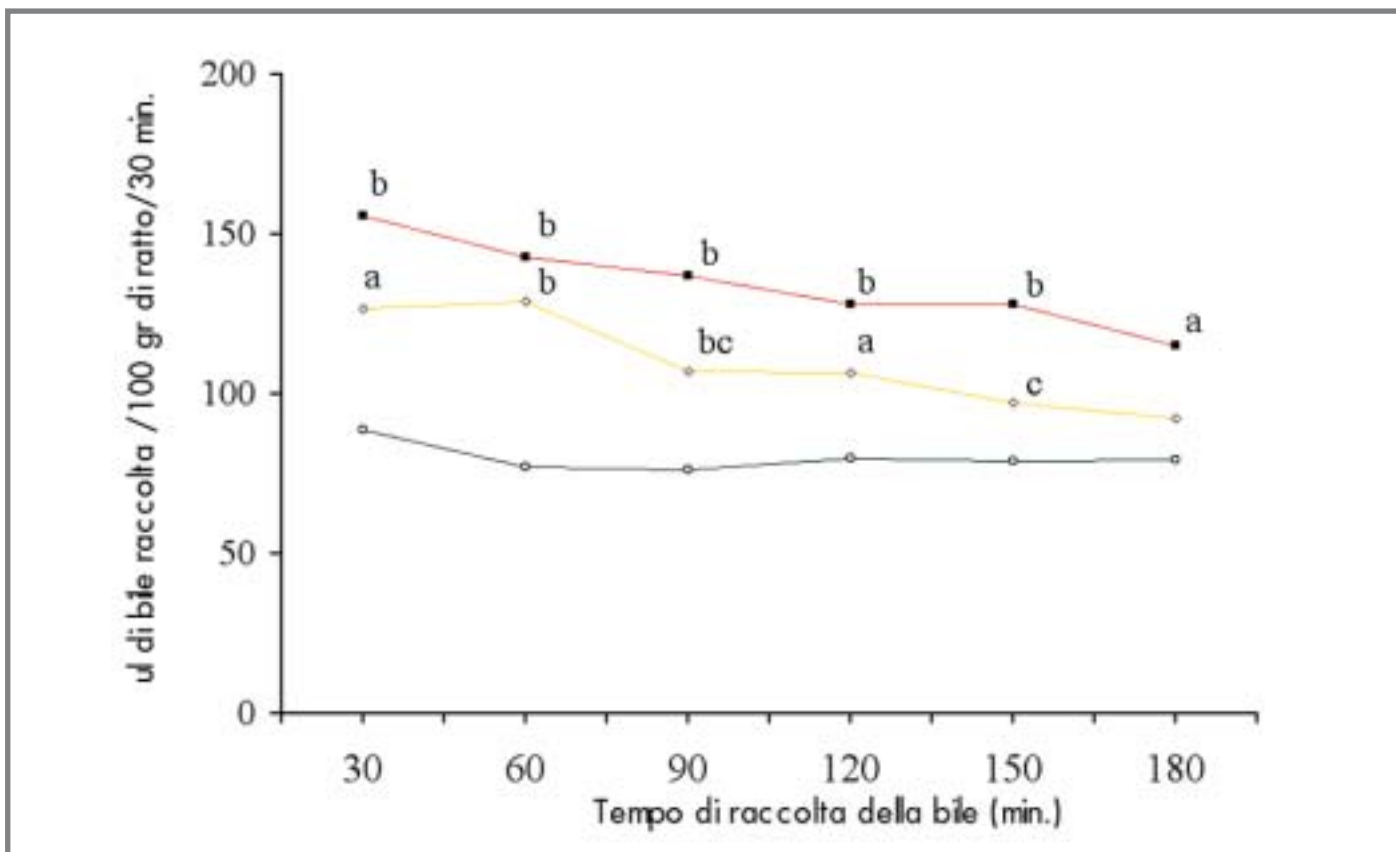
A livello epatico, lo studio caratterizzante il meccanismo d'azione di un'acqua minerale, così come quella di un farmaco, è molto complesso per i rapporti anatomo-fisiologici e biochimici che il fegato ha, non solo con l'apparato gastrointe-

stinale, ma anche con tutto l'organismo nel suo insieme.

Comunque molte sono le acque termali che trovano valida applicazione terapeutica nel trattamento di diverse malattie acute e croniche del fegato (1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12).

Tra le diverse patologie che interessano direttamente o indirettamente la funzionalità epatica, l'ipercolesterolemia, è argomento di notevole interesse dal punto di vista non solo medico ma anche sociale perché è causa, non solo di morbilità ma anche di mortalità molto elevate nei paesi industrializzati, per la stretta corre-

Figura 2. ATTIVITÀ COLERETICA DI RATTI IPERCOLESTEROLEMICI E DI CONTROLLO



CC = ratti di controllo; ◇ TC = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua comune; ■ TT = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua sulfurea; a = $p < 0,05$ verso CC; b = $p < 0,01$ verso CC; c = $p < 0,05$ verso TT.

Tabella 4. ELETTROLITI BILIARI DETERMINATI IN RATTI IPERCOLESTEROLEMICI E IN RATTI DI CONTROLLO

Gruppo	N. ratti		K ⁺ (mEq/l)	Na ⁺ (mEq/l)	Cl ⁻ (mEq/l)	Ca ⁺⁺ (mEq/l)	Mg ⁺⁺ (mEq/l)	Fosfati (mg/100ml)	HCO ₃ ⁻ (mEq/l)
CC	10	media	5,62	173,30	91,30	3,85	2,08	0,84	18,67
		es	0,14	2,97	2,75	0,34	0,10	0,04	1,08
		ds	0,45	9,38	8,71	1,07	0,33	0,13	3,40
TC	10	media	4,62 ^b	161,89 ^b	100,00	5,54 ^b	1,51 ^b	1,00	19,28 ^c
		es	0,11	1,29	1,35	0,23	0,05	0,08	0,73
		ds	0,32	4,11	4,27	0,68	0,15	0,24	2,31
TT	10	media	4,82 ^b	163,75 ^a	98,25	5,87 ^b	1,52 ^b	0,89	23,15 ^a
		es	0,08	1,60	0,49	0,22	0,07	0,06	0,54
		ds	0,26	5,06	1,50	0,69	0,24	0,19	1,73

CC = ratti di controllo; TC = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua comune; TT = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua solfurea
a = p < 0,05 verso CC; b = p < 0,01 verso CC; c = p < 0,05 verso TT

lazione che ha con l'arteriosclerosi e l'infarto miocardico.

Il fegato in tale patologia svolge un ruolo fondamentale sia nel metabolismo dei lipidi esogeni assunti con la dieta, che nella sintesi di quelli endogeni. Tale organo dosa la concentrazione ematica del colesterolo esterificato attraverso il metabolismo delle lipoproteine. Infatti, l'esterificazione del colesterolo avviene in circolo grazie ad un enzima prodotto dal fegato, la lecitina-colesterolo-acil-transferasi (LCAT), che catalizza il trasferimento di un acido grasso dalla lecitina al gruppo ossidrilico del colesterolo. Buona parte del colesterolo viene trasformata nella ghiandola epatica in acidi biliari, mentre la restante parte viene escreta con le feci come tale o come coprostanolo.

Per abbassare i livelli del colesterolo oltre la dieta, la terapia farmacologica e la correzione

degli altri fattori di rischio cardiovascolare, l'approccio crenoterapico, con acque ricche di sali, è stato oggetto di numerosi studi (14,15,16,17,18).

Nel nostro modello sperimentale l'alimentazione, *ad libitum*, per 120 giorni, con dieta non bilanciata, contenente il 2% di colesterolo, provoca nel ratto un minore accrescimento corporeo e alterazioni morfologiche e comportamentali correlate alla durata del trattamento. L'alimentazione con tale dieta induce un aumento significativo delle concentrazioni del colesterolo, dei fosfolipidi e degli acidi biliari, sia plasmatici che biliari. L'aumento dei livelli plasmatici, è la conseguenza del tipo di alimentazione, mentre l'innalzamento dei tassi biliari è dovuto alla maggiore attività metabolica indotta dagli elevati quantitativi di colesterolo presenti in circolo. La maggiore coleresi

registrata in questi ratti è attribuibile agli acidi neutri e agli acidi grassi presenti nella dieta, che agendo sulla mucosa intestinale stimolano da un lato riflessi nervosi e dall'altro la formazione, a livello intestinale, di sostanze ormonali secretin-simili e colecistochinino-simili, che una volta riassorbite raggiungono il fegato dove stimolano i processi metabolici coinvolti nella secrezione biliare (19).

La più alta concentrazione dei bicarbonati biliari nei ratti ipercolesterolemici del gruppo TT può essere alla base della maggiore attività coleretica evidenziata negli stessi animali. A livello biliare è stato riscontrato che i bicarbonati, aumentando l'osmolarità del fluido canalicolare, giocano un ruolo importante nella formazione del flusso biliare (20,21,22,23).

Il trattamento, con acqua solfurea "San Giovanni", nei ratti ali-

mentati con dieta ipercolesterolemica (gruppo TT) induce un minore innalzamento dei livelli plasmatici non solo del colesterolo ma anche dei fosfolipidi e degli acidi biliari. Tali risultati vanno interpretati sulla base degli effetti registrati a livello biliare.

Come già ricordato in questi animali, del gruppo TT, infatti è stata evidenziata una coleresi superiore non solo ai ratti di controllo (gruppo CC), ma anche rispetto agli stessi ratti ipercolesterolemici che ricevevano, nello stesso periodo e nelle identiche condizioni sperimentali, acqua comune (gruppo TC).

L'analisi dei dati ottenuti nella determinazione dei parametri biliari rileva che i ratti del gruppo TT presentano concentrazioni di colesterolo e di fosfolipidi biliari più basse di

quelle registrate nei ratti del gruppo TC, con valori che si avvicinano a quelli dei ratti del gruppo di controllo CC. Il trattamento con acqua sulfurea quindi apparentemente riporta verso i valori normali le concentrazioni dei due componenti biliari alterate dal tipo di dieta. È da tener presente però che le determinazioni di tali metaboliti sono state effettuate sulla bile raccolta complessivamente nelle tre ore e, come sopra riportato, i ratti del gruppo TT hanno secreto il 22,4% di bile in più rispetto a quelli del gruppo TC. Di conseguenza le minori concentrazioni di colesterolo e di fosfolipidi biliari riscontrate nel primo gruppo potrebbero essere un effetto dovuto al maggior volume di bile prodotta e quindi ad un problema di diluizione e non ad un minore versamento di

metaboliti nella bile.

Le quantità totali di colesterolo e di fosfolipidi, complessivamente secrete con la bile dai ratti dei due gruppi riportate nella *tabella n. 5*, calcolate sulla base del prodotto tra il volume cumulativo di bile raccolta nelle tre ore e le concentrazioni determinate, indicano infatti che il trattamento con acqua sulfurea essenzialmente induce un effetto coleretico "non completo ma parziale acquoso" (19), verso questi due metaboliti.

Diverso è il discorso per quando riguarda la più alta concentrazione di acidi biliari presente nella bile raccolta nelle tre ore dai ratti del gruppo TT, per questi metaboliti il trattamento con acqua sulfurea stimola la loro secrezione nella bile.

È stato riscontrato che la velocità di metabolizzazione del colesterolo in acidi biliari è for-

Tabella 5. BILE E METABOLITI BILIARI ELIMINATI COMPLESSIVAMENTE DA RATTI IPERCOLESTEROLEMICI E DA RATTI DI CONTROLLO

Gruppo	N. ratti		Bile ($\mu\text{l}/100 \text{ gr}/3 \text{ h}$)	Colesterolo ($\mu\text{g}/100 \text{ gr}/3\text{h}$)	Fosfolipidi ($\text{mg}/100 \text{ gr}/3\text{h}$)	Ac.biliari ($\text{umol}/100 \text{ gr}/3\text{h}$)
CC	10	media	470,8	74,4	2,19	11,10
		es	43,7	11,7	0,22	1,40
		ds	138,0	37,0	0,71	4,30
TC	10	media	659,6 ^{ac}	146,6 ^a	4,14 ^a	25,5 ^{ac}
		es	23,4	6,4	0,21	1,30
		ds	74,0	20,1	0,69	4,36
TT	10	media	807,8 ^b	159,5 ^a	4,41 ^a	32,8 ^a
		es	35,1	7,4	0,25	1,10
		ds	111,0	23,3	0,80	3,60

CC = ratti di controllo; TC = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua comune; TT = ratti ipercolesterolemici trattati con acqua sulfurea
a = $p < 0,05$ verso CC; b = $p < 0,01$ verso CC; c = $p < 0,05$ verso TT

temente aumentata nei soggetti sottoposti a dieta ipercolesterolemica (24). In culture di epatociti di ratti sottoposti a regime arricchito in colesterolo o quando le stesse cellule sono incubate con lipoproteine, la produzione di acidi biliari, è parallela alle variazioni della sintesi del colesterolo (25).

In questi modelli vi sarebbe un aumento della velocità di trasformazione del colesterolo in acidi biliari che richiederebbe un maggior apporto di colesterolo libero al fegato (26,27).

La più bassa colesterolemia riscontrata nei ratti del gruppo TT può essere spiegata attraverso questo meccanismo indotto dal trattamento con acqua sulfurea.

Toussaint e collaboratori (16,17) hanno dimostrato chiari ed inequivocabili effetti delle acque termali solfato calciche magnesiche sul metabolismo delle lipoproteine nel ratto ipercolesterolemico.

Una riduzione delle LDL plasmatiche attraverso un aumento dell'eliminazione di acidi biliari è stata evidenziata anche per acque ricche di sali (19). Gli acidi biliari sono quindi sintetizzati dagli epatociti a partire dal colesterolo. La loro funzione, come è noto, è quella di solubilizzare il colesterolo e gli altri lipidi nella bile e nel lume intestinale. Nell'intestino i sali biliari

sono necessari per emulsionare i grassi alimentari e consentirne l'assorbimento. Solitamente gli acidi biliari vengono riassorbiti nel circolo enteroepatico fino al 97%, per essere riciclati e solamente una piccola percentuale viene escreta con le feci.

Un'insufficiente quantità di sali biliari causa la precipitazione del colesterolo nella bile e la conseguente formazione di calcoli a livello biliare.

I calcoli biliari per circa l'80% di solito sono misti, cioè formati da colesterolo, da sali biliari, pigmenti biliari, e sali di calcio ecc.

Una delle cause che portano alla precipitazione di uno o più costituenti biliari, può essere rappresentata da un'alimentazione inadeguata, oltre che da uno stato infiammatorio o infettivo delle vie biliari, da un'alterazione metabolica della stessa bile, per dismetabolismi ormonali, per diatesi ereditarie e per stati patologici dell'epatocita.

Nella bile i sali biliari sono gli elementi stabilizzanti. La bile è una soluzione micellare di colesterolo, lecitina e sali biliari, la quale, o per un eccesso di colesterolo o per difetto di sali biliari, nella genesi del calcolo, si trasforma da un sistema monobasico (quello liquido micellare) in un sistema difasico (con una parte solida o calcolo e una liquida o bile residua) e della lecitina.

L'origine di un calcolo può essere quindi sintetizzata in tre tappe:

- 1) formazione di bile anormale da parte del fegato o delle vie biliari o di entrambi, con forte aumento del numero di micelle e saturazione del fluido biliare con germi di cristalli di colesterolo;
- 2) precipitazione di microcristalli di colesterolo;
- 3) agglomerazione di questi, fino alla formazione del calcolo macroscopico. L'aumentata produzione di acidi biliari da noi riscontrata nella bile di ratti ipercolesterolemici sottoposti a trattamento con acqua sulfurea "San Giovanni", insieme alla maggiore quantità di bile escreta, costituiscono un ottimo presupposto nella prevenzione e nella cura della calcolosi biliare sia intraepatica che colecistica.

In conclusione, l'acqua "San Giovanni" stimolando la produzione di bile più diluita e quindi meno concentrata e ricca di sostanze solubilizzanti il colesterolo, come gli acidi biliari, può favorire il mantenimento del sistema monobasico biliare e ostacolare la precipitazione dei componenti biliari e impedire in tal modo l'organicizzazione del precipitato che rappresenta il primo stadio che porta allo sviluppo dei calcoli biliari.

BIBLIOGRAFIA

1. Cadeo F.: Le fonti di Boario e loro cure. R. Uff. 2° Viaggio Istruzione Medici (VIM), Boario terme, 1923.
2. Sabatini G., Messini M., Meccoli V.: "Trattato di Idroclimatologia Clinica". Malattie del fegato e delle vie biliari. pagg. 1541 -1591. Cappelli Editore - Bologna, 1951.
3. Abbona C., Gatto P., Bezzante G., Bestagno M., Romano P.: La crenoterapia solfato-calcica nelle discinesie delle vie biliari. Conv. Com. Idrol. Lomb. "Crenoterapia solfato-calcica". Boario Terme, 1964.
4. Labò G.: Gli ormoni gastrointestinali in patologia digestiva. Clin. Term. 70: 27-28, 1974.
5. Everson G.T., Braverman D.Z., Johnson M.L., Lem F.Jr.: A critical evaluation of real-time ultrasonography for the study of gallbladder volume and contraction. Gastroenterology 79:40-46, 1980.
6. Inque K., Wiener I.G., Fajan J.G., Watson L.C., Thompson J.C.: Correlation between gallbladder size and release of CCK after oral magnesium sulfate in man. Annals of Surgery 197: 412-417, 1983.
7. Messina B., Grossi F.: "Elementi di Idrologia Medica". Società Ed. Universo - Roma, 1984.
8. Messina B., Grassi M.: La ricerca idrologica in gastroenterologia. Clin. Term. 38: 63 - 72, 1985.
9. Maltiti G., Polloni A., Marchi S., Costa F., Bellini M., Guglielmini R.: Influenza degli ioni sull'assetto enterormonale. Clin. Term. 41: 129 -132, 1988.
10. Foschi M., Arena U.: Effetti sullo svuotamento colecistico e sulla massa epatica funzionante dell'assunzione di acqua termale Tettuccio di Montecatini. Clin. Term. 135: 115-120, 1990.
11. Nappi G.: Medicina Clinica e Termale. 2a ed., Selecta Medica, Pavia, 2001.
12. Coiro V., Volpi R., Vescovi P.P.: Choloretic and cholagogic effect of sulphuric sulfate water from the springs of Tabiano in cholestasis in alcohol related liver diseases. Clin. Term. Jan-Feb., 148: 15-22, 1997.
13. Marotta D., Sica C.: "Annali di chimica applicata" 23: 245, 1933.
14. Messini M., Guadagnino G.: "Trattato di Idroclimatologia Clinica", Acque sulfuree. Messini M. Cappelli Editore, pagg. 1025-1065, 1951.
15. Toussaint C., Nguyen B.A., Cang R., Jensen R., Canellas J.: Influence d'une eau thermale sulfatée calcique magnésienne sur le métabolisme des lipoprotéins chez le rat. Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie 94 : 65-76, 1986.
16. Toussaint C., Peuchant E., Courtes C., Jensen R., and Canellas J.: Effect of water containing calcium and magnesium sulfates on the elimination of cholesterol in the rat. Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie 96 : 89-100, 1988.
17. Graci C.: Effetti terapeutici sul colesterolo totale e LDL dell'acqua solfato-calcica "Mathelda". Med. Clin. Term. 13: 47, 1990.
18. Capurso A., Solfrizzi V., Panza F., Mastroianni F., Torres F., Del Parigi A., Colacicco A.M., Capurso C., Nicoletti G., Veneziani B., Cellamare S., Scalabrino A.: Increased bile acid excretion and reduction of serum cholesterol after crenotherapy with salt-rich mineral water. Aging Clin. Exp. Res. 11: 273-276, 1999.
19. Marmo E.: Farmacologia generale e speciale. Farmacologia dell'apparato digerente. UTET, (TO., pag. 969, 1991.
20. Dumont M., Erlinger S., Uchman S.: Hypercholerisis induced by ursodeoxycholic acid and 7- ketolithocholic acid in the rat: possible role of bicarbonate transport. Gastroenterology 79: 82-89, 1980.

21. Corbic M., Munoz C., Dumont M., de Couet G., Erlinger S.: Effect of systemic pH, pCO₂ and bicarbonate concentration on biliary bicarbonate secretion in the rat. *Hepatology* 5: 594-599, 1985.
22. Garcia-Marin J.J., Dumont M., Corbic M., de Couet G., Erlinger S.: Effect of acid-base balance and acetazolamide on ursodeoxycholate-induced biliary bicarbonate secretion. *Am. J. Physiol.* 248: 20-7, 1985.
23. Yoon Y.B., Hagey L.R., Hofmann A.F., Gurantz D., Michelotti E.L., Steinbach J.:H. Effect of side-chain shortening on the physiologic properties of bile acids : hepatic transport and effect on biliary secretion of 23-nor-ursodeoxycholate in rodents. *Gastroenterology* 90: 837-852, 1986.
24. Mahley R., W., Innerarity T. L.: Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim. Biophys. Acta* 737: 197-222, 1983.
25. Davis R.A., Hyde P.M., Kuan J.C.W., Malone-McNeal M., Archambault Schexnayder G.: Bile acid secretion by cultured rat hepatocytes. Regulation by cholesterol availability. *J. Biol. Chem.* 258: 3661-3667, 1983.
26. Schwartz C.C., Halloran L.C. Vlahcevic Z. R., Gregory D.H.: Preferential utilization of free cholesterol from high-density lipoproteins for biliary cholesterol secretion in man. *Science (Washington)*, 200: 62-64, 1978.
27. Rotheblat G. H., Arboggajt L. Y., Ray E. K.: Stimulation of esterified cholesterol accumulation in tissue culture cells exposed to high density lipoproteins enriched in free cholesterol. *J. Lipid. Res.*19: 350-358, 1978.