

ВЛИЯНИЕ АНТИДИСБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ НЕАЛКОГОЛЬНЫМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ

¹Буковинский государственный медицинский университет (г. Черновцы)

²КУ «Одесская областная клиническая больница»

³Крымская медицинская академия им. С. И. Георгиевского (г. Симферополь)

65026, г. Одесса, ул. Ришельевская, 11.

E-mail: flavan@mail.ru

Реферат. В. Л. Васюк, Е. М. Левченко, С. А. Демьяненко. **ВЛИЯНИЕ АНТИДИСБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ НЕАЛКОГОЛЬНЫМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ.** Высокожировая диета в сочетании с введением линкомицина вызывает развитие стеатогепатита. Введение антидисбиотических средств (про- и пребиотиков) оказывает лечебно-профилактический эффект.

Ключевые слова: стеатогепатит, дисбиоз, антидисбиотические средства, пробиотики, пребиотики.

Реферат. В. Л. Васюк, О. М. Левченко, С. О. Дем'яненко. **ВПЛИВ АНТИДИСБИОТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НА СТАН ПЕЧІНКИ ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ НЕАЛКОГОЛЬНИМ СТЕАТОГЕПАТИТОМ.** Високожирова дієта в сполученні з введенням лінкоміцину викликають розвизних засобів (про- і пребіотиків) здійснює лікувально-профілактичний ефект.

Ключові слова: стеатогепатит, дисбіоз, антидисбіотичні засоби, пробіотики, пребіотики.

Summary. V. L. Vasjuk, E. M. Levchenko, S. A. Dem'janenko. **INFLUENCE OF ANTI-DYSBIOTIC DRUGS ON THE LIVER OF RATS WITH NASH (NON-ALCOHOLIC STEATONHEPATITIS).** The objective: To determine therapeutic and preventive effectiveness of anti-dysbiotic drugs in experimental steatohepatitis. Materials and methods: Steatohepatitis was reproduced in rats by a combination of high-fat food with lincosmycin. As anti-dysbiotic drugs (ADD) oral phytogels "Quertulidon" (contains quercetin, inulin, imudon, calcium citrate) and "Symbiter" (contains probiotic bacteria and acetic acid yeast) were used. In hepatic homogenate MDA, triglycerides (TG) and cholesterol, elastase activity, urease, lysozyme, alkaline phosphatase (ALP) were determined. ALT (alanine aminotransferase), ALP, TG and cholesterol were determined in the blood serum. Results: Steatohepatitis causes an increase in the triglyceride and cholesterol levels in liver and blood serum, which is reduced after ADD applications. Steatohepatitis increases the levels of inflammatory markers (MDA and elastase) in liver and blood serum. ADD reduce the level of MDA and, to a lesser extent, reduce the elastase activity. Steatohepatitis increases ALT and ALP in blood. ADD slightly reduce their level. Steatohepatitis enhances the urease activity in the liver and reduces the activity of lysozyme in liver. Conclusion: In the pathogenesis of steatohepatitis dysbiosis plays a significant role, the extent of dysbiosis can be reduced by oral ADD administrations.

Keywords: steatohepatitis, dysbiosis, antidysbiotic drugs, probiotics, prebiotics.

Введение. Неалкогольный стеатогепатит (НАСГ) встречается у 2-4 % населения [1], что для Украины составляет 1-2 млн. человек. НАСГ развивается в результате ожирения печени, определяемого в настоящее время как неалкогольная жировая болезнь печени (НЖБП), которая встречается у 10-40 % населения [1]. НАЖБ развивается в 4 стадии: стеатоз, стеатогепатит, фиброз и цирроз. Причинами НАЖБ являются повышенное потребление жиров [2] и наличие дисбиоза [3], которые вызывают развитие инсулинорезистентности. Последний синдром лежит в основе патогенеза сахарного диабета 2 типа, метаболического синдрома, ожирения и атеросклероза [4].

Исходя из данных о важной роли дисбиоза в патогенезе НАЖБ, нами было предложено использовать антидисбиотические средства (АДС) для профилактики стеатогепатита, в частности, такие препараты, как про- и пребиотики [5].

В последнее время было предложено использовать в качестве АДС комплексный препарат Квертулин, содержащий биофлавоноид кверцетин, пребиотик инулин и цитрат кальция [6].

Целью настоящего исследования стало определение лечебно-профилактической эффективности при экспериментальном стеатогепатите сочетанного применения Квертулидона и мультипробиотика «Симбитер», содержащего 4 вида бактерий (бифидобактерии, лактобациллы, пропионибактерии и уксуснокислые дрожжи).

Материалы и методы исследования

В опыте было использовано 24 белых крысы линии Вистар (самцы, 8 мес., 200±15 г), распределенных в 3 равные группы: 1-ая – контроль, 2-ая и 3-я – экспериментальная модель стеатогепатита (ЭСГ), 3-я группа получала оральные аппликации гелем «Квертулидон» и «Симбитер» по 0,3 мл на крысу ежедневно в течение 21 дня.

Экспериментальный стеатогепатит вызывали путем содержания крыс на высокожировом рационе (+ 25 % к стандартному комбикорму смеси пальмового масла и термообработанной соевой муки в соотношении 1:1) и воспроизведения кишечного дисбиоза (линкомицин с питьевой водой в дозе 70 мг/кг в течение первых 5 дней) [7].

Фитогель «Квертулидон» (квертулин – 3 %, «Иммудон» – 8 мг, экстракт мяты – 10 %, натрия бензоат – 2 %, ментол – 0,1 %, КМЦ-Na соль – 4 %, вода дистиллированная – до 100 %). РЦ У 20.4-13903778-032/8:2015 и ТУ У 20.4-13903778-032:2012.

Фитогель «Симбитер» (пробиотик «Симбитер» (ацидофильный, концентрированный, производства ООО «О. Д. Пролісок» Украина) – 10 %, экстракт мяты – 10 %, натрия бензоат – 2 %, КМЦ-Na соль – 4 %, вода дистиллированная – до 100 %). РЦ У 20.4-13903778-032/2:2012 и ТУ У 20.4-13903778-032:2012. В состав симбиотика «Симбитер» входят лактобациллы и лактококки 6×10^{10} КОЕ/г, бифидумбактерии 1×10^{10} КОЕ/г и уксуснокислые бактерии 1×10^6 КОЕ/г.

Умерщвление животных осуществляли на 22-й день опыта под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца. Получали сыворотку крови и ткань печени, которые хранили до исследования при минус 30 °С.

В гомогенате печени (50 мг/мл 0,05 М трис-НСІ буфера рН 7,5) определяли уровень маркеров воспаления [8]: содержание малонового диальдегида (МДА) по реакции с тиобарбитуровой кислотой [9] и активность эластазы по гидролизу синтетического субстрата [10]. Определяли, активность щелочной фосфатазы (ЩФ) [11], активность уреазы (маркер микробного обсеменения) [12], активность лизоцима бактериолитическим методом [13], а по соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима – степень дисбиоза по А. П. Левицкому [14]. Кроме того, определяли в печени содержание триглицеридов (ТГ) [15] и общего холестерина (ОХ) [16].

В сыворотке крови определяли уровень печеночных маркеров: активность аланинтрансаминазы (АЛТ) [17] и активность щелочной фосфатазы (ЩФ) [11], а также содержание ТГ и ОХ.

Статобработку полученных результатов осуществляли в соответствии с рекомендациями [18] и рассчитывали достоверность различий, используя t-критерий Стьюдента, принимая за достоверные различия значения $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены результаты определения содержания триглицеридов в печени и в сыворотке крови крыс с экспериментальным стеатогепатитом. Как

видно из этих данных, у крыс с экспериментальным стеатогепатитом достоверно возрастает содержание триглицеридов в печени (на 16,3 %) и в сыворотке крови (на 83,0 %). Оральные аппликации антидисбиотических средств (гели «Квертулидон» и «Симбитер») достоверно снижают содержание триглицеридов как в печени, так и в сыворотке крови.

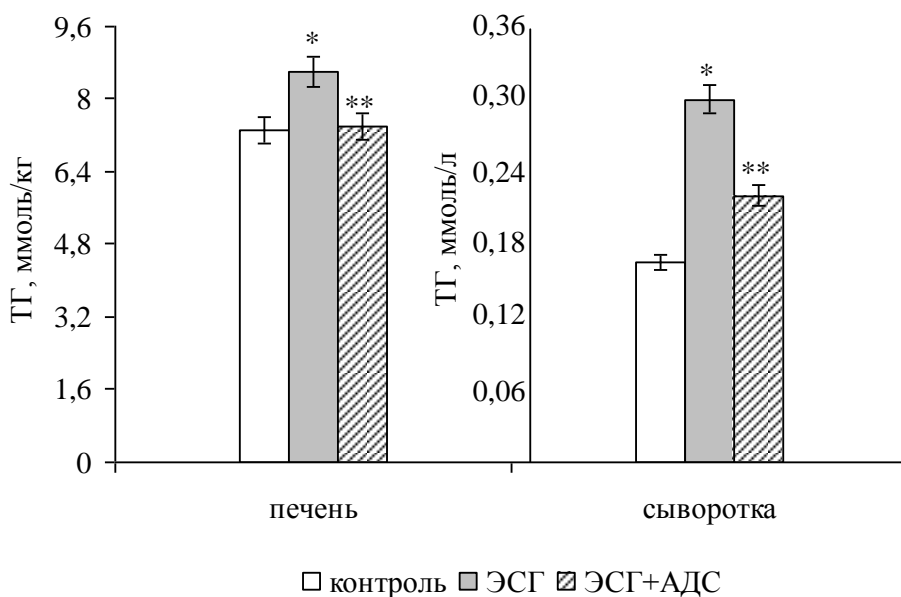


Рис. 1. Содержание триглицеридов в печени и в сыворотке крови крыс с экспериментальным стеатогепатитом (ЭСГ)

*— $p < 0,05$ в сравн. с гр. 1; **— $p < 0,05$ в сравн. с гр. 2

На рис. 2 представлены результаты определения содержания холестерина в печени и в сыворотке крови крыс с экспериментальным стеатогепатитом. Эти данные свидетельствуют о достоверном повышении уровня холестерина лишь в сыворотке (на 32,6 %). В печени содержание холестерина также возрастает (на 25,6 %), однако $p > 0,05$. Применение АДС несколько снижает уровень холестерина в печени и в сыворотке крови, однако, в обоих случаях $p > 0,05$.

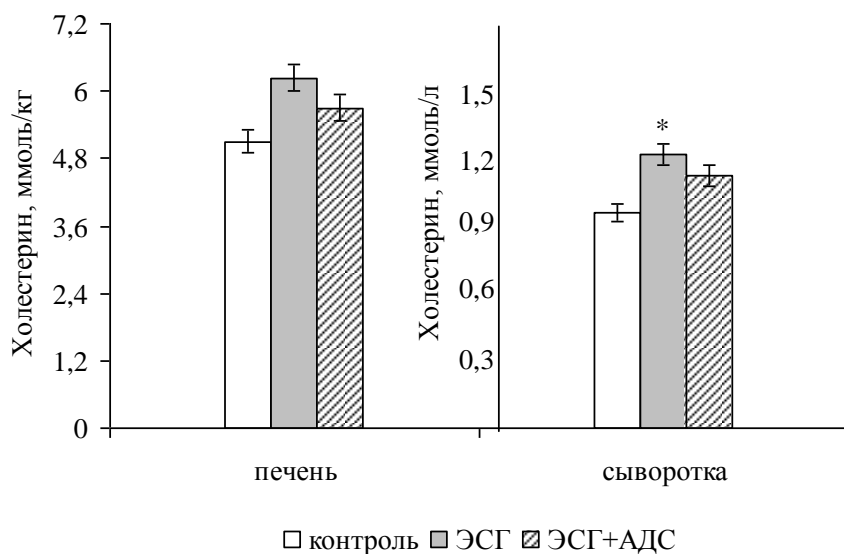


Рис. 2. Содержание холестерина в печени и в сыворотке крови крыс с экспериментальным стеатогепатитом (ЭСГ)

*— см. рис. 1

На рис. 3 представлены результаты определения содержания одного из маркеров воспаления – МДА. У крыс с ЭСГ достоверно возрастает уровень МДА в печени (на 55,3 %) и в сыворотке крови (на 15,2 %). Применение АДС достоверно снижает уровень МДА в печени (на 59,2 %) и в сыворотке (на 9,4 %).

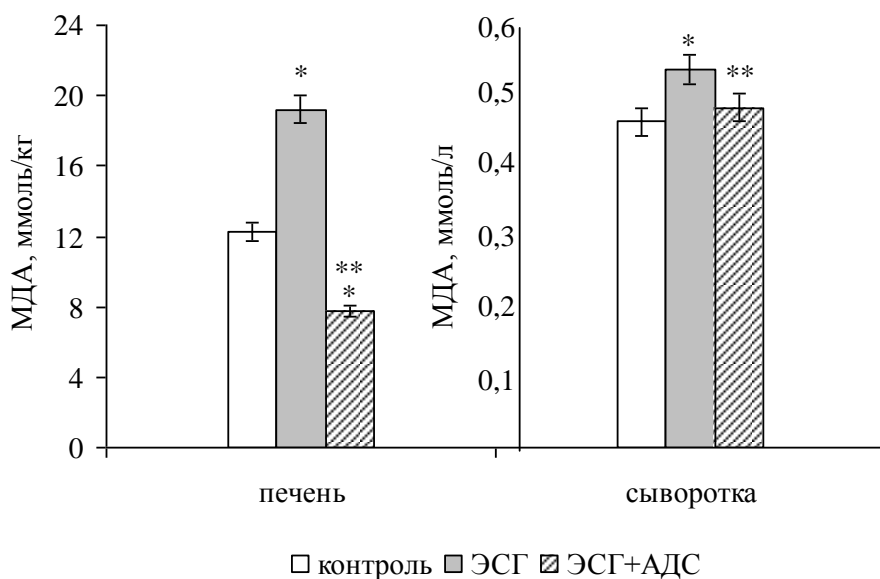


Рис. 3. Содержание МДА в печени и в сыворотке крови крыс с ЭСГ
*, ** – см. рис. 1

На рис. 4 представлены результаты определения в печени и в сыворотке крови второго маркера воспаления – активность эластазы.

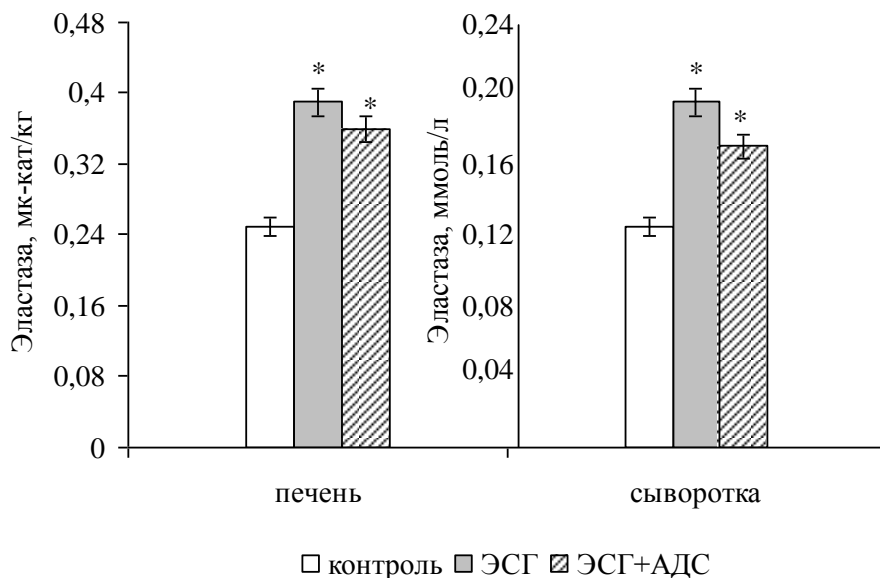


Рис. 4. Содержание эластазы в печени и в сыворотке крови крыс с ЭСГ
* – см. рис. 1

Из этих данных видно, что у крыс с ЭСГ достоверно возрастает активность эластазы в печени (на 56,0 %) и в сыворотке крови (на 53,1 %). Оральные аппликации АДС проявляют лишь тенденцию к снижению этого показателя, как в печени, так и в

сыворотке.

На рис. 5 показан уровень печеночных маркеров в сыворотке крови крыс с ЭСГ. Видно, что оба маркера (АЛТ и ЩФ) достоверно увеличивают свою активность (на 41,5 % и на 73,7 % соответственно). Аппликации АДС лишь слегка снижают уровень обоих печеночных маркеров.

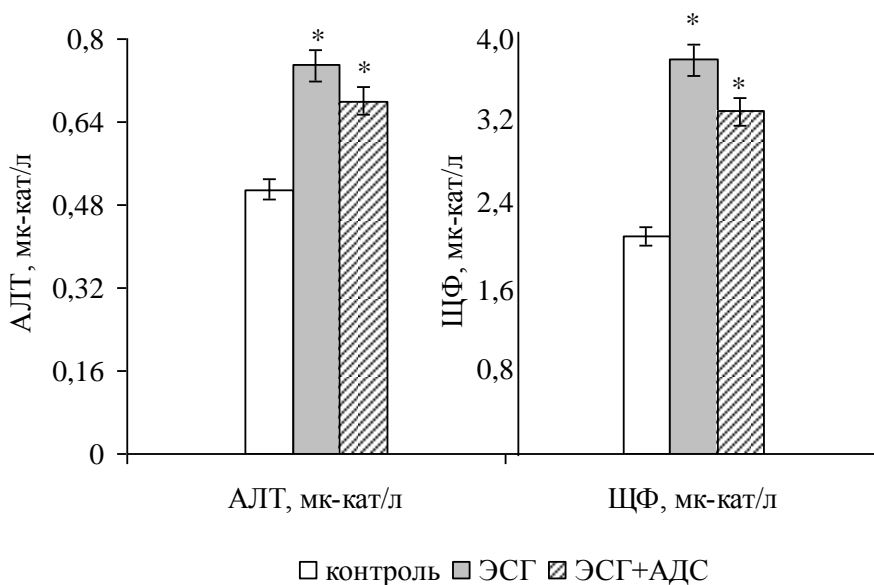


Рис. 5. Уровень печеночных маркеров (АЛТ и ЩФ) в сыворотке крови крыс с ЭСГ
*– см. рис. 1

На рис. 6 представлены результаты определения в печени активности уреазы (маркер микробного обсеменения) и лизоцима (показатель неспецифического иммунитета).

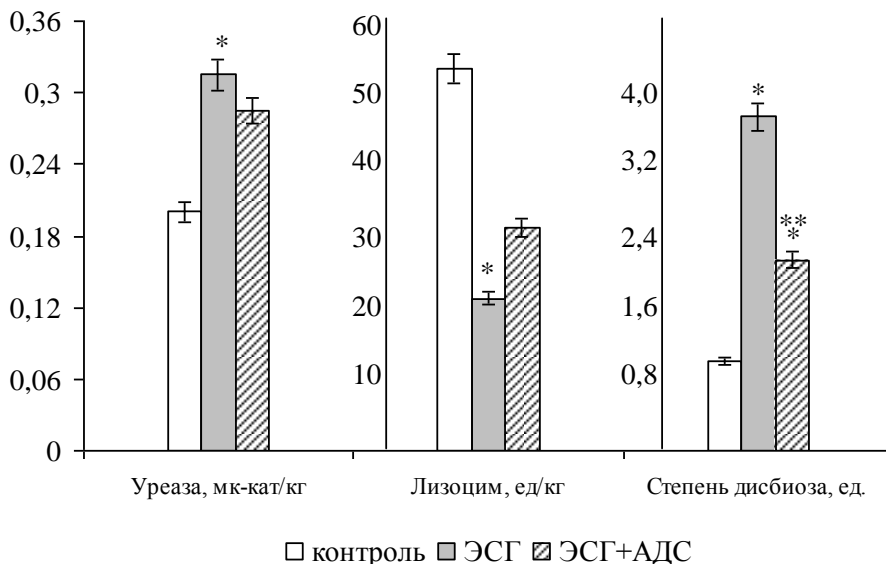


Рис. 6. Активность уреазы, лизоцима и степень дисбиоза в печени крыс с ЭСГ
*, **– см. рис. 1

Из этих данных видно, что активность уреазы у крыс с ЭСГ возрастает на 50 %, свидетельствуя о росте микробной обсемененности. Активность лизоцима, напротив, снижается на 60,4 %, показывая существенное снижение уровня

неспецифического иммунитета. Оральные аппликации АДС проявляют лишь тенденцию к снижению активности уреазы и к увеличению активности лизоцима. Рассчитанная по этим показателям степень дисбиоза в печени крыс с ЭСГ увеличивается в 3,8 раза. Оральные аппликации АДС достоверно снижают степень дисбиоза, однако не возвращают его к норме.

Выводы

1. Стеатогепатит вызывает высокожировую рацион и ведение антибиотика.
2. Стеатогепатит сопровождается развитием в печени дисбиоза.
3. Антидисбиотические средства (про- и пребиотики) оказывают лечебно-профилактическое действие при стеатогепатите.

Литература:

1. Неалкогольная жировая болезнь печени: клиника, диагностика и лечение / С. Н. Мехтиев, В. Б. Гринкевич, Ю. А. Кравчук [и др.] // Лечащий врач. – 2008. – № 2. – С. 29-37.
2. High-salt in addition to high-fat diet may enhance inflammation and fibrosis in liver steatosis induced by oxidative stress and dyslipidemia in mice / Y. Uetake, H. Ikeda, R. Irie [et al.] // *Lipids in Health and Disease*. – 2015. – v. 14, № 6. – P. 1-8.
3. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice / P. D. Cani, R. Biliboni, C. Knauf [et al.] // *Diabetes*. – 2008. – 57(6). – P. 1470-1481.
4. Егорова Е. Г. Инсулинорезистентность – основа метаболического синдрома / Е. Г. Егорова // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2007. – № 1. – С. 8-13.
5. Левицкий А. П. Гепатопротекторное действие антидисбиотических препаратов при экспериментальном метаболическом синдроме / А. П. Левицкий, Е. М. Левченко, В. Л. Васюк // *Журнал НАМН Украины*. – 2014. – т. 20, № 4. – С. 478-482.
6. Квертулин: витамин Р, пребиотик, гепатопротектор / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская [и др.]. – Одесса: КП ОГТ, 2012. – 20 с.
7. Вплив дисбіозу на стан печінки та ліпідного обміну щурів, які отримували високожировий раціон / В. В. Ткачук, В. І. Величко, О. М. Левченко [та ін.] // *Одеський медичний журнал*. – 2014. – № 2(142). – С. 27-31.
8. Биохимические маркеры воспаления тканей ротовой полости: методические рекомендации / А. П. Левицкий, О. В. Деньга, О. А. Макаренко [и др.]. – Одесса, 2010. – 16 с.
9. Стальная И. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили // *В кн.: Современные методы в биохимии*. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.
10. Левицкий А. П. Методы определения активности эластазы и ее ингибиторов: методические рекомендации / А. П. Левицкий, А. В. Стефанов. – К.: ГФЦ, 2002. – 15 с.
11. Экспериментальные методы исследования стимуляторов остеогенеза: методические рекомендации / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, О. В. Деньга [и др.]. – К.: ГФЦ, 2005. – 50 с.
12. Гаврикова Л. М. Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень // *Стоматология*. – 1996. – Спец. Выпуск. – С. 49-50.
13. Левицкий А. П. Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.
14. Патент на корисну модель № 43140. МПК 2009 G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин. Левицький А. П., Деньга О. В., Селіванська І. О. [та ін.]. № у 2008 15092 від 26.12.2008. Опубл. 10.08.2009. Бюл. № 15.
15. Інструкція до набору реактивів для визначення тригліцеридів у сироватці і плазмі крові ензиматичним колориметричним методом / ТУ У 24.4-24607793-020-2003.
16. Холестерин. Ферментативно-фотометрический метод с холестерин-оксидазой (пероксидазой) / РТ МД11-15796482-001:2003.
17. Горячковский А.М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике / А.М. Горячковский – [3-е изд.]. – Одесса: Экология, 2005. – 616 с.
18. Трухачева Н. В. Математическая статистика в медико-биологических исследованиях с применением пакета Statistica / Н. В.

References

1. Mehtiev S. N., Grinkevich V. B., Kravchuk Ju. A. [et al.]. Nonalcoholic fatty liver disease: clinical severity, diagnosis and treatment. *Lechashhij vrach*. 2008; 2: 29-37.
2. Uetake Y., Ikeda H., Irie R. [et al.]. High-salt in addition to high-fat diet may enhance inflammation and fibrosis in liver steatosis induced by oxidative stress and dyslipidemia in mice. *Lipids in Health and Disease*. 2015; 14(6): 1-8.
3. Cani P. D., Bibiloni R., Knauf C. [et al.]. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*. 2008; 57(6): 1470-1481.
4. Egorova E. G. Insulin resistance is the basis of the metabolic syndrome. *Eksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija*. 2007; 1: 8-13.
5. Levitsky A. P., Levchenko E. M., Vasyuk V. L. Hepatoprotective effect of antidysbiotic drugs in the experimental metabolic syndrome. *Zhurnal NAMN Ukrainy*. 2014; 20(4): 478-482.
6. Levitsky A. P., Makarenko O. A., Selivanskaya I. A. [et al.]. Kvertulin. Vitamin P, prebiotik, gepatoprotektor ["Querthulin", Vitamin P, prebiotic, hepatoprotector]. Odessa, KP OGT, 2012: 20.
7. Tkachuk V. V., Velichko V. I., Levchenko E. M. [et al.]. The influence of dysbiosis upon the contents of lipids in blood serum and in liver of rats, kept on highly fat diet. *Odes'kij medicnij zhurnal*. 2014; 2(142): 27-31.
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. 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.
10. 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.
11. Levitsky A. P., Makarenko O. A., Denga O. V. [et al.]. Eksperimentalnye metody issledovaniya stimulyatorov osteogeneza: metodicheskie rekomendatsii [The experimental methods of the study of osteogenesis stimulators]. Kiev, GFK, 2005: 50.
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. Lizotsym vmesto antibiotikov [Lysozyme instead of antibiotics]. Odessa, KP OGT, 2005: 74.
14. 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.
15. The instruction to the set of reagents for the determination of triglycerides in blood serum and plasma with enzymatic colorimetric method / TU U 24.4-24607793-020-2003.
16. Cholesterol. Enzymatic-photometric method with cholesterol-oxidase (peroxidase) / RT MD11-15796482-001:2003.
17. Goryachkovskiy A. M. Klinicheskaya biokhimiya v laboratornoy diagnostike [The clinical biochemistry in laboratorial diagnostics] [3rd ed.]. Odessa, Ekologiya, 2005:616.
18. Truhacheva N. V. Matematicheskaja statistika v mediko-biologicheskikh issledovaniyah s primeneniem paketa Statistica [Mathematical Statistics in biomedical research using application package Statistica]. Moskva, GJeOTAR-Media, 2012: 379.

Работа поступила в редакцию 04.08.2015 года.

Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования