

УДК 616.33+342.092

О. Е. Успенский, К. В. Скидан, к. м. н.

Харьковский национальный медицинский университет

СНИЖЕНИЕ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА И ПОВЫШЕНИЕ ДИСБИОЗА И ВОСПАЛЕНИЯ В СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКЕ ПОЛОСТИ РТА КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ АНТИХЕЛИКОБАКТЕРНУЮ ТЕРАПИЮ, И ИХ НОРМАЛИЗАЦИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ КВЕРЦЕТИНА

У крыс, получавших антихеликобактерную терапию (АХБТ), снижается в сыворотке крови и в СОПР активность лизоцима, увеличивается активность уреазы, степень дисбиоза и воспаления в СОПР. Оральные аппликации гелей с кверцетином нормализуют все показатели в СОПР крыс, получавших АХБТ.

Ключевые слова: антихеликобактерная терапия, слизистая оболочка полости рта, иммунодефицит, дисбиоз, воспаление, кверцетин.

О. Є. Успенський, К. В. Скидан

Харківський національний медичний університет

ЗНИЖЕННЯ НЕСПЕЦИФІЧНОГО ІМУНІТЕТУ ТА ПІДВИЩЕННЯ ДИСБІОЗУ І ЗАПАЛЕННЯ В СЛИЗОВІЙ ОБОЛОНЦІ ПОРОЖНИНИ РОТА ЦУРІВ, ЯКІ ОТРИМУВАЛИ АНТИХЕЛІКОБАКТЕРНУ ТЕРАПІЮ, ТА ЇХ НОРМАЛІЗАЦІЯ ПІД ВПЛИВОМ КВЕРЦЕТИНА

У цурів, які отримували антихелікобактерну терапію (АХБТ), знижується в сироватці крові і в СОПР активність лізоцима, збільшується активність уреаз, ступінь дисбіозу та запалення в СОПР. Оральні аплікації гелів з кверцетином нормалізують усі показники в СОПР цурів, які отримували АХБТ.

Ключові слова: антихелікобактерна терапія, слизова оболонка порожнини рота, імунодефіцит, дисбіоз, запалення, кверцетин.

O. E. Uspenskiy, K. V. Skidan

State Establishment «Kharkov National Medical University»

THE REDUCTION OF NONSPECIFIC IMMUNITY AND GROWTH OF DYSBIOSIS AND INFLAMMATION IN ORAL MUCOUS MEMBRANE IN RATS, HAVING UNDERWENT ANTI-HELICOBACTER THERAPY, AND THEIR NORMALIZATION UNDER THE INFLUENCE OF QUERCETIN

ABSTRACT

The aim. To determine the state of nonspecific immunity, dysbiosis and inflammation in oral mucosa (OM) at anti-helicobacter therapy (AHBT) and the possibility of their correction with quercetin-containing preparations “Quertulin” and “Quertulidon”.

The materials and the methods. AHBT was carried out daily by introduction of the following preparations: Omeprazole – 1.3mg/kg, Amoxil – 50 mg/kg and Clarithromycin – 7.5 mg/kg

during 8 days. The oral gels “Quertulin” (quercetin + inulin + calcium citrate) and “Quertulidon” (Quercetin + imudon), dosed at 0.5ml, were applied on OM during 11 days. After the euthanasia on the 12th day the activity of lysozyme was revealed in blood serum and OM, the activity of urease, elastase and content of MDA – in OM. According to the ratio of the relative activities of urease and lysozyme the degree of dysbiosis in OM was calculated.

The findings. The reduction in the activity of lysozyme in blood serum and OMM, growth in activity of urease, the degree of dysbiosis and level of inflammation markers (MDA and elastase) in OM of rats, having undergone AHBT, was revealed. Quertulin and Quertulidon increase activity of lysozyme, reduce activity of urease, degree of dysbiosis and level of inflammation markers in OM.

The conclusion. AHBT causes the reduction of nonspecific immunity, growth of the degree of dysbiosis and inflammation in OM. Quercetin-containing preparations strengthen immunity and reduce the degree of dysbiosis and inflammation.

Key words: anti-helicobacter therapy, oral mucosa, immunodeficiency, dysbiosis, inflammation, quercetin.

Побочные эффекты антихеликобактерной терапии (АХБТ) связаны, прежде всего, с наличием в составе комплекса препаратов АХБТ мощных антибиотиков [1-3]. Последние, как известно, способны вызывать развитие дисбиоза [4], в патогенезе которого решающим фактором является иммунодефицит (ИД) [5].

Как известно, с одной стороны ИД представлен неспецифическим, врожденным, в котором главенствующую роль занимает антибактериальная функция нейтрофилов [6], а также активность ряда антимикробных ферментов (лизоцима, пероксидаз, лактоферрина и др.) [7]. С другой стороны, ИД представлен специфическим, приобретенным, основанном на участии лимфоцитов разных классов, ряд из которых способны продуцировать антитела (иммуноглобулины) [8].

Ранее нами было показано, что при АХБТ в крови снижается содержание нейтрофилов и увеличивается содержание лимфоцитов, увеличивая соотношение лимфоциты:нейтрофилы в 3 раза [9]. Это может свидетельствовать об ослаблении неспецифического иммунитета [6] и поэтому может указывать на целесообразность применения при АХБТ стимуляторов неспецифического иммунитета. Наиболее эффективными иммуностимуляторами являются полифенольные вещества, в частности, биофлавоноиды [10].

Поэтому целью данной работы стало определение состояния неспецифического иммунитета, дисбиоза и воспаления в слизистой оболочке полости рта (СОПР) при АХБТ и возможность их коррекции с помощью кверцетинсодержащих препаратов: Квертулин и Квертулидон.

Материалы и методы исследования. В эксперименте было использовано 40 белых крыс линии Вистар (самки, 10 месяцев, средняя живая масса 300 г). Их распределили в 4 равных группы: 1-ая – контрольная (интактные), 2-ая, 3-я и 4-ая – получали АХБТ в течение 8 дней, причем 3-я группа дополнительно получала аппликации на СОПР геля «Квертулин», а 4-ая – геля

«Квертулидон» в дозе 0,5 мл ежедневно в течение 11 дней.

АХБТ включала в себя: ингибитор протонной помпы омепразол, антибиотики амоксил и кларитромицин в суточных дозах 1,3 мг/кг, 50 мг/кг и 7,5 мг/кг соответственно [9].

Гель «Квертулин» (ТУ У 20.4-13903778-032:2012) производства ООО «Биохимтех» (Одесса, Украина), содержит в своем составе кверцетин, инулин и цитрат кальция. Гель «Квертулидон» (ТУ У 20.4-13903778-032:2012) производства ООО «Биохимтех» (Одесса, Украина), содержит Квертулин и Имудон.

Эвтаназию крыс осуществляли на 12-й день опыта под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца. Собирали сыворотку крови и иссекали слизистую оболочку щеки

крыс, в гомогенате которой (20 мг/мл 0,05 М трис-НСІ буфера, рН 7,5) определяли активность лизоцима (маркер неспецифического иммунитета) бактериолитическим методом [11], активность уреазы (показатель микробной обсемененности) [12], уровень биохимических маркеров воспаления [13]: содержание малонового диальдегида (МДА) [14] и активность эластазы [15].

По соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима рассчитывали степень дисбиоза по Левицкому [16].

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли в соответствии с рекомендациями [17]. Рассчитывали средние величины (М), ошибку средней величины ($\pm m$), достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Таблица 1

Активность лизоцима в СОПР и в сыворотке крови крыс, получавших АХБТ и кверцетинсодержащие препараты (М \pm m, n=10)

№№ п/п	Группы	СОПР, ед/кг	Сыворотка, ед/л
1	Контроль	300 \pm 40	131 \pm 8
2	АХБТ	140 \pm 40 p<0,05	107 \pm 4 p<0,05
3	АХБТ + Квертулин	260 \pm 50 p>0,3 p ₁ >0,05	132 \pm 5 p>0,8 p ₁ <0,05
4	АХБТ + Квертулидон	240 \pm 50 p>0,3 p ₁ >0,05 p ₂ >0,5	126 \pm 4 p>0,3 p ₁ <0,05 p ₂ >0,3

Примечание : p – в сравнении с гр. 1; p₁ – в сравнении с гр. 2; p₃ – в сравнении с гр. 3.

Таблица 2

Активность уреазы и степень дисбиоза в СОПР крыс, получавших АХБТ и кверцетинсодержащие препараты (М \pm m, n=10)

№№ п/п	Группы	Уреазы, мк-кат/кг	Степень дисбиоза, ед.
1	Контроль	0,41 \pm 0,04	1,00 \pm 0,15
2	АХБТ	0,65 \pm 0,04 p<0,01	3,39 \pm 0,22 p<0,01
3	АХБТ + Квертулин	0,54 \pm 0,03 p<0,05 p ₁ <0,05	1,52 \pm 0,20 p<0,05 p ₁ <0,01
4	АХБТ + Квертулидон	0,56 \pm 0,03 p<0,05 p ₁ >0,05 p ₂ >0,5	1,59 \pm 0,19 p<0,05 p ₁ <0,01 p ₂ >0,5

Примечание : см. табл. 1

Результаты и их обсуждение. В таблице 1 представлены результаты определения активности лизоцима в СОПР и в сыворотке крови крыс, получавших АХБТ. Из этих данных видно, что АХБТ вызывает снижение активности лизоцима в СОПР на 53,3 %, а в сыворотке крови на 18,3 % (в обоих случаях p<0,05). Кверцетинсодержащие препараты повышают на 85,7 % (Квертулин) и на 71,4 % (Квертулидон) уровень лизоцима в СОПР. В сыворотке крови Квер-

тулин повышает активность лизоцима на 23,4 %, а Квертулидон – на 17,8 %. Эти результаты подтверждают данные об угнетении неспецифического иммунитета под влиянием АХБТ [9].

В таблице 2 показано, что АХБТ достоверно увеличивает в СОПР активность уреазы – показатель микробного обсеменения. Аппликации гелей с кверцетином на СОПР достоверно снижают уровень уреазы.

В этой же таблице представлены результаты определения степени дисбиоза по Левицкому, из которых видно, что АХБТ увеличивает степень дисбиоза в СОПР в 3,4 раза, а оральные аппликации гелей с кверцетином снижают ее в 2 раза.

В таблице 3 представлены результаты определения уровня в СОПР биохимических маркеров воспаления: МДА и эластазы. Из этих данных видно, что АХБТ увеличивает их уровень на 54,5 % (МДА) и на 40 % (эластаза), что свидетельствует о развитии воспаления в СОПР после курса АХБТ.

Таблица 3

Уровень маркеров воспаления в СОПР крыс, получавших АХБТ и кверцетинсодержащие препараты (M±m, n=10)

№№ п/п	Группы	МДА, ммоль/кг	Эластаза, мк-кат/кг
1	Контроль	15,4±1,5	20±1
2	АХБТ	23,8±2,8 p<0,05	28±3 p<0,05
3	АХБТ + Квертулин	18,6±2,0 p>0,1 p ₁ >0,05	21±2 p>0,5 p ₁ <0,05
4	АХБТ + Квертулидон	18,9±2,5 p>0,1 p ₁ >0,05 p ₂ >0,5	21±1 p>0,5 p ₁ <0,05 p ₂ =1,0

Примечание: см. табл. 1

Аппликации гелей с кверцетином снижают уровень маркеров воспаления до нормы, что свидетельствует о противовоспалительном действии этих гелей.

Выводы. 1. АХБТ снижает неспецифический иммунитет, способствует развитию дисбиоза и воспаления в СОПР.

2. Оральные аппликации гелей с кверцетином устраняют иммунодефицит, снижают степень дисбиоза и воспаления в СОПР.

Список литературы

1. Циммерман Я. С. *Helicobacter pylori*-инфекция: внежелудочные эффекты и заболевания (критический анализ) / Я. С. Циммерман // Клиническая медицина. – 2006. – № 4. – С. 63-67.
2. Исаева Г. Ш. Возможное участие бактерии рода *Helicobacter* в патогенезе гепатобилиарных заболеваний / Г. Ш. Исаева // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – № 4. – С. 14-22.
3. Цодиков Г. В. Достижения и перспективы изучения *Helicobacter pylori*-инфекции / Г. В. Цодиков, А. М. Зякун, Е. В. Климова // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2011. – № 2. – С. 46-49.
4. 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.
5. Мельников О. Ф. Местный иммунитет и концепция диагностики иммунной недостаточности на основе определения уровня защитных белков в секретах / О. Ф. Мельников, Д. Д. Заболотная // Сучасні медичні технології. – 2009. – № 2. – С. 37-42.
6. Плехова Н. Г. Бактерицидная активность фагоцитов / Н. Г. Плехова // ЖМЭИ. – 2006. – № 6. – С. 89-96.
7. Проблема неспецифического и специфического в индукции и регуляции иммунологических реакций / А. М. Земсков, В. М. Земсков, М. А. Земсков [и др.] // ЖМЭИ. – 2005. – № 4. – С. 105-109.
8. Ивашкин В. Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии / В. Т. Ивашкин // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – № 4. – С. 4-13.
9. Шухтина И. Н. Влияние антихеликобактерной терапии на состояние печени у крыс / И. Н. Шухтина, В. Л. Васюк // Актуальные проблемы транспортной медицины. – 2015. – № 1. – С. 25-30.

10. Левицкий А. П. Применение антидисбиотических средств в стоматологии / А. П. Левицкий // Вісник стоматології. – 2014. – № 4. – С. 80-88.

11. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / Левицкий А. П. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.

12. Гаврикова Л. М. Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой и хронической инфекцией челюстно-лицевой области / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень // Стоматология. – 1996. – Спецвыпуск. – С. 49-50.

13. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: метод. рекомендации / Левицкий А. П., Денга О. В., Макаренко О. А. [и др.] – Одесса, 2010. – 16 с.

14. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. В кн.: Современные методы в биохимии / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

15. Левицкий А. П. Методы определения активности эластазы и ее ингибиторов: методические рекомендации / А. П. Левицкий, А. В. Стефанов. – К.: ГФЦ, 2002. – 15 с.

16. Патент на корисну модель, Україна 43140, МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / Левицький А.П., Денга О. В., Селіванська І.О. [та ін.]. – Опубл. 10.08.2009, Бюл. № 15.

17. Лапач О. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / О. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 320 с.

REFERENCES

1. Tsimmerman Ya. S. *Helicobacter pylori*-infection: outergastric effects and diseases (the critical analysis). *Klinicheskaya meditsina*. 2006; 4: 63-67.
2. Isaeva G. Sh. The possible participation of *Helicobacter* bacteria in pathogenesis of hepatobiliary diseases. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2008; 4: 14-22.
3. Tsodikov G. V., Zyakun A. M., Klimova E. V. The achievements and projects of study of *Helicobacter pylori*-infections. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2011; 2: 46-49.
4. 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.
5. Melnikov O. F., Zabolotnaya D. D. Local immune system and diagnostics concept of immune deficiency on the basis of determining the level of protective proteins in the secretions. *Suchasni medichni tekhnologii*. 2009; 2: 37-42.
6. Plekhova N. G. Bactericidal activity of phagocytes. *JMEI*. 2006; 6: 89-96.

7. Zemskov A. M., Zemskov V. M., Zemskov M. A. [i dr.]. The problem of the nonspecific and the specific in induction and regulation of immunologic reactions. *JMEI*. 2005; 4: 105-109.

8. Ivashkin V. T. The basic notions and the statements of the fundamental immunology. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2008; 4: 4-13.

9. Shukhtina I. N., Vasyuk V. L. The influence of anti-helicobacter therapy on the state of liver in rats. *Aktual'nye problemy transportnoy meditsiny*. 2015; 1: 25-30.

10. Levitsky A. P. The use of antidysbiotic preparations in dentistry. *Visnyk stomatologii*. 2014; 4: 80-88.

11. Levitsky A. P. *Lizotsym vmesto antibiotikov* [Lysozyme instead of antibiotics]. *Odessa, KP OGT*, 2005: 74.

12. Gavrikova L. M., Segen I. T. Urease activity of oral liquid in patients with acute odontogenic infection of maxillo-facial part. *Stomatologiya*. 1996; The extra issue :49-50.

13. Levitsky A. P., Denga O. V., Makarenko O. A. [i dr.]. *Biokhimicheskie markery vospaleniya tkaney rotovoy polosti: metodicheskie rekomendatsii* [Biochemical markers of inflammation of oral cavity tissue: method guidelines]. *Odessa, KP OGT*, 2010: 16.

14. Stalnaya I. D., Garishvili T. G. *Metod opredeleniya malonovogo dialdegida s pomoshchyu tiobarbiturovoy kisloty* [The method of revelation of malonic dialdehyde with thiobarbituric acid]. *Moskva, Meditsina*, 1977: 66-68.

15. Levitsky A. P., Stefanov A. V. *Metody opredeleniya aktivnosti elastazy i eye ingibitorov: metodicheskie rekomendatsii* [The methods of the determination of the activity of elastase and its inhibitors: method guidelines]. *Kiev, GFK*, 2002: 15.

16. Levitsky A. P., Denga O. V., Selivanskaya I. A. [ta in.]. The method of estimation of the degree of dysbiosis (dysbacteriosis) of organs and tissues. Patent of Ukraine 43140. IPC (2009) G01N 33/48. Application number u 200815092. Date of filling: 26.12.2008. Publ.: 10.08.2009. Bul. № 15.

17. Lapach S. N., Chubenko A. V., Babich P. N. *Statisticheskiye metody v medico-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel* [Statistical methods in medical and biological research by using Excel]. *Kiev, Morion*, 2000: 320.

Поступила 09.02.15



УДК 616.33+342.092

Т. В. Томила, к. мед. н.

Харьковский национальный медицинский университет

КВЕРЦЕТИН ПОВЫШАЕТ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУНИТЕТ И СНИЖАЕТ ДИСБИОЗ И ВОСПАЛЕНИЕ В ПАРОДОНТЕ КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ АНТИХЕЛИКОБАКТЕРНУЮ ТЕРАПИЮ

У крыс, которые получали антихеликобактерную терапию (АХБТ), снижается в сыворотке крови и в десне активность лизоцима, повышается степень дисбиоза и воспаления в пародонте. Оральные аппликации гелей кверцетинсодержащих препаратов (Квертулин или Квертулидон) нормализуют иммунитет, устраняют дисбиоз и воспаление в пародонте после АХБТ.

Ключевые слова: антихеликобактерная терапия, пародонт, иммунодефицит, дисбиоз, воспаление, кверцетин.

Т. В. Томила

Харківський національний медичний університет

КВЕРЦЕТИН ПІДВИЩУЄ НЕСПЕЦИФІЧНИЙ ІМУНІТЕТ І ЗНИЖУЄ ДИСБІОЗ І ЗАПАЛЕННЯ В ПАРОДОНТІ ЦУРІВ, ЯКІ ОТРИМУВАЛИ АНТИХЕЛІКОБАКТЕРНУ ТЕРАПІЮ

У цурів, які отримували антихелікобактерну терапію (АХБТ), знижується в сироватці крові і в яснах активність лізоцима, збільшується ступінь дисбіозу та запалення в пародонті. Оральні аплікації гелів кверцетинвмісних препаратів (Квертулін або Квертулідон) нормалізують імунітет, усувають дисбіоз та запалення в пародонті після АХБТ.

Ключові слова: антихелікобактерна терапія, пародонт, імунodefіцит, дисбіоз, запалення, кверцетин.

Т. В. Томила

State Establishment «Kharkov National Medical University»

QUERCETHIN INCREASES NONSPECIFIC IMMUNITY AND REDUCES DYSBIOSIS AND INFLAMMATION IN PERIODONTIUM OF RATS, HAVING UNDERGONE ANTI-HELICOBACTER THERAPY

ABSTRACT

The aim. To estimate the state of nonspecific immunity, dysbiosis and inflammation in periodontium of rats, having undergone anti-helicobacter therapy (AHBT) and to correct them with quercetin.

The materials and the methods. 40 white rats of Vistar line, AHBT included daily taking of the following preparations during 8 days: Omeprazole – 1.3mg/kg, Amoxil – 50 mg/kg and Clarithromycin – 7.5 mg/kg. In the capacity of Quercetin the gels "Quertulin" (quercetin + inulin + calcium citrate) and "Quertulidon" (Quercetin + imudon), applied daily with 0.5ml on oral mucous membrane during 11 days. Rats' euthanasia was carried out on the 12th day. The activity of lysozyme, urease, elastase and content of MDA was revealed in serum and homogenate of gum. According to the ratio of the relative activities of urease and lysozyme the degree of dysbiosis in gum was calculated.

The findings. The reduction of the activity of lysozyme (the index of nonspecific immunity) in serum and in rats gum after AHBT, growth of urease activity (marker of microbe insemination) and degree of dysbiosis, as well as the level of markers of inflammation (MDA and elastase) in gum of rats, that underwent AHBT, was determined. The applications of gels Quertulin and Quertulidon increase activity of lysozyme, decrease the degree of dysbiosis and inflammation. The considerable difference between two Quercetin preparations was not observed.

The conclusion AHBT causes the development of immunodeficiency, dysbiosis and inflammation in periodontium. These phenomena are depressed with oral applications of gels of quercetin-containing preparations.

Key words: anti-helicobacter therapy, periodontium, immunodeficiency, dysbiosis, inflammation, quercetin.