

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА И МИКРОБИОТА ВВЕДЕНИИ АЦЕТАМИНОФЕНА

Николаева И.В., Островская О.Б., Шейбак В.М.

Гродненский государственный медицинский университет, Беларусь

Актуальность. Ацетаминофен является широко используемым обезболивающим и жаропонижающим препаратом. После всасывания в кишечнике ацетаминофен метаболизируется в гепатоцитах в токсичный метаболит N-ацетил-п-бензохинонимин (NAPQI), который вызывает дисфункцию митохондрий, окислительный стресс и, в конечном итоге, гибель гепатоцитов. Тяжелая гепатотоксичность, возникающая при приеме чрезмерных доз (более 150 мг / кг), является основной причиной острой печеночной недостаточности [1]. В последние годы взаимодействие между печенью и кишечником, называемое «осью кишечник-печень», стало областью интенсивной исследовательской деятельности в отношении нормальной физиологии и заболеваний. Недавние исследования показали, что дисбиоз кишечника и потеря целостности кишечного барьера связаны с транслокацией ассоциированных с микробиотой молекулярных структур, таких как липополисахарид, через воротную вену в печень, где они вызывают воспаление через рецепторы распознавания патогенов [2]. Кроме того, микробиом кишечника может изменить метаболический исход фармацевтических препаратов, токсичных веществ из окружающей среды и тяжелых металлов, тем самым изменяя их фармакокинетику. Прямая химическая модификация ксенобиотиков микробиомом кишечника либо через кишечник, либо повторно поступая в кишечник через энтерогепатическую циркуляцию, может привести к усилению метаболизма или биоактивации, в зависимости от ферментативной активности в микрофлоре [3].

Целью работы явилась оценка характера морфологических и микробиологических изменений в кишечнике при введении животным гепатотоксической дозы ацетаминофена.

Материалы и методы. Эксперименты были выполнены на 24 белых крысах-самцах массой 180-200 г, которые находились на стандартном рационе вивария: 1-я – контрольная группа (n=12) – получала 2% слизь крахмала в желудок, 2-я группа – получала 5-кратно, через день ацетаминофен (Sigma) в дозе 1500 мг/кг массы тела внутривентрикулярно, в 2% растворе крахмала. После декапитации белых-беспородных крыс массой 140-160г, асептически вскрывали брюшную полость брали содержимое толстого кишечника для микробиологического исследования, выделяли микробно-тканевый комплекс толстого кишечника для идентификации свободных аминокислот и их производных методом методом ВЖЭХ с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработку данных – с помощью программы Agilent ChemStation A10.01. Для электронно-микроскопического исследования брали образцы стенки восходящей части ободочной кишки размером около

1 x 2 мм фиксировали 1% раствором четырехокси осмия при +4°C рН 7,4 в течение 2 часов, обезжизивали и заливали в аралдитную смолу. Ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Germany), контрастировали 2% раствором уранилацетата и цитратом свинца по E.S. Reynolds. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Japan). Для получения снимков использовался комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Japan) и программы iTEM (Version 5.0 (Build 1224); SerialNumber A3766900-7E852FAB).

Полученные результаты анализировали с использованием непараметрической статистики по Манну–Уитни (программа Statistica 6.0 для Windows). В описательной статистике для каждого показателя определяли значение Me, 25 и 75 квартилей. Статистически значимыми считали различия между контрольной и опытной группами при значениях $p < 0,05$.

Результаты. Энтеральное поступление в организм ацетаминофена в дозе 1,5 г/кг, 1 раз в день через день – 5 доз) оказывает влияние на просветную микрофлору толстого кишечника, которое характеризуется снижением в фекалиях численности анаэробов, молочнокислых бактерий: бифидобактерий, лактобактерий, повышая содержание банальных анаэробов (клостридий). У 50% животных регистрировали наличие *Proteus vulgaris* в высоких разведениях ($7,4 \pm 0,2$), тогда как в контрольной группе данные микроорганизмы были выявлены только у одного животного в разведении 10^3 . Число эшерихий и других аэробных бактерий достоверно не изменялось, однако изменяются соотношения между основными популяциями микроорганизмов: наблюдается обеднение популяции лактобактерий на 21%, на фоне трехкратного увеличения аэробных микроорганизмов ($p=0,003$), включая эшерихии с нормальной ферментативной активностью и условно-патогенные лактозонегативные энтеробактерии.

Данные электронно-микроскопического исследования у животных получавших ацетаминофен в дозе 1,5 мг/кг массы в вызывает изменения в структуре слизистой восходящей ободочной кишки по сравнению с контрольными животными. Так, на отдельных непротяженных участках поверхностного эпителия наблюдалось снижение высоты и разрежение микроворсинок щеточной каемки столбчатых энтероцитов, в остальном ультраструктура данных клеток существенно не отличалась от контрольной. Повсеместно отмечалось неравномерное наполнение секретом бокаловидных клеток с малой наполненностью большинства из них, нередко в бокаловидных клетках наблюдалась гипертрофия ГрЭР. Это свидетельствует о стимуляции выработки слизистого секрета наряду с усилением его выброса из клеток. В единичных каемчатых энтероцитах крипт присутствовали крупные фагосомы, содержащие разрушенные митохондрии и электронно-плотный материал, что является результатом фагоцитоза эпителиоцитами апоптозных телец, возникающих при гибели соседних клеток. Также в эпителии чаще, чем в контроле, встречались лимфоциты, а в соединительной ткани собственной пластинки отмечалось усиление инфильтрации плазмócитами и лимфоцитами,

встречались активированные макрофаги, содержащие множество лизосом и вторичных фагосом.

Проведенный нами анализ общего содержания свободных аминокислот и их азот-содержащих производных в микробно-тканевом комплексе показал, что курсовое введение ацетаминофена существенно повышает уровни: треонина (в 2,8 раза, $p=0,04$), тирозина (в 1,9 раза, $p=0,003$), валина (в 2,1 раза, $p=0,002$), метионина (в 2,3 раза, $p=0,001$), изолейцина (в 3,0 раза, $p=0,002$), фенилаланина (в 2 раза, $p=0,003$), лейцина (в 2,2 раза, $p=0,003$), лизина (в 2 раза, $p=0,006$), глутамата (в 1,7 раза, $p=0,006$), глутамина (в 1,5 раза, $p=0,03$), аргинина (в 2,6 раза, $p=0,003$), серина (в 1,7 раза, $p=0,005$), глицина (в 1,5 раза, $p=0,005$), аланина (в 2,0 раза, $p=0,002$), таурина (на 1,2 раза, $p=0,02$), цитрулина (на 1,6 раза, $p=0,02$), орнитина (в 3,9 раза, $p=0,008$), гидроксизина (в 1,3 раза, $p=0,006$), 1-метилгистидина (в 3,3 раза, $p=0,004$), α -аминомасляной кислоты (в 3,1 раза, $p=0,03$) при одновременном снижении концентрации (цистеиновой кислоты (в 2,2 раза, $p=0,001$)).

Выводы. Введение гепатоксической дозы ацетаминофена по описанной схеме активирует аминокислотно-белковый обмен в микробно-тканевом комплексе толстого кишечника, что проявляется существенным повышением суммарного количества незаменимых (в 2,1 раза, $p=0,003$) и заменимых аминокислот (на 1,6 раза, $p=0,002$).

Изменение аминокислотного фонда, под действием ацетаминофена, отражается на формировании микробиоценоза толстого кишечника. Несмотря на незначительное изменение титра снижается общее микробное число на 55% ($p=0,002$) в сравнении с контрольной группой. Изменяется соотношение между основными популяциями микроорганизмов: наблюдается обеднение популяции лактобактерий, на фоне трехкратного увеличения аэробных микроорганизмов, включая эшерихии с нормальной ферментативной активностью и условно-патогенные лактозонегативные энтеробактерии.

Анализ электронно-микроскопических препаратов толстого кишечника показал, что энтеральное поступление ацетаминофена вызывает усиление образования и выделения слизи бокаловидными клетками, частичную атрофию щеточной каемки столбчатых энтероцитов, стимуляцию апоптозной гибели эпителиальных клеток и воспалительную реакцию в слизистой оболочке восходящей ободочной кишки.

Литература

1. Schneider K M Intestinal Dysbiosis Amplifies Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury/ K M Schneider et al // Cell Mol Gastroenterol Hepatol. – 2021 – Vol. 11 – № 4. – P. 909–933.
2. Gong Sh. Gut microbiota mediates diurnal variation of acetaminophen induced acute liver injury in mice / Sh. Gong et al // J. Hepatol. – 2018 – Vol. 69 . – № 1. – P. 51–59.
3. Collins S.L., Patterson A.D. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism //Acta Pharm Sin B. 2020 – Vol. 10. – № 1. – P. 19–32.