

## АКТИВНОСТЬ ЛИЗОЦИМА В ПЕЧЕНИ И ДИСБИОЗ ТОЛСТОЙ КИШКИ ПОСЛЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АНТИБИОТИКОТЕРАПИИ

© А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, А. В. Майкова, Т. В. Коломийчук, О. Д. Павличенко

*Экспериментальная антибиотикотерапия у крыс вызывает снижение активности антимикробного фактора лизоцима с одновременным увеличением активности уреазы и степени дисбиоза, определенно-го ферментативным методом, в слизистой оболочке толстой кишки, сыворотке крови и печени животных. Полученные результаты позволили предположить, что в развитии дисбиоза после приема антибиотиков определенную роль играет снижение антимикробного фактора лизоцима в печени и толстой кишке*

**Ключевые слова:** антибиотики, лизоцим, уреазы, дисбиоз, сыворотка крови, печень, толстая кишка, крысы

### 1. Введение

Применение антибиотиков снизило смертность от инфекционных заболеваний до ничтожно малых цифр. Воспаление легких, кишечные и другие инфекции, которые сто лет назад уносили миллионы жизней, сегодня лечатся за несколько дней. Но любой прием антибиотиков сопровождается развитием кишечного дисбиоза и гепатотоксическими эффектами. Поскольку современные схемы лечения невозможны без использования антибиотиков, необходимо исследовать механизмы их токсического действия с целью поиска эффективных протекторных средств.

### 2. Литературный обзор

Последствия приема антибактериальных средств могут быть не менее серьезными, чем изначальное заболевание [1]. Американские клиницисты показали, что токсичность антибиотиков стала одной из

причин смерти госпитализированных пациентов. Самое распространенное побочное действие антибиотикотерапии – изменение микробиоценоза кишечника (дисбактериоз или дисбиоз), и, следовательно, нарушение его функций: колонизационной резистентности, антитоксического действия, поддержка оптимального уровня метаболических и ферментативных процессов, иммунного статуса, антимутагенной и антиканцерогенной активности [2, 3]. Дисбиоз характеризуется также транслокацией патогенных представителей микробиоты в несвойственные ей биотопы [4, 5].

К серьезным последствиям антибиотикотерапии нужно также отнести функциональные нарушения печени. Печень занимает центральное место не только в детоксикации ксенобиотиков, но и в системе барьеров для бактериальной транслокации, связывая и обезвреживая патогенные бактерии, сбрасывая их в

желчь или снова в кишечник [6]. В этой связи вызывает интерес один из участников процесса антимикробной функции печени – лизоцим.

Обладая ферментативной активностью по отношению к муреину, входящему в клеточную оболочку бактерий, лизоцим разрушает их, оказывая бактерицидное действие. Он содержится в различных тканях и биологических жидкостях организма, но основным его источником являются гранулоциты и макрофаги [7]. Активный синтез лизоцима осуществляется также нормальной пробиотической микробиотой кишечника. Лизоцим обладает способностью стимулировать фагоцитоз нейтрофилов и макрофагов, повышать синтез антител [8]. Показано, что печень крысы способствует увеличению активности лизоцима в протекающей через нее крови, что свидетельствует о печеночном механизме синтеза этого фактора [9], гепатотоксины подавляют лизоцимсинтезирующую функцию печени [10].

Поскольку антибиотики оказывают дисбиотическое и гепатотоксическое действие, возникла заинтересованность, как влияет антибиотикотерапия на антимикробную функцию печени и микробиоты толстой кишки, в частности активность лизоцима в этих тканях. Также показать, что у лабораторных животных разного возраста и пола дисбиоз возникает не только вследствие бактериостатического действия антибиотиков, но и за счет ослабления антимикроб-

ной функции тканей, в частности, активности лизоцима в печени.

### 3. Цель и задачи исследования

Цель работы – исследовать влияние некоторых современных антибиотиков на активность лизоцима в печени, толстой кишке и сыворотке крови.

Для достижения цели были поставлены задачи:

1. Исследовать степень активности лизоцима в слизистой оболочке толстой кишки, сыворотке крови и печени крысы линии Вистар после курсового введения антибиотиков.

2. Выявить особенности активности уреазы в сыворотке крови и тканях крыс после антибиотикотерапии.

3. Определить расчетный показатель дисбиоза по Левицкому в слизистой оболочке толстой кишки крыс.

4. Провести сравнительный анализ влияния исследуемых антибиотиков на активность лизоцима, уреазы и степени дисбиоза в слизистой оболочке толстой кишки крыс.

### 4. Материалы и методы исследования

Проведены две серии экспериментальных исследований на крысах линии Вистар. В 1 серии использовано 40 самцов месячного возраста средней массой  $40 \pm 4,5$  г, распределенных на 5 равных групп: интактная и 4 группы, получавших различные антибиотики (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика и дозы антибиотиков

Препарат	Группа	Доза, мг/кг	Производитель, страна
1 серия			
Цефикс	Цефалоспорины III поколения	20	«Интернешнл», Иордания
Сумамед	Макролиды-азалиды (азитромицин)	25	«Плива», Хорватия
Амоксиклав	Пенициллин (амоксциллин) + ингибитор $\beta$ -лактамаз (клавулановая кислота)	40	«Сандоз», Швейцария
Линкомицин	Линкозамиды	60	«Дарница», Украина
2 серия			
Омепразол	Ингибитор Н-К-АТФазы	1,33	ПАО «Фармак», Украина
Амоксил-К	Бета-лактамный антибиотик	50	ПАО «Киевмедпрепарат», Украина
Кларитромицин	Макролиды, линкозамиды	7,5	ПАО «Киевмедпрепарат», Украина

Исследования во 2 серии проведены на 18 самцах (10 месяцев, средняя масса 300 г), распределенных на 2 группы: 1-ая – контроль, 2-ая получала антихеликобактерный комплекс, назначаемый при инфицировании *Helicobacter pylori* (омепразол 1,33 мг/кг, амоксил-К 50 мг/кг и кларитромицин 7,5 мг/кг).

Дозировки и продолжительность введения антибиотиков рассчитаны в соответствии с рекомендациями разработчиков. Антибиотики вводили с питьевой водой с учетом дозы и количества потребляемой воды в течение 5 дней в 1 серии и 8 дней во 2 серии. Для этого предварительно в течение 3 дней в каждой сформированной группе крыс фиксировали количество потребленной воды за сутки. Исходя из этого, для каждой крысы рассчитывали дозу антибиотика в потребляемом суточном объеме воды. Вкусовые ка-

чества воды с антибиотиками не влияли на питьевой режим крыс. В эксперименте использовали антибиотики для инъекций в растворимых формах.

Все манипуляции с крысами проводили в щадящем режиме, не подвергая их стрессу и боли [11]. Эвтаназию животных осуществляли под тиопенталовым наркозом (40 мг/кг) через 5 дней после последнего приема антибиотиков путём тотального кровопускания из сердца. Собирали кровь, из которой получали сыворотку, а также выделяли печень и слизистую оболочку толстой кишки. В сыворотке крови, в гомогенатах тканей (50 мг/мл 0,05 М трис-НСl рН 7,6) определяли активность лизоцима по просветлению суспензии субстрата *Micrococcus lysodeikticus* [12] и уреазы по степени гидролиза мочевины до аммиака, количество которого определяли с реактивом

Несслера [13]. По относительным активностям уреазы и лизоцима рассчитывали степень дисбиоза по Левицкому [14]. За относительную активность принимали отношение активности фермента у крыс, получавших антибиотик, к активности фермента в интактной группе. Статистическую обработку полученных результатов осуществляли использованием t-критерия Стьюдента [15].

### 5. Результаты исследования и их обсуждение

Курсовое введение антибиотиков в подавляющем большинстве рассматриваемых случаев привело к существенному снижению активности лизоцима (табл. 2). Так, определение активности лизоцима в печени выявило снижение этого фактора после введения крысам цеффикса ( $p < 0,01$ ), линкомицина ( $p < 0,01$ ) и в наибольшей степени – после использования антихеликобактерного комплекса ( $p < 0,001$ ). После применения

сумамеда отмечена тенденция к снижению этого показателя ( $0,05 < p < 0,1$ ), а курс амоксиклава не повлиял на активность лизоцима в печени ( $p > 0,5$ ).

В слизистой оболочке толстой кишки крыс цеффикс вызвал уменьшение активности лизоцима на 41,1 %, сумамед – на 32,7 %, амоксилав – на 24,3 %, линкомицин – на 46,7 %, комплекс антихеликобактерных препаратов – на 40,4 % (табл. 2).

Экспериментальная антибиотикотерапия способствовала снижению активности лизоцима и в сыворотке крови животных. Применение цеффикса уменьшило этот фактор неспецифической антимикробной защиты крови на 20,0 %. Курс сумамеда и амоксиклава снизил активность лизоцима незначительно, на 12,0 % и 10,7 %, соответственно. В наибольшей степени активность сывороточного лизоцима упала после введения крысам линкомицина – на 30,7 % и антихеликобактерного комплекса – на 25,9 %.

Таблица 2

Активность лизоцима в печени, слизистой оболочке толстой кишки и сыворотке крови крыс после применения антибиотиков

Группы крыс	Печень, ед/кг	Слизистая оболочка толстой кишки, ед/кг	Сыворотка крови, ед/л
1 серия			
Интактная	66±9	107±13	75±3
Цеффикс	36±3 $p < 0,01$	63±6 $p < 0,01$	60±2 $p < 0,001$
Сумамед	46±6 $0,05 < p < 0,1$	72±5 $p < 0,05$	66±4 $p > 0,05$
Амоксилав	71±8 $p > 0,05$	81±7 $p > 0,05$	67±3 $p > 0,05$
Линкомицин	32±5 $p < 0,01$	57±8 $p < 0,01$	52±4 $p < 0,001$
2 серия			
Интактная	104±12	89±7	131±8
Омепразол Амоксил-К Кларитромицин	41±8 $p < 0,001$	53±8 $p < 0,01$	97±4 $p < 0,002$

Примечание:  $p$  – достоверность отличий между показателями в интактной и опытной группах

Подводя итог результатам, представленным в табл. 2, можно заключить о негативном влиянии использованных антибиотиков на лизоцимсинтезирующую функцию печени, слизистой толстой кишки и крови. Логическим следствием снижения активности лизоцима в исследованных объектах является уменьшение степени неспецифической антимикробной защиты, а значит и усиления роста и размножения патогенных бактерий. Это предположение подтвердилось нижеприведенными исследованиями активности уреазы в наблюдаемых биотопах.

Поскольку продукция уреазы является маркером целого ряда микроорганизмов (*Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* и др.), по

уровню её активности можно судить об общей степени контаминации патогенными бактериями биотопа. Как и следовало ожидать, наивысшая активность этого энзима отмечена в слизистой оболочке толстой кишки крыс (табл. 3). В печени животных интактных групп этот показатель в 4,4–8 раз ниже, а в сыворотке крови на четыре порядка меньше, чем в кишечнике.

Введение крысам сумамеда и амоксиклава не привели к существенному изменению активности уреазы в их печени ( $p > 0,1–0,2$ ), тогда как после курса цеффикса, линкомицина этот маркер микробной обсемененности увеличился в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ). Применение комплекса антихеликобактерных препаратов способствовал повышению активности уреазы в печени крыс в 1,8 раза ( $p < 0,001$ , табл. 3).

Таблица 3

Активность уреазы в толстой кишке, сыворотке крови и печени крыс после применения антибиотиков

Группы крыс	Печень, мк-кат/кг	Слизистая оболочка толстой кишки, мк-кат/кг	Сыворотка крови, нкат/л
1 серия			
Интактная	0,48±0,05	2,09±0,41	0,91±0,07
Цефикс	0,75±0,09 p<0,05	3,62±0,35 p<0,02	1,48±0,16 P<0,01
Сумамед	0,65±0,10 p>0,1	3,07±0,29 p<0,05	1,30±0,18 p>0,05
Амоксиклав	0,49±0,05 p>0,2	2,76±0,21 p>0,05	1,08±0,09 p>0,05
Линкомицин	0,76±0,11 p<0,05	4,52±0,37 p<0,001	1,67±0,11 p<0,001
2 серия			
Интактная	0,21±0,02	1,76±0,14	0,74±0,06
Омепразол Амоксил-К Кларитромицин	0,38±0,02 p<0,001	4,05±0,38 p<0,001	1,33±0,09 p<0,001

Примечание: p – достоверность отличий между показателями в интактной и опытной группах

Более значительное увеличение активности уреазы, а значит количества патогенных микробов, после приема антибиотиков отмечено в толстой кишке крыс. Так, цефикс вызвал повышение этого маркера на 73,2 %, сумамед – на 46,9 %, амоксиклав – на 32,1 %, линкомицин – на 116,3 % и антихеликобактерный комплекс – на 130,1 %.

Антибиотикотерапия вызвала одновременное увеличение активности уреазы в сыворотке крови животных. Самое выраженное повышение этого по-

казателя (почти в 2 раза) зарегистрировано после введения крысам линкомицина и антихеликобактерных препаратов (p<0,001). Сумамед и амоксиклав существенно не повлияли на активность сывороточной уреазы (p>0,05, табл. 3).

Степень дисбиоза в слизистой оболочке толстой кишки, рассчитанная по методу А. П. Левицкого, наиболее высокой оказалась после применения линкомицина и антихеликобактерного комплекса препаратов (рис. 1).

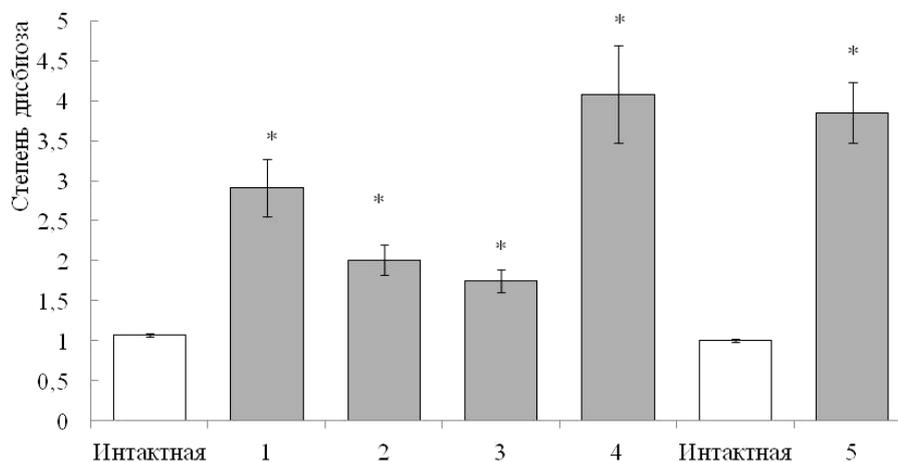


Рис. 1. Степень дисбиоза в слизистой оболочке толстой кишки крыс после антибиотикотерапии: 1 – Цефикс, 2 – Сумамед, 3 – Амоксиклав, 4 – Линкомицин, 5 – Антихеликобактерный комплекс; достоверность рассчитана относительно интактных групп, \* – p<0,001

Значения этого показателя увеличены в 3,8–4,1 раза (p<0,001), что свидетельствует о существенном преобладании патогенной микрофлоры над пробиотической в слизистой оболочке толстой кишки. Минимальное влияние на степень дисбиоза в толстой кишке оказал амоксиклав.

Таким образом, результаты проведенного исследования позволяют предположить, что усиленное раз-

множение патогенной и условно-патогенной микрофлоры в слизистой оболочке толстой кишки, установленное по повышению активности уреазы, может быть следствием ослабления антимикробного фактора лизоцима печени, крови и толстой кишки после проведенной антибиотикотерапии. Это заключение необходимо принимать во внимание при разработке надлежащей профилактики осложнений после приема антибиотиков.

**6. Выводы**

1. Курсовое введение антибиотиков крысам вызывает снижение активности лизоцима в слизи оболочке толстой кишки, сыворотке крови и печени.

2. Вследствие антибиотикотерапии увеличивается активность уреазы, что косвенно свидетельствует о контаминации слизистой оболочки толстой кишки условно-патогенной и патогенной микрофлорой, которая с кровью может поступать в печень.

3. Установленные изменения активности лизоцима и уреазы приводят к увеличению степени

дисбиоза, установленного ферментативным методом, в слизистой оболочке толстой кишки.

4. В наибольшей степени фактор антимикробной защиты лизоцим снижается после применения линкомицина и комплекса антихеликобактерных препаратов, незначительно – после амоксицилина. Активность уреазы и степень дисбиоза более значительно повышается после введения крысам линкомицина и комплекса антихеликобактерных препаратов. Курс амоксицилина, напротив, оказал минимальное влияние на степень дисбиоза в толстой кишке.

**Литература**

1. Бабак, О. Я. Лекарственные поражения печени: вопросы теории и практики [Текст] / О. Я. Бабак // Ліки України. – 2008. – № 118. – С. 96–101.
2. Бондаренко, В. М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией [Текст] / В. М. Бондаренко, А. А. Воробьев // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. – 2004. – № 1. – С. 84–92.
3. Рябиченко, Е. В. Роль кишечной бактериальной аутофлоры и её эндотоксина в патологии человека [Текст] / Е. В. Рябиченко, В. М. Бондаренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии, иммунологии. – 2007. – № 3. – С. 103–111.
4. Wang, X. Endotoxins: structure, function and recognition [Text] / X. Wang, P. Quinn // *Seria: Subcellular Biochemistry*. – 2010. – Vol. 53. – P. 415. doi: 10.1007/978-90-481-9078-2
5. Скрыпкина, И. Н. Роль нарушений микробиоценоза кишечника в патогенезе заболеваний внутренних органов [Текст] / И. Н. Скрыпкина, А. С. Маслова // Ліки України. – 2009. – № 6 (132). – С. 65–71.
6. Левицкий, А. П. Антимикробная функция печени [Текст] / А. П. Левицкий, С. А. Демьяненко, Ю. В. Цисельский. – Одесса: КП «Одесская городская типография», 2011. – 141 с.
7. Клиническая иммунология и аллергология. Т. 1 [Текст] / ред. Л. Йегер. – М.: Медицина, 1990. – 528 с.
8. Вершигора, А. Е. Основы иммунологии [Текст] / А. Е. Вершигора. – К.: Высшая школа, 1980. – 490 с.
9. Савилов, П. Н. Лизоцимобогатяющая функция печени после частичной гепатэктомии и гипербарической оксигенации [Текст] / П. Н. Савилов, С. Я. Дьячкова, Н. И. Кузьмина // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2005. – № 4. – С. 35–39.
10. Туровский, А. В. Влияние различных объемов резекции печени на фоне СС14-гепатита на активность гуморальных факторов естественной резистентности организма [Текст] / А. В. Туровский, С. Я. Дьячкова // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2013. – № 1. – С. 230–234.
11. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe [Text]. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
12. Левицкий, А. П. Лизоцим вместо антибиотиков [Текст] / А. П. Левицкий. – Одесса: КП «Одесская городская типография», 2005. – 74 с.
13. Гаврикова, Л. М. Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области [Текст] / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень // Стоматология. – 1996. – Специальный выпуск. – С. 49–50.
14. Левицкий, А. П. Ферментативный метод определения дисбиоза полости рта для скрининга про- и пребиотиков [Текст]: метод. рек. / А. П. Левицкий, О. А. Макаренко, И. А. Селиванская и др. – К.: ГФЦ, 2007. – 22 с.
15. Сернов, Л. Н. Элементы экспериментальной фармакологии [Текст] / Л. Н. Сернов, В. В. Гацура. – М.: Медицина, 2000. – 352 с.

*Дата надходження рукопису 05.09.2017*

**Левицкий Анатолий Павлович**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАМН Украины, Государственное учреждение «Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Национальной академии медицинских наук Украины», ул. Ришельевская, 11, г. Одесса, Украина, 65026  
E-mail: flavan.ua@gmail.com

**Макаренко Ольга Анатольевна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий кафедрой, кафедра физиологии человека и животных, Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, г. Одесса, Украина, 65082

**Майкова Анна Викторовна**, кандидат биологических наук, доцент, кафедра физиологии человека и животных, Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, г. Одесса, Украина, 65082  
E-mail: a.maikova@onu.edu.ua

**Коломийчук Татьяна Викторовна**, старший преподаватель, кафедра физиологии человека и животных, Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, г. Одесса, Украина, 65082  
E-mail: kolomiichuk.onu@gmail.com

**Павличенко Ольга Дмитриевна**, старший преподаватель, кафедра физиологии человека и животных, Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, г. Одесса, Украина, 65082  
E-mail: o\_pavlichenko12@ukr.net