

УДК 616.33+342.092

ДИСБИОТИЧЕСКИЕ ОСЛОЖНЕНИЯ В ЖЕЛУДКЕ КРЫС ПРИ АНТИХЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ТЕРАПИИ И ИХ ПРОФИЛАКТИКА КВЕРЦЕТИН-СОДЕРЖАЩИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Гоженко А.И.¹, Шухтина И.Н.¹, Петренко А.А.²

¹Украинский НИИ медицины транспорта МЗУ, г. Одесса

²Комунальное учреждение «Одесская областная клиническая больница»; flavan@mail.ru

У крыс, которые получали антихеликобактерную терапию (АХБТ) в течение 8 дней, в желудке развивался дисбактериоз и гастрит, которые можно было предотвратить кверцетинсодержащими препаратами «Квертулин» и «Квертулидон».

Ключевые слова: антихеликобактерная терапия, желудок, дисбиоз, воспаление, кверцетин.

Введение

В комплекс средств, используемых для антихеликобактерной терапии (АХБТ), входят антибиотики и ингибиторы протонной помпы [1].

Побочным действием этих веществ является возможное развитие дисбиоза, поскольку антибиотики часто используются для моделирования кишечного дисбиоза [2, 3]. Поскольку при дисбиозе мы имеем не только изменение видового состава микробов (резкое снижение числа пробиотических видов), но и вполне ощутимую интоксикацию (главным образом за счет липополисахарида) [4], профилактика этого патологического состояния предусматривает использование антидисбиотических препаратов, направленное на восстановление численности пробиотических видов и снижение степени микробной интоксикации [5].

Целью настоящего исследования стало определение вероятного продисбиотического действия АХБТ и возможных дисбиотических нарушений в слизистой желудка, а также изучение возможности их профилактики с помощью кверцетинсодержащих антидисбиотических препаратов. Мы остановили свое внимание на двух комплексных препаратах – квертулине (кверцетин + инулин + цитрат кальция) и квертулидоне

(квертулин + имудон). Первый из них содержит биофлаваноид квертулин и пребиотик инулин, а второй дополнительно содержит иммуностимулятор имудон.

Материалы и методы исследования

Исследования были проведены на 40 белых крысах линии Вистар (самки 10 месяцев, средняя живая масса 300 г), распределенных в 4 равные группы: 1-ая – контроль, 2-ая, 3-я и 4-ая группы получали ежедневно per os в течение 8 дней АХБТ (смесь омепразола, амоксила и кларитромицина) в дозе омепразол 1,33 мг/кг, амоксил 50 мг/кг и кларитромицин 7,5 мг/кг. 3-я группа дополнительно получала оральные аппликации геля «Квертулин» в дозе 0,5 мл на крысу в течение 18 дней, начиная с первого дня опыта, а 4-ая группа получала оральные аппликации геля «Квертулидон» в такой же дозировке. Гель «Квертулин» производства НПА «Одесская биотехнология», ТУ 20.4-13903778-032:2012. Гель «Квертулидон» производства ООО «Биохимтех», ТУ У 20.4-13903778-032:2012.

Эвтаназию животных осуществляли на 12-й день под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца. В крови определяли содержание лейкоцитов и лейкоцитарную формулу [6], в гомоге-

нате слизистой желудка – активность уреазы (маркер микробного обсеменения) [7], лизоцима (показатель неспецифического иммунитета) [7], уровень маркеров воспаления [8]: содержание малонового диальдегида (МДА) и активность эластазы. Кроме того, определяли активность антиоксидантного фермента каталазы [8] и по соотношению активности каталазы и содержания МДА рассчитывали антиоксидантно-прооксидантный индекс АПИ [8].

Определяли также активность пепсина по расщеплению гемоглобина при pH 1,5 и изменению содержания тирозинсодержащих продуктов [9].

Степень дисбиоза по Левицкому [10] в слизистой желудка рассчитывали по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима.

В каждой группе результатов опы-

тов рассчитывали среднюю величину и ошибку средней величины. Различия между группами рассчитывали по t-критерию Стьюдента и считали достоверными значения p менее 0,05 [11].

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены результаты определения содержания лейкоцитов и лейкоцитарной формулы в крови крыс, получавших АХБТ и оральный гель с квертулином. Из этих данных видно, что АХБТ вызывает значительные изменения в лейкоцитарной формуле: в 2 раза увеличивается доля нейтрофилов и в 1,5 раза увеличивается доля лимфоцитов, что увеличивает лимфоцитарный индекс (соотношение лимфоциты/нейтрофилы) в 3 раза. Наблюдается снижение доли моноцитов (на 30 %).

Оральные аппликации геля «Квертулин» достоверно увеличивают содержание лейкоцитов, в 1,5 раза увеличивает долю нейтрофилов и в 2 раза снижают лимфоцитарный индекс. Еще больше снижается доля моноцитов (по сравнению с нормой более чем в 2 раза) и достоверно снижается доля эозинофилов.

В отличие от квертулина, квертулидон не повышает существенно содержание лейкоцитов, несколько снижает долю нейтрофилов и повышает лимфоцитарный индекс, достоверно повышает долю моноцитов и проявляет явную тенденцию к нормализации доли эозинофилов.

Таблица 1

Влияние кверцетин-содержащих гелей на содержание лейкоцитов и лейкоцитарную формулу крови крыс, получавших АХБТ ($M \pm m$, все $n = 10$)

Группы	Лейкоциты, г/л	Нейтрофилы, %	Лимфоциты, %	Л/Н	Моноциты, %	Эозинофилы, %
Контроль	13,3 ± 0,3	42,4 ± 1,0	45,2 ± 1,6	1,07 ± 0,05	8,8 ± 0,5	3,2 ± 0,3
АХБТ	14,0 ± 0,3 $p > 0,05$	21,0 ± 0,9 $p < 0,001$	66,0 ± 2,8 $p < 0,01$	3,14 ± 0,09 $p < 0,01$	6,2 ± 0,9 $p < 0,05$	2,6 ± 0,6 $p > 0,3$
АХБТ+ Кверцетин	17,3 ± 0,3 $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$	36,4 ± 2,0 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$	57,4 ± 5,7 $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$	1,57 ± 0,08 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$	4,2 ± 0,6 $p < 0,01$ $p_1 > 0,05$	2,0 ± 0,5 $p < 0,05$ $p_1 > 0,1$
АХБТ+ Квертулидон	14,9 ± 0,8 $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$ $p_2 < 0,05$	31,2 ± 2,0 $p < 0,01$ $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$	58,6 ± 1,3 $p < 0,01$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,5$	1,88 ± 0,07 $p < 0,05$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$	7,4 ± 1,0 $p > 0,05$ $p_1 > 0,3$ $p_2 < 0,05$	2,8 ± 0,3 $p > 0,3$ $p_1 > 0,5$ $p_2 > 0,05$

Примечания: p – в сравнении с гр. 1; p_1 – в сравнении с гр. 2; p_2 – в сравнении с гр. 3.

Таблица 2

Влияние кверцетин-содержащих гелей на активность уреазы, лизоцима и степень дисбиоза по Левицкому в слизистой желудка крыс, получавших АХБТ ($M \pm m$, все $n = 10$)

Группы	Уреазы, мк-кат/кг	Лизоцим, ед/кг	Степень дисбиоза
Контроль	0,10 ± 0,01	39 ± 7	1,00 ± 0,15
АХБТ	0,25 ± 0,02 $p < 0,001$	19 ± 2 $p < 0,01$	5,10 ± 0,78 $p < 0,01$
АХБТ+ квертулин	0,13 ± 0,01 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$	22 ± 4 $p < 0,05$ $p_1 > 0,3$	2,32 ± 0,33 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$
АХБТ+ квертулидон	0,15 ± 0,02 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,3$	30 ± 5 $p > 0,1$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$	1,35 ± 0,20 $p > 0,05$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$

Примечания: см. табл. 1.

В таблице 2 показаны изменения в слизистой желудка активности уреазы и лизоцима, а также рассчитанная по этим показателям степень дисбиоза. Как видно, АХБТ достоверно (в 2,5 раза) увеличивает активность уреазы, что свидетельствует о росте микробной обсемененности.

Обращаем внимание на то обстоятельство, что продуцентом уреазы является не только *H. pylori*, но и иные грамм-отрицательные и условно-патогенные микробы. Поэтому судить о наличии *H. pylori* по уровню уреазы не совсем корректно.

Аппликации обоих гелей достоверно снижают активность уреазы в слизистой желудка, причем существенной разницы между двумя препаратами нет.

В отличие от уреазы, активность лизоцима в слизистой желудка крыс, получавших АХБТ, снижается в 2 раза, что свидетельствует о существенном снижении неспецифического иммунитета. Аппликации геля «Квертулин» не оказывают существенного влияния на активность лизоцима, тогда как аппликации «Квертулидона» достоверно (вплоть до нормы) увеличивают активность лизоцима, что свидетельствует об иммуностимулирующем действии этого препарата (по-видимому, за счет имунодона).

Рассчитанная по относительным активностям уреазы и лизоцима степень дисбиоза по Левицкому у крыс, получавших АХБТ, возрастает более чем в 5 раз. Аппликации геля «Квертулин» снижают ее более чем в 2 раза, однако не возвращают к норме, тогда как аппликации геля «Квертлидон» снижают степень дисбиоза в 3,8 раза, практически возвращая ее к норме. Это свидетельствует о более сильном антидисбиотическом действии геля «Квертулидон».

В таблице 3 представлены результаты определения в слизистой желудка уровня маркеров воспаления: МДА

и эластазы. Видно, что оба показателя возрастают (правда, достоверно лишь активность эластазы). Повышение уровня маркеров воспаления свидетельствует о развитии воспаления в слизистой желудка (гастрит?) под влиянием АХБТ. Аппликации гелей снижают оба показателя воспаления (правда, достоверно лишь эластазу), и существенных различий в действии двух гелей не обнаружено.

В таблице 4 показано изменение в слизистой желудка активности каталазы и индекса АПИ. Видно, что АХБТ достоверно снижает и активность каталазы и индекс АПИ, что свидетельствует о нарушении баланса антиоксидантных и прооксидантных систем в пользу вторых.

Аппликации гелей повышают оба показателя (однако, достоверно, лишь квертулин), при этом оба показателя после воздействия препаратов достоверно не отличаются от нормы. Важно отметить, что и действие обоих препаратов существенно не отличается друг от друга.

В таблице 5 представлены результаты определения в слизистой желудка активности пепсина. Из этих данных видно, что АХБТ существенно (в 1,7 раза) увеличивает активность пепсина. Оба геля снижают активность пепсина, однако не возвращают ее к норме. И опять, оба препарата мало отличаются друг от друга по своей способности снижать активность пепсина.

Таким образом, проведенные исследования показали, что АХБТ существенно изменяет направленность иммунитета, увеличивая лейкоцитарный (специфический) и снижая нейтрофильный (неспецифический). Следствием этого являются развитие дисбиоза, на фоне которого происходят воспалительно-дистрофические процессы (развитие гастрита?) и снижается уровень защитных систем (неспецифического иммунитета и антиоксидантной системы).

Оральные аппликации гелей, содержащих антидисбиотические средства (кверцетин, инулин), существенно улучшают состояние слизистой желудка (уменьшают степень дисбиоза, уровень маркеров воспаления и увеличивают уровень защитных систем — неспецифического иммунитета и антиоксидантной системы). Отличие препаратов состоит в том, что квертулидон (за счет имудона) в большей степени стимулирует неспецифический иммунитет и показывает более высокую антидисбиотическую активность.

Что касается обнаруженного нами существенно увеличения в слизистой желудка активности пепсина, то это можно рассматривать не столько как положительный, сколько негативный фактор, свидетельствующий об усилении протеолитического и, следовательно, ulcerогенного действия.

На основании полученных нами данных необходимо считать целесообразным применение антидисбиотической профилактики при проведении АХБТ.

Выводы

1. АХБТ вызывает снижение уровня неспецифического иммунитета и антиоксидантной защиты, что приво-

дит к развитию в слизистой желудка дисбиоза.

2. На этом дисбиотическом фоне развивается воспаление в слизистой желудка.
3. Оральные аппликации антидисбиотических гелей, содержащих кверцетин («Квертулин» и «Квертулидон»), усиливают неспецифический иммунитет, повышают уровень антиоксидантной защиты и тем самым снижают степень дисбиоза и воспаления.
4. «Квертулидон», отличающийся от «Квертулина» тем, что содержит

Таблица 3
Влияние кверцетин-содержащих гелей на уровень биохимических маркеров воспаления в слизистой желудка крыс, получавших АХБТ ($M \pm m$, все $n = 10$)

№ п/п	Группы	МДА, ммоль/кг	Эластаза, мк-кат/кг
1	Контроль	$9,5 \pm 0,5$	$0,067 \pm 0,003$
2	АХБТ	$11,6 \pm 1,2$ $p > 0,05$	$0,094 \pm 0,03$ $p < 0,01$
3	АХБТ+квертулин	$10,4 \pm 0,8$ $p > 0,3$ $p_1 > 0,3$	$0,078 \pm 0,007$ $p > 0,05$ $p_1 < 0,05$
4	АХБТ+квертулидон	$10,4 \pm 0,8$ $p > 0,3$ $p_1 > 0,3$ $p_2 = 1,0$	$0,080 \pm 0,05$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,5$

Примечания: см. табл. 1.

Таблица 4
Влияние кверцетин-содержащих гелей на активность каталазы и индекс АПИ в слизистой желудка крыс, получавших АХБТ ($M \pm m$, все $n = 10$)

№ п/п	Группа	Каталаза, мкат/кг	АПИ
1	Контроль	$3,45 \pm 0,11$	$3,63 \pm 0,28$
2	АХБТ	$2,90 \pm 0,08$ $p < 0,01$	$2,50 \pm 0,20$ $p < 0,05$
3	АХБТ+квертулин	$3,52 \pm 0,09$ $p > 0,4$ $p_1 < 0,05$	$3,39 \pm 0,31$ $p > 0,3$ $p_1 < 0,05$
4	АХБТ+квертулидон	$3,17 \pm 0,20$ $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$	$3,05 \pm 0,27$ $p > 0,05$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,3$

Примечания: см. табл. 1.

Таблица 5
Влияние кверцетин-содержащих гелей на активность пепсина в слизистой желудка крыс, получавших АХБТ ($M \pm m$, все $n = 10$)

№ п/п	Группа	Пепсин, мк-кат/кг
1	Контроль	$25,7 \pm 1,7$
2	АХБТ	$43,7 \pm 2,1$ $p < 0,001$
3	АХБТ+квертулин	$35,2 \pm 3,7$ $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$
4	АХБТ+квертулидон	$37,2 \pm 3,6$ $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,5$

Примечания: см. табл. 1.

дополнительно имудон, усиливает в большей степени иммунитет и оказывает более сильное антидисбиотическое действие.

5. АХБТ повышает в слизистой желудка активность пепсина, которая снижается под влиянием кверцетин-содержащих оральных гелей.

Литература

1. Няньковський С. Порівняльна ефективність основних схем антихелікобактерної терапії у дітей / С. Няньковський, О. Івахненко // Ліки України. – 2004. – № 1. – С. 75-78.
2. Новик Г. И. Продукция гидролаз и антибиотикорезистентность молочнокислых и бифидобактерий / Г. И. Новик, Н. И. Астапович, Н. Е. Рябая // Прикладная биохимия и микробиология. – 2007. – т. 43, № 2. – С. 184-192.
3. Экспериментальные методы воспроизведения и определения степени дисбиоза в тканях полости рта / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Деньга [и др.] // Вісник стоматології. – 2010. – № 2. – С. 22-23.
4. Яковлев М. Ю. «Эндотоксиновая агрессия» как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных / М. Ю. Яковлев // Успехи современной биологии. – 2003. – т. 123, № 1. – С. 31-40.
5. Проблема иммунодефицита и роль антидисбиотических препаратов в профилактике его осложнений / А. П. Левицкий, Т. В. Томилина, О. А. Макаренко [и др.]. // В кн. «Бюллетень XIII чтений им. В. В. Подвысоцкого» (19-20 июля 2014 г.). – Одесса: УкрНИИ медицины транспорта, 2014. – 320 с.
6. Базарнова М. А. (ред.). Руководство по клинической лабораторной диагностике. Ч. 1 / М. А. Базарнова. – К.: Вища школа, 1981. – С. 55.
7. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков: метод. рекомендации / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская [и др.] – К.: ГФЦ МЗУ, 2007. – 22 с.
8. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации / А. П. Левицкий, О. В. Деньга, О. А. Макаренко [и др.] – Одесса,

2010. – 16 с.

9. Левицкий А. П. Пищеварительные ферменты слюнных желез: автореф. дис. ... д. б. н. / А. П. Левицкий. – Одесса, 1974. – 53 с.
10. Биохимические методы определения степени дисбиоза в слизистых оболочках пищеварительного тракта / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская [и др.] // Укр. біохім. журн. – 2010. – т. 82, № 4 (додаток 2). – С. 117.

References

1. Njan'kovs'kyj S., Ivahnenko O. Comparative effectiveness of basic schemes of helicobacter therapy in children. Liky Ukrai'ny. 2004; 1: 75-78.
2. Novik G. I., Astapovich N. I., Ryabaya N. E. The production of hydrolases and antibiotic resistance of lactobacilli and bifidobacilli. Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya. 2007; 43 (2): 184-192.
3. Levitsky A. P., Makarenko O. A., Denga O. V. [et al.]. The experimental methods of restoration and estimation of the degree of dysbiosis in oral tissues. Visnyk stomatologii. 2010; 2: 22-23.
4. Yakovlev M. Yu. «Endotoxin aggression» as beginning of illness or universal factor in the pathogenesis of human and animal diseases. Uspekhi sovrem. biokhimii. 2003; 123(1): 31-40.
5. Levitsky A. P., Tomilina T. V., Makarenko O. A. [et al.]. The problem of immunodeficiency and the role of antidysbiotic drugs in prevention of its complications. V kn. «Byulleten' XIII chteniy im. V. V. Podvysotskogo» (19-20 iyulya 2014 g.). Odessa: UkrNII meditsiny transporta, 2014: 320.
6. Bazarnova M. A. Rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike [Manual of Clinical Laboratory Diagnostics]. Ch. 1. Kiyev, Vyshcha shkola, 1981: 55.
7. Levitsky A. P., Makarenko O. A., Selivanskaya I. A. [et al.]. Fermentativnyy metod opredeleniya disbioza polosti rta dlya skringinga pro- i prebiotikov: metodicheskie rekomendatsii [Enzymatic methods for determination of oral dysbiosis for screening pro- and prebiotics: method guidelines]. Kiev, GFC, 2007: 22.
8. Levitsky A. P., Denga O. V., Makarenko

O. A. [et al.]. Biokhimicheskie markery vospaleniya tkaney rotovoy polosti: metodicheskie rekomendatsii [Biochemical markers of inflammation of oral cavity tissue: method guidelines]. Odessa, KP OGT, 2010: 16.

9. Levitsky A. P. Pishchevaritel'nye fermenty slyunnykh zhelez: avtoref. dis. ... d. b. n. [Digestive enzymes of the salivary glands: thesis abstract... Dr. Biol. Sci.]. Odessa, 1974: 53.
10. Levitsky A. P., Makarenko O. A., Selivanskaya I. A. [et al.]. Biochemical methods for determination of the degree of dysbiosis in the mucous membranes of the digestive tract. Ukr. biokhim. zhurn. 2010; 82(4): 117.

Резюме

ДИСБІОТИЧНІ УСКЛАДНЕННЯ В ШЛУНКУ ЩУРІВ, ЯКІ ОТРИМУВАЛИ АНТИХЕЛІКОБАКТЕРНУ ТЕРАПІЮ ТА ЇХ ПРОФІЛАКТИКА КВЕРЦЕТИН-ВМІСНИМИ ПРЕПРАТАМИ

Гоженко А.І., Шухтіна І.М.,
Петренко О.А.

У щурів, які отримували антихелікобактерну терапію (АХБТ) протягом 8 днів, в шлунку розвивався дисбіоз і гастрит, які можливо попередити кверцетин-вмісними препаратами «Квертулін» або «Квертулідон».

Ключові слова: антихелікобактерна терапія, шлунок, дисбіоз, запалення, кверцетин.

Summary

DYSBIOTIC COMPLICATIONS IN THE STOMACH OF RATS AFTER ANTI-HELICOBACTER PYLORI THERAPY AND THEIR PREVENTION USING QUERCETIN-CONTAINING DRUGS

Gozhenko A.I., Shukhtina I.N.,
Petrenko A.A.

Aim: To establish a pro-dysbiotic effect of anti-helicobacter pylori therapy (AHBT) on the stomach and identify preventive effectiveness of quercetin-containing drugs.

Materials and methods: The rats have received AHBT (omeprazole 1.3 mg/kg, amoxil 50 mg/kg and clarithromycin 7.5 mg/kg) daily for 8 day; and oral applications of quercetin-containing gels “Quertulin” (quercetin + inulin + calcium citrate) or “Qertulidon” (qertulin + imudon) for 11 days. After euthanasia of animals on day 12 there were determined leukocytes levels and leukocyte formula in the blood, and the activity of urease, lysozyme, catalase, pepsin and content of malondialdehyde (MDA) in the homogenate of the gastric mucosa. Prooxidant-antioxidant index (PAI) was calculated as the ratio of the catalase activity and MDA content, the degree of dysbiosis by Levitsky was calculated as the ratio of the relative activities of urease and lysozyme.

Results: AHBT reduces neutrophils and increases the portion of lymphocytes by 1.5 times in the blood. AHBT also increases urease activity by 2.5 times and reduces the lysozyme activity by 2-fold, which gives the 5-fold increase in the degree dysbiosis in the gastric mucosa. This increases the elastase level (a marker of inflammation) and reduces PAI. Quercetin-containing drugs, especially Qertulidon, show a protective effect.

Conclusion: AHBT causes the development of dysbiosis and gastritis, which can be prevented by oral applications with quercetin-containing gels.

Keywords: anti-helicobacter pylori therapy (AHBT), stomach, dysbiosis, inflammation, quercetin.

Впервые поступила в редакцию 30.03.2015 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования