



Влияние ацетаминофена на структурно-функциональное состояние толстого кишечника и кишечной микрофлоры

И. В. Николаева, В. М. Шейбак, О. Б. Островская, С. А. Островцова

Гродненский государственный медицинский университет, г. Гродно, Беларусь

Резюме

Цель исследования. Оценить состояние микробно-тканевого комплекса толстого кишечника при поступлении в организм животных гепатоксических концентраций ацетаминофена.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 24 белых беспородных крысах массой тела 180–220 г, которые были разделены на три группы. Контрольная группа получала энтерально 2 % раствор крахмала; первой опытной группе пятикратно, через день вводили ацетаминофен в растворе крахмала в дозе 1500 мг/кг массы тела; второй опытной группе таким же способом вводили ацетаминофен в дозе 2500 мг/кг массы тела. В предварительно замороженных при –70 °С образцах микробно-тканевого комплекса (МТК) толстого отдела кишечника методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли свободные аминокислоты и их азотсодержащие метаболиты. Для микробиологического исследования выделенный в асептических условиях МТК немедленно отправлялся в микробиологическую лабораторию для определения содержания основных представителей кишечной микрофлоры. Образцы стенки восходящей части ободочной кишки подвергались гистологическому и электронно-микроскопическому исследованию. Гепатотоксическое действие ацетаминофена оценивали путем определения активности ферментов и содержания общего билирубина в плазме крови.

Результаты. Энтеральное введение крысам гепатотоксических количеств ацетаминофена повышает концентрации свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в микробно-тканевом комплексе толстого кишечника. Одновременно существенно увеличиваются концентрации незаменимых аминокислот. Показаны морфологические изменения в клетках эпителия толстого кишечника и структуры митохондрий.

Заключение. Токсические дозы ацетаминофена оказывают существенное влияние на показатели микробно-тканевого комплекса толстого кишечника. Имеет место изменение биохимических параметров аминокислотного обмена: повышение уровней заменимых аминокислот и изменения со стороны колоноцитов (размер и форма митохондрий, высота щеточной каемки, объем бокаловидных клеток), что указывает на снижение возможности клеток использовать аминокислоты для поддержки функционирования цикла Кребса. Это подтверждают и существенно повышенные концентрации незаменимых аминокислот, которые используются, главным образом, для синтеза белков. Возникающий под влиянием ацетаминофена дисбиоз вносит дополнительный вклад в поражение толстого кишечника. Негативное влияние ацетаминофена подтверждается обнаруженными нами дозозависимыми изменениями со стороны микробно-тканевого комплекса.

Ключевые слова: ацетаминофен, свободные аминокислоты, азотсодержащие метаболиты, толстый кишечник, микробно-тканевой комплекс, печень, микрофлора

Вклад авторов. Николаева И.В.: проведение эксперимента, сбор материала, статистическая обработка полученных данных, анализ полученных данных, подготовка текста; Шейбак В.М.: разработка концепции и дизайна исследования, анализ полученных данных, редактирование; Островская О.Б.: подготовка препаратов и выполнение гистологического и электронно-микроскопического исследований; Островцова С.А.: анализ данных микробиологического исследования, литературных данных по теме статьи.

Благодарность. Благодарим сотрудников НИЛ НИЧ ГрГМУ: к.б.н., ведущего научного сотрудника Е.М. Дорошенко и к.б.н., старшего научного сотрудника В.Ю. Смирнова за техническую помощь в хроматографическом определении свободных аминокислот в микробно-тканевом комплексе толстого кишечника.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. Исследование проводилось без финансовой поддержки.

Для цитирования: Николаева И.В., Шейбак В.М., Островская О.Б., Островцова С.А. Влияние ацетаминофена на структурно-функциональное состояние толстого кишечника и кишечной микрофлоры. *Проблемы здоровья и экологии.* 2023;20(2):78–87. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-2-11>

The effect of acetaminophen on the structural and functional state of the large intestine and intestinal microflora

Irina V. Nikolayeva, Vladimir M. Sheibak, Aksana B. Astrowskaja, Sviatlana A. Astrautsova

Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

Abstract

Objective. To assess the condition of the microbial-tissue complex of the large intestine when hepatotoxic concentrations of acetaminophen are administered to the body of animals.

Materials and methods. The experiments were performed on 24 white outbred rats weighing 180–220 g, which were divided into three groups. The control group received 2% starch solution enterally, the first experimental group was enterally administered with acetaminophen in starch solution at a dose of 1500 mg per kilogram of body weight, five times a day with one day interval; and the second experimental group was administered with acetaminophen at a dose of 2500 mg per kilogram of body weight the same way. Free amino acids and their nitrogen-containing metabolites were determined by high-performance liquid chromatography in samples of the microbial-tissue complex (MTC) of the large intestine previously frozen at -70 °C. For microbiological study, the aseptically isolated MTC was immediately sent to a microbiological laboratory for identification of the content of the main representatives of the intestinal microflora. Samples of the wall of the ascending colon were subjected to histological and electron microscopic examination. The hepatotoxic effect of acetaminophen was evaluated by registering the activity of enzymes and the content of total bilirubin in blood plasma.

Results. Enteral administration of hepatotoxic amounts of acetaminophen to rats increases the concentrations of free amino acids and their nitrogen-containing derivatives in the microbial-tissue complex of the large intestine. At the same time, the concentrations of essential amino acids are significantly increased. Morphological changes in the cells of the epithelium of the large intestine and the structure of mitochondria have been shown.

Conclusions. Toxic doses of acetaminophen have a significant impact on the indicators of the microbial-tissue complex of the large intestine. There are changes in biochemical parameters of amino acid metabolism: increased levels of substitutable amino acids and changes in the colonocytes (size and shape of mitochondria, the height of the brush border, the volume of the goblet cells), indicating decreased ability of the cells to use amino acids to support the functioning of the Krebs cycle. This is also confirmed by significantly increased concentrations of essential amino acids, which are mainly used for protein synthesis. The dysbiosis caused by acetaminophen further contributes to the damage to the large intestine. The negative effect of acetaminophen is confirmed by the dose-dependent changes we found in the microbial-tissue complex.

Keywords: acetaminophen, free amino acids, nitrogen-containing metabolites, large intestine, microbial tissue complex, liver, microflora

Author contributions. Nikolayeva I.V.: conduction of the experiment, collection of the experimental material, statistical processing of the data obtained, analysis of the data obtained, writing; Sheibak V.M.: development of the concept and design of the study, analysis of the obtained data, editing the text; Astrowskaja A.B.: preparation of the samples and performing histological and electron microscopic studies; Astrautsova S.A.: analysis of microbiological research data and the data of literature on the topic of the paper.

Gratitudes. We thank the staff of the Research Laboratory of the Research Unit of the GrSMU: E.M. Doroshenko, Ph.D. (Biology), Leading Researcher and Senior Researcher, Ph.D. (Biology) V.Yu. Smirnov for technical assistance in the chromatographic analysis of the free amino acids in the microbial tissue complex of the large intestine.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. Study was conducted without sponsorship.

For citation: Nikolayeva IV, Sheibak VM, Astrowskaja AB, Astrautsova SA. The effect of acetaminophen on the structural and functional state of the large intestine and intestinal microflora. *Health and Ecology Issues*. 2023;20(2):78–87. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-2-11>

Введение

Ацетаминофен (англ. *N-acetyl-p-aminophenol*, APAP) является широко используемым анальгетиком-антипиретиком, включенным в список важнейших лекарственных средств, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения в качестве препаратов первой линии при легкой

или умеренной боли. Длительное время считалось, что данный препарат лишен побочных реакций, характерных для других нестероидных противовоспалительных средств, а его анальгезирующее действие сопоставимо с эффектом аспирина [1].

Как правило, при использовании в терапевтических дозах: 1–2 г/сут ацетаминофен не вызывает серьезных побочных реакций, быстро абсорбируется из желудочно-кишечного тракта, через 20–30 минут достигает максимальной концентрации в крови и метаболизируется в печени в неактивные формы. Подавляющая часть полученной дозы препарата взаимодействует с глюкуроновой кислотой, образуя неактивный глюкуронид либо, связываясь с серной кислотой в процессе сульфатирования, переводится в сульфат. Образовавшиеся в результате этих процессов неактивные производные выводятся из организма с желчью и мочой. Оставшаяся часть препарата детоксицируется изоферментами цитохрома P450 CYP-2E1 и CYP-3A4 (англ. *cytochrome* P450 2E1 и *cytochrome* P450 3A4) до N-ацетил-p-бензохинонимина (англ. *N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI*) — токсичного побочного продукта, который выводится из организма путем конъюгации с печеночным глутатионом (англ. *reduced glutathione, GSH*) [2, 3]. Однако прием высоких доз препарата (значительно выше 4 г/сут) нарушает процессы его детоксификации, приводит к дефициту глутатиона, вследствие чего реактивный метаболит NAPQI накапливается в гепатоцитах, где связывается с нуклеофильными группами печеночных белков, что приводит в итоге к митохондриальной дисфункции и, как следствие, к некрозу ткани печени и развитию острой печеночной недостаточности [4]. Таким образом, гепатотоксическое действие APAP непосредственно связано не с самим препаратом, а с его нестабильным высокоактивным метаболитом и усугубляется в случае истощения запасов глутатиона в печени [5].

Медикаментозное повреждение печени, вызванное передозировкой либо злоупотреблением ацетаминофеном, является основной причиной острой печеночной недостаточности. Отмечается, что прием максимальной дозы препарата даже в течение пяти дней у здоровых взрослых пациентов существенно повышает уровень сывороточных трансаминаз [4]. Помимо печени основными органами, участвующими в метаболизме ацетаминофена, являются кишечник и почки [6]. Например, ряд исследований, выполненных с использованием лабораторных моделей, в которых воспроизводятся патологические изменения в тканях кишечника, индуцированные действием токсических доз APAP, позволил выявить у лабораторного животного нарушения целостности структуры кишечника, сопровождающиеся повышением его проницаемости [7]. Отмечается также, что в печени при этом наблюдаются как процессы апоптоза, так и массивного некроза, которые происходят независимо друг от друга и

отделены временным интервалом от патологических процессов в кишечнике.

Между колониями микроорганизмов и подлежащими структурами (продуцируемыми ими экзополисахаридами, слизию, гликокаликсом, эпителиальными клетками и клетками стромы слизистой оболочки) имеется тесная структурная и функциональная взаимосвязь, которая позволяет объединить их в единый морфо-функциональным элемент — микробно-тканевой комплекс кишечника, играющий ключевую роль в реализации механизмов адаптации и гомеостаза [8–9]. Помимо микробиома кишечника важная составляющая микробно-тканевого комплекса принадлежит основным клеткам — энтероцитам. Их структурные и биохимические параметры будут оказывать воздействие как на гомеостатические параметры всего организма, так и на состав комменсальной микрофлоры. Нарушения функционального состояния кишечника, сопутствующие интоксикации ацетаминофеном, могут играть критическую роль в развитии поражения печени. Такая опосредованная гепатотоксичность может быть вызвана несбалансированным гомеостазом микрофлоры кишечника, повреждением кишечного барьера и активацией процессов воспаления [5, 10]. Токсичные продукты микробного происхождения, попадая из кишечника в печень, распознаются толл-подобными рецепторами (TLR), что, как следствие, может индуцировать воспалительную реакцию, сопровождающуюся прямой гибелью или хроническим повреждением гепатоцитов [10].

Цель исследования

Оценить состояние микробно-тканевого комплекса толстого кишечника при поступлении в организм животных гепатотоксических концентраций ацетаминофена.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на 24 белых беспородных крысах массой тела 180–220 г, которые были разделены на три группы по 8 особей в каждой. Контрольная группа получала энтерально 2 % раствор крахмала; первой опытной группе пятикратно, через день вводили ацетаминофен в растворе крахмала в дозе 1500 мг/кг массы тела; второй опытной группе таким же способом вводили ацетаминофен в дозе 2500 мг/кг массы тела. Все опыты проведены с учетом «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На данное исследование получено разрешение Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета. В предварительно замороженных

при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ образцах МТК толстого отдела кишечника методом обращеннофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) определяли свободные аминокислоты и их азотсодержащие метаболиты. Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработку данных — с помощью программы Agilent ChemStation A10.01.

Для микробиологического исследования выделенный в асептических условиях образец немедленно отправлялся в микробиологическую лабораторию для определения содержания основных представителей кишечной микрофлоры. Для комплексного изучения аэробной и анаэробной микрофлоры по 0,1 мл из каждого разведения засеивали на питательные среды (трехкратно). В работе использованы эндо-агар (Fluka) — для бактерий группы кишечной палочки (БГКП) с нормальной ферментативной активностью и условно-патогенных лактозанегативных энтеробактерий, пластинчатый МПА (Conda pronadisa) — для определения аэробной флоры, Рагоза-агар (Fluka) — для лактобактерий, RCM (OXOID) — для общего числа анаэробов, в том числе молочнокислых (бифидобактерии); высокий столбик сахарного МПА — для спорообразующих анаэробов (клостридии) и оценки уровня микрофлоры с выраженным газообразованием. Посевы культивировали в течение 24–72 ч при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, выделенные микроорганизмы идентифицировали по культуральным, морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Подсчет каждой группы микроорганизмов в 1 грамме фекалий проводили по формуле:

$$M = N \times 10^{n+1},$$

где M — число микроорганизмов в 1 грамме,

N — количество колоний, выросших на поверхности пластинчатого агара и в глубине высокого столбика,

n — степень разведения материала.

Окончательный результат количественного содержания бактерий в грамме образца выражали как \lg КОЕ/г. Среднее значение, полученное из образцов, взятого от одного животного, использовали для расчета статистических показателей в группе.

Образцы стенки восходящей части ободочной кишки подвергались гистологическому и электронно-микроскопическому исследованию. Для выявления гистохимических изменений в стенке толстого кишечника срезы толщиной 10 мкм окрашивали по Шабдашу (для обнаружения нейтральных мукополисахаридов) и альциановым синим 2,5 % (для обнаружения сия-

лomuцина). Для электронно-микроскопического исследования ультратонкие срезы изготавливали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Germany), контрастировали 2 % раствором уранилацетата и цитратом свинца по E.S. Reynolds [10]. Препараты изучали в электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Japan). Для получения снимков использовали комплекс из цифровой камеры Olympus Mega View III (Japan) и программы iTEM (Version 5.0 (Build 1224); SerialNumber A3766900-7E852FAB).

Гепатотоксическое действие ацетаминофена оценивали путем определения активности ферментов, содержания общего билирубина, белка глюкозы и триглицеридов в плазме крови.

Полученные результаты анализировали с использованием параметрической статистики (t-критерий Стьюдента, программа «Statistica», 10.0 для Windows). Статистически значимыми считали различия между контрольной и опытной группами при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Гепатотоксичность введенных доз ацетаминофена (1,5 и 2,5 г/кг массы тела) подтверждалась повышением активности аланинаминотрансферазы (на 68 и 89 % соответственно в сравнении с контрольной группой) и количества общего билирубина (в 1,7 раза) на фоне снижения концентрации общего белка (на 7 %). У животных, получавших более высокую дозу ацетаминофена, отмечено повышение активности лактатдегидрогеназы (на 24 %) и количества триглицеридов (на 71 %) при одновременном снижении концентрации глюкозы (на 14 %).

Введение ацетаминофена приводило к снижению в муциновом слое численности молочнокислых бактерий: бифидобактерий (на 10 %), лактобактерий (на 5–6 %) — на фоне повышенного содержания аэробных микроорганизмов (на 35 %) в основном за счет БГКП: со сниженной ферментативной активностью (на 27 и 50 % — в первой и второй опытных группах), с нормальной ферментативной активностью (на 12 и 25 % соответственно). У 100 % животных регистрировали наличие *Proteus vulgaris* в концентрациях 10^7 КОЕ/г, при введении более высокой дозы (2,5 г/кг) — в количестве 10^8 КОЕ/г, тогда как в контрольной группе данные микроорганизмы были выявлены только у 14 % в концентрации ниже 10^5 КОЕ/г. Помимо количественных выявлены также качественные изменения микробиоценоза — изменялись соотношения между основными популяциями микроорганизмов: анаэробы/аэробы (на 29 и 23 % по отношению к контрольной и первой опытной группе). Титр газообразующих

микроорганизмов (кlostридии, бактериоиды, эшерихии, протеи) также возрастает (10^7 и 10^8 соответственно относительно контрольных 10^6) (таблица 1).

Таблица 1. Изменения пристеночной микрофлоры толстого кишечника крыс при внутрижелудочном введении ацетаминофена

Table 1. Changes in the wall microflora of the large intestine of rats with intragastric administration of acetaminophen

Исследуемый показатель	Содержание живых бактерий в микробно-тканевом комплексе, lgКОЕ/г, (M ± m)		
	контроль	ацетаминофен 1,5 г/кг	ацетаминофен 2,5 г/кг
Общее микробное число	10,9 ± 0,24	11,0 ± 0,37	10,6 ± 0,24
Бифидобактерии (по наличию в мазке из соответствующего разведения)	9,8 ± 0,18	8,8 ± 0,24*	9,1 ± 0,37
Лактобактерии	9,4 ± 0,04	8,9 ± 0,17*	8,8 ± 0,12*#
Общее количество спорообразующих анаэробов (кlostридии)	9,1 ± 0,14	9,1 ± 0,16	10,0 ± 0,19*#
Общее число аэробов	7,7 ± 0,14	8,4 ± 0,35*	10,4 ± 0,19*#
БГКП (лактозапозитивные)	6,9 ± 0,29	7,7 ± 0,10*	8,6 ± 0,26*#
БГКП (лактозанегативные)	5,5 ± 0,53	7,0 ± 0,30*	#8,2 ± 0,34*
Соотношение анаэробы/аэробы	1,4 ± 0,03	1,3 ± 0,08	1,0 ± 0,02*#
Соотношение анаэробы/бифидобактерии	1,1 ± 0,02	1,2 ± 0,01*	1,2 ± 0,03*
Титр газообразующих микроорганизмов	10^6 у 43 % животных	10^{7*} у 67 % животных	10^{8*} у 100 % животных
Титр <i>Proteus vulgaris</i>	10^5 у 14 % животных	10^{8*} у 100 % животных	10^{8*} у 100 % животных

* Статистически значимые различия относительно контрольных значений.

Статистически значимые различия в сравнении с первой опытной группой животных ($p < 0,05$).

Гистологический анализ препаратов восходящего отдела ободочной кишки показал, что в контрольной и в опытных группах не наблюдалось существенных изменений в собственно слизистой оболочке, кровеносных сосудах и мышечном слое стенки толстой кишки. Основные изменения после введения ацетаминофена были связаны с нарушением слизеобразующей функции слизистой, что выражалось в уменьшении числа и наполненности бокаловидных клеток крипт. Наполненность бокаловидных клеток содержимым и толщина слоя слизи на поверхности крипт (в ШИК-реакции) составили в контрольной группе 50–60 %, а в первой и второй опытных группах — 40–45 % и 25–30 % соответственно) (рисунок 1).

Содержание сиаломуцинов в бокаловидных клетках снижалось по сравнению с контрольной группой (рисунок 2). При этом в кишечнике животных из опытных групп не регистрировалось существенных различий в наполненности и/или количестве бокаловидных клеток.

В контрольной группе животных, среди клеток однослойного эпителия слизистой оболочки восходящей ободочной толстой кишки, количественно преобладали столбчатые энте-

роциты, имеющие щеточную каемку, высота которой несколько уменьшалась в направлении от поверхностного эпителия к основанию крипт. В цитоплазме каемчатых энтероцитов выявлялись митохондрии (преимущественно овальной формы, часто удлинненные), развитый комплекс Гольджи (КГ), многочисленные профили гранулярного эндоплазматического ретикулума (ГрЭР). Бокаловидные клетки были умеренно наполнены секреторными гранулами, средняя площадь бокаловидных клеток контрольной группы составляла $56,3 \pm 5,15$ мкм². Изредка встречались интраэпителиальные лимфоциты.

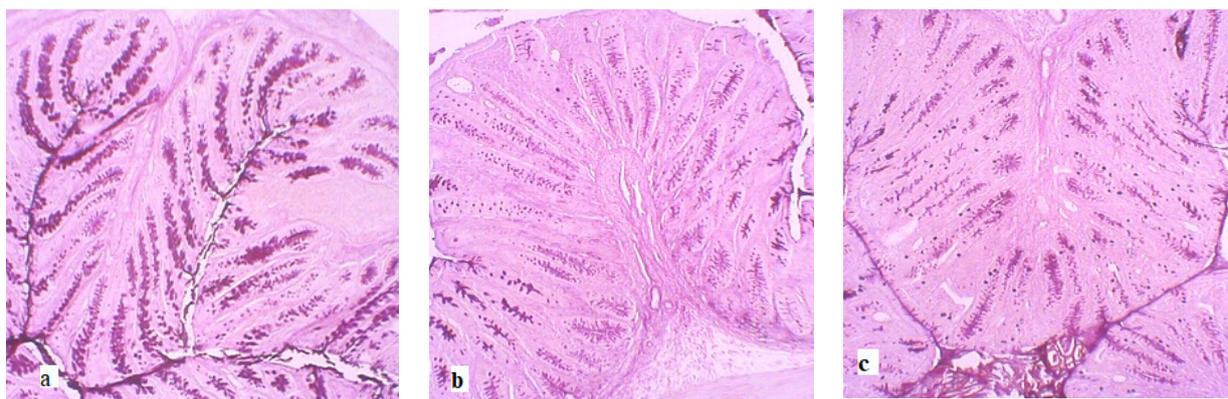


Рисунок 1. Содержание гликопротеинов в бокаловидных клетках крипт восходящей кишки крыс: a — контроль; b — ацетаминофен 1500 мг/кг; c — ацетаминофен 2500 мг/кг.

Окраска по Шабдашу. Увеличение: $\times 4$

Figure 1. The content of glycoproteins in the goblet cells of the crypts of the ascending intestine of rats a — control; b — acetaminophen 1500 mg/kg; c — acetaminophen 2500 mg/kg.

Shabadash coloring. Magn. $\times 4$

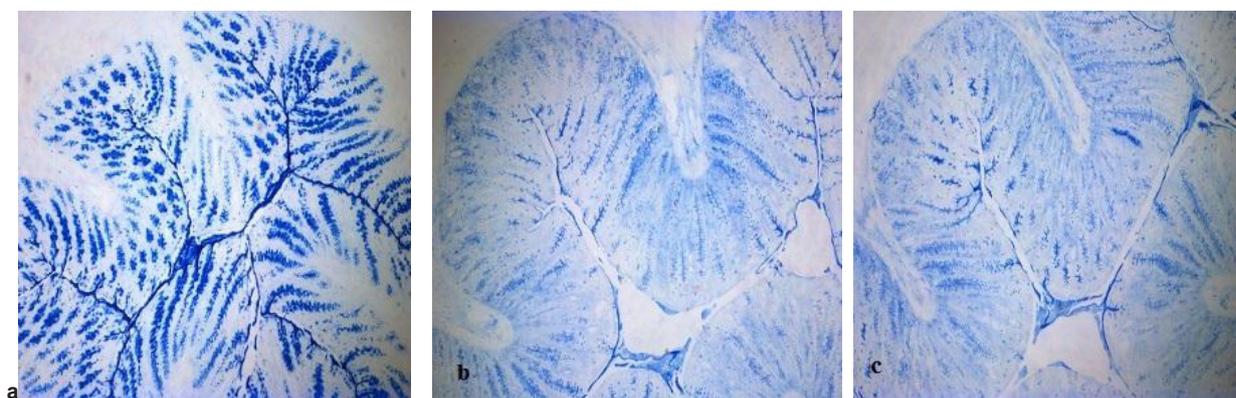


Рисунок 2. Содержание сиаломуцинов в структурах восходящей кишки крыс: a — контроль; b — ацетаминофен 1500 мг/кг; c — ацетаминофен 2500 мг/кг.

Окраска альциановым синим. Увеличение: $\times 4$

Figure 2. The content of sialomucins in the structures of the ascending intestine of rats

a — control; b — acetaminophen 1500 mg/kg; c — acetaminophen 2500 mg/kg. Stained with alcian blue, Magn. $\times 4$

У крыс, получавших ацетаминофен в дозах 1,5 и 2,5 г/кг массы тела, на отдельных непотяженных участках поверхностного эпителия наблюдалось снижение высоты, а также разрежение микроворсинок щеточной каемки столбчатых энтеритов. Количество ресничек на 1 мкм среза поверхности кишки в первой опытной группе было ниже контроля на 25 %, во второй — на 19 %. Высота микроворсинок щеточной каемки достоверно снижалась только при введении животным ацетаминофена в более высокой дозе относительно контрольной и первой опытной группы (на 25 %) (рисунок 3).

Отмечалось неравномерное наполнение секретом большинства бокаловидных клеток, средняя площадь бокаловидных клеток достоверно снижалась в опытных группах (на 53 и 37 % соответственно).

Повсеместно в единичных каемчатых энтероцитах крипт присутствовали крупные фагосомы, содержащие разрушенные митохондрии и электронно-плотный материал. Наблюдалась тенденция к увеличению среднего периметра митохондрий в обеих опытных группах (на 6 %). Средняя площадь сечения митохондрий не изменялась.

В эпителии толстого кишечника животных второй группы чаще, чем в контроле, встречались лимфоциты, а в соединительной ткани собственной пластинки отмечалось усиление инфильтрации плазмоцидами и лимфоцитами, встречались активированные макрофаги, содержащие множество лизосом и вторичных фагосом.

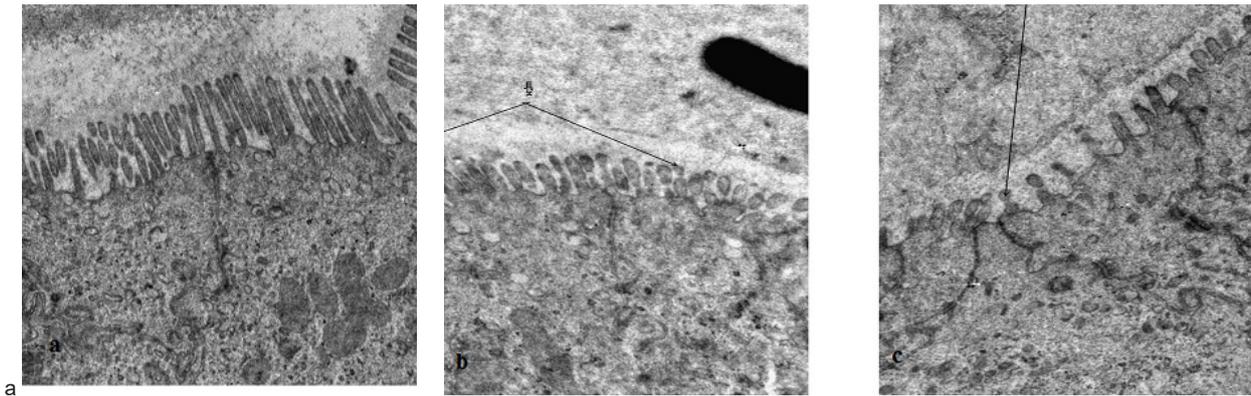


Рисунок 3. Электронные микрофотографии щеточной каемки (щ.к.) энтероцитов восходящего отдела ободочной кишки: а — контроль; б — ацетаминофен 1500 мг/кг; с — ацетаминофен 2500 мг/кг. Увеличение $\times 20000$
Figure 3. Electron micrographs of the brush border (b.k.) of enterocytes of the ascending colon: a — control; b — acetaminophen 1500 mg/kg; c — acetaminophen 2500 mg/kg. Magn. $\times 20000$

Одним из значимых компонентов метаболизма микробно-тканевого комплекса являются концентрации свободных аминокислот и азотсодержащих соединений. Анализ фонда свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в микробно-тканевом комплексе толстого кишечника показал, что внутрижелудочное введение ацетаминофена повышает суммарное количество аминокислот и азотсодержащих метаболитов (приблизительно в 1,5 раза) в обеих опытных группах. Различия в их содержании обусловлены более высокими концентрациями протеиногенных аминокислот (в 1,9 и 1,6 раза соответственно). Введение ацетаминофена в дозе 1,5 г/кг повышает суммарное количество заменимых (в 1,8 раза) и незаменимых (в 2,1 раза) аминокислот. Выше контрольных значений (в 2,3 раза) была сумма аминокислот с разветвленной углеродной цепью, при этом изолейцина — в 2,6 раза, валина и лейцина — в 2,2 раза (рисунок 4). Среди незаменимых аминокислот возросло количество треонина (в 2,5 раза), метионина (в 2,2 раза), тирозина и фенилаланина (в 1,9 раза), лизина (в 2,1 раза). Это указывает на невозможность энтероцитов утилизировать незаменимые аминокислоты, которые используются, главным образом, для синтеза белков.

Увеличение концентрации аргинина (в 2,3 раза) (рисунок 4) может оказывать воздействие на кишечный барьер за счет снижения трансэпителиальной проницаемости [12]. Колоноциты могут использовать L-аргинин в качестве предшественника для синтеза оксида азота (NO), а также для синтеза полиаминов через стадию образования L-орнитина и мочевины, а затем превращения L-орнитина в путресцин, спермидин и спермин. Таким образом, метаболизм аргинина в оксид азота и полиамины обеспечивает контроль клеточной пролиферации. При этом оксид азота является

сильным ингибитором орнитиндекарбоксилазы в эпителиальных клетках ободочной кишки [12, 13]. Повышение уровня аргинина свидетельствует о блокаде этих метаболических превращений. Накопление глюконеогенных аминокислот аланина (в 2,0 раза), глутамина (в 1,7 раза), глутамата (в 1,5 раза), глицина (в 1,6 раза) свидетельствует о нарушении энергетики эпителиоцитов кишечника [14].

Общее количество азотсодержащих производных аминокислот достоверно не изменилось, однако значимо увеличилось содержание орнитина (в 3,5 раза), 1-метилгистидина и α -аминомасляной кислоты (в 3,7 раза), цитруллина (в 1,9 раза), фосфоэтаноламина (в 1,7 раза), гидроксипролина (в 1,5 раза), таурина (в 1,3 раза). Отвлечение метаболизма аминокислот на путь катаболизма и обеспечения клеток биологически значимыми соединениями снижает возможности биосинтеза белка и, вероятно, тормозит процессы пролиферации. Ниже, чем в контроле, регистрировалась концентрация цистеиновой кислоты (на 54 %), что, вероятно, обусловлено ее быстрым метаболизмом в другие серосодержащие соединения.

У крыс, получавших более высокую дозу ацетаминофена (2,5 г/кг), сохранялись наблюдаемые в предыдущей группе основные сдвиги аминокислотного фонда в микробно-тканевом комплексе. Однако в сравнении с первой опытной группой выше было содержание триптофана (в 1,5 раза), лизина (в 1,8 раза), последний в большом количестве синтезируется микробиотой и обеспечивает от 10 до 100 % суточной потребности в лизине [15]. Клетки кишечника в существенных количествах метаболизируют триптофан пищи в кинуренин и его производные: 5-гидрокситриптофан (серотонин) и триптамин, а накопление свободной аминокислоты может указывать на относительный дефицит ферментативных мощностей [16].

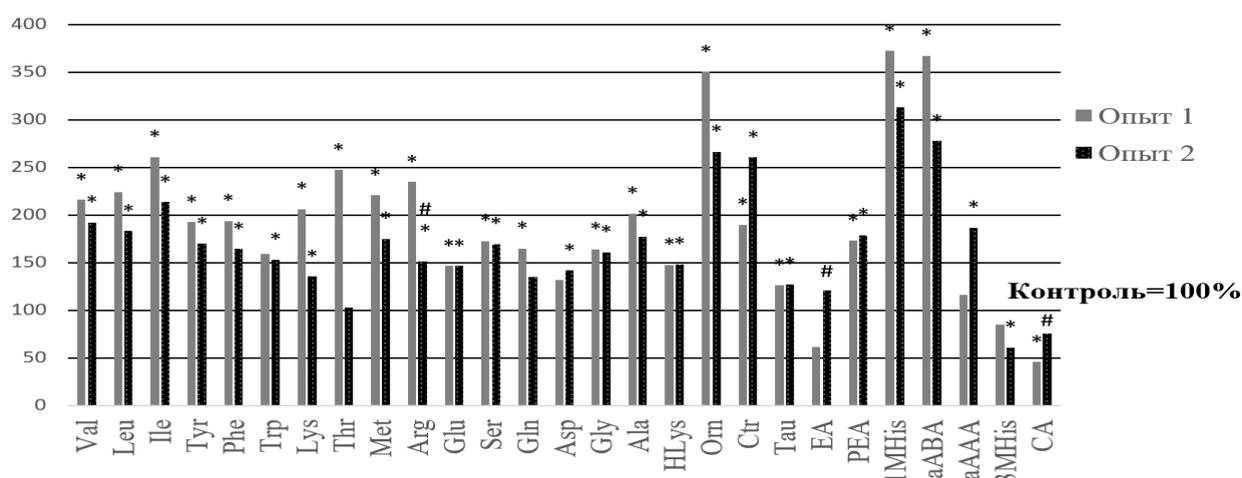


Рисунок 4. Изменения концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в микробно-тканевом комплексе толстого кишечника крыс при введении ацетаминофена относительно контрольных значений (контроль 100 %). Приведены только статистически значимые различия:

* — статистически значимые различия относительно контрольных значений;

— статистически значимые различия в сравнении с первой опытной группой животных ($p < 0,05$)

Figure 4. Changes in the concentrations of essential amino acids and nitrogen-containing metabolites in the microbial-tissue complex of the large intestine of rats with the introduction of acetaminophen, relative to control values (100% control).

Only statistically significant differences are shown.

Note: * — statistically significant differences relative to control values;

— statistically significant differences compared with the first experimental group of animals ($p < 0.05$)

Среди заменимых аминокислот увеличивались уровни аспартата и глутамата (в 1,4 и 1,5 раза соответственно), глицина, серина и аланина (в 1,6, 1,7 и 1,8 раза). Количество аргинина в сравнении с контрольными значениями было выше в 1,5 раза, однако по отношению к первой опытной группе снижалось (на 36 %). Избыток данных аминокислот в микробно-тканевом комплексе привело к повышению индекса заменимые/незаменимые аминокислоты (на 20 %), что, вероятно, также указывает на их недостаточную утилизацию в реакциях образования структурных и секреторных компонентов — клеток и муцина.

Анализ азотсодержащих производных и метаболитов в сравнении с контрольной группой показал увеличение суммы азотсодержащих метаболитов (в 1,3 раза) за счет повышения количества цистеиновой кислоты и этаноламина (в 1,7 и 1,9 раза соответственно), 1-метилгистидина (в 3,1 раза), α -аминомасляной кислоты (в 2,8 раза), α -аминоадипиновой кислоты (в 2,8 раза), орнитина (в 2,7 раза), цитруллина (в 2,6 раза), гидроксипролина (в 1,5 раза), таурина (в 1,3 раза), что привело к снижению индекса протеиногенные аминокислоты/азотсодержащие производные (на 24 %).

Заключение

Энтеральное введение крысам гепатотоксических количеств ацетаминофена приводит к накоплению свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в микробно-тканевом

комплексе толстого кишечника. Высокие уровни заменимых аминокислот могут объясняться снижением функциональных возможностей митохондрий колоноцитов и неспособностью использовать эти аминокислоты не только как структурные единицы в синтезе белков и пептидов, но и как анаэробные субстраты в энергетическом обмене. Это предположение подтверждает и существенное повышение концентраций незаменимых аминокислот, которые используются, главным образом, для синтеза белков.

Оценка изменений микробной составляющей МТК толстого кишечника показала наличие выраженных количественных и качественных изменений пристеночного микробиоценоза. Выявлено снижение в муциновом слое численности анаэробных молочнокислых бактерий: бифидобактерий и лактобактерий — на фоне повышенного содержания аэробных условно-патогенных микроорганизмов, в основном за счет БГКП. У 100 % животных опытных групп регистрировалось повышение титра *Proteus vulgaris* и газообразующей флоры. Морфологические изменения, развивающиеся в клетках эпителия толстого кишечника, приводят, вероятно, к нарушению не только процессов абсорбции синтезируемых микроорганизмами нутриентов, но и снижают метаболические возможности самих клеток.

Снижение толщины муцинового слоя приводит к ослаблению анаэробного компонента, что способствует инвазии микроорганизмов и раз-

витию воспалительных процессов толстого кишечника. Показана дозозависимость изменений морфо-функциональной структуры толстого кишечника при поступлении в организм животных различных количеств ацетаминофена. Результаты этого исследования демонстрируют возмож-

ность использования изменений концентраций свободных аминокислот и их азотсодержащих производных в качестве маркеров для лабораторной диагностики дисбиотических и воспалительных процессов в толстом кишечнике.

Список литературы / References

1. Sheehan WJ, Mauger DT, Paul Ian M, Moy JN, Boehmer SJ, Szefer SJ, Fitzpatrick AM, et al. Acetaminophen versus ibuprofen in young children with mild persistent asthma. *N Engl J Med N*. 2016;375(7):619-630. DOI: <https://doi.org/10.1056%2FNEJMoa1515990>
2. Van Rongen AA, Väilitalo PAJ, Peeters MYM, Boerma D, Huisman FW, Ramshorst B, et al. Morbidly obese patients exhibit increased CYP2E1-mediated oxidation of acetaminophen. *Clin Pharmacokinet*. 2016; 5(7):833-847. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40262-015-0357-0>
3. Jeong TB, Kim J-H, Kim SH, Lee S, Son SW, Lim Y, et al. Comparison of toxic responses to acetaminophen challenge in ICR mice originating from different sources. *Laboratory Animal Research*. 2019;35:16. DOI: <https://doi.org/10.1186/s42826-019-0017-x>
4. Yuan L, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver injury. *Clin Liver Dis*. 2013 Nov; 17(4):507-518. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cld.2013.07.002>
5. Gong S, Lan T, Zeng L, Luo H, Yang X, Li N, et al. Gut microbiota mediates diurnal variation of acetaminophen induced acute liver injury in mice. *J Hepatol*. 2018;69(1):51-59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.02.024>
6. Mazaleuskaya LL, Sangkuhl K, Thorn CF, FitzGerald GA, Altman RB, Klein TE. PharmGKB summary: pathways of acetaminophen metabolism at the therapeutic versus toxic doses. *Pharmacogenet. Genomics*. 2015 Aug;25(8):416-426. DOI: <https://doi.org/10.1097%2FFPC.000000000000150>
7. Chopyk DM, Stuart JD, Zimmerman MG, Wen J, Gumber S, Suthar MS, et al. Acetaminophen Intoxication Rapidly Induces Apoptosis of Intestinal Crypt Stem Cells and Enhances Intestinal Permeability. *Hepatol Commun*. 2019;3(11):1435-1449. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep4.1406>
8. Гриневич В.Б., Кравчук Ю.А., Сак Е.И. Эволюция понятия микробно-тканевого комплекса кишечника. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2020;183(11):4-11. DOI: <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-183-11-4-10>
- Grinevich VB, Kravchuk YuA, Sak EI. The evolution of the concept of the intestinal microbial-tissue complex. *Experimental and Clinical Gastroenterology* 2020;183(11):4-10. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-183-11-4-10>
9. Chen T, Li R, Chen P. Gut Microbiota and Chemical-Induced Acute Liver Injury. *Front Physiol*. 2021 May; 12:688780. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.688780>
10. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in microscopy. *J Cell Biol*. 1963 Apr 1; 17(1):208-212. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
11. Zhang S, Ren M, Zeng X, He P, Ma X, Qiao S. Leucine stimulates ASCT2 amino acid transporter expression in porcine jejunal epithelial cell line (IPEC-J2) through PI3K/Akt/mTOR and ERK signaling pathways. *Amino Acids*. 2015 Juli; 46(12):2633-2642. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00726-014-1809-9>
12. Zheng PYuB, He J, Yu J, Mao X, Luo Y, et al. Arginine metabolism and its protective effects on intestinal health and functions in weaned piglets under oxidative stress induced by diquat. *Br J Nutr*. 2017; 117:1495-1502. DOI: <https://doi.org/10.1017/s0007114517001519>
13. Blachier F, Davila AM, Benamouzig R, Tome D. Channelling of arginine in NO and polyamine pathways in colonocytes and consequences. *Front Biosci*. (Landmark Ed). 2011 Jan; 16(4):1331-1343. DOI: <https://doi.org/10.2741/3792>
14. Duan J, Yin J, Wu M, Liao P, Deng D, Liu G, et al. Dietary glutamate supplementation ameliorates mycotoxin-induced abnormalities in the intestinal structure and expression of amino acid transporters in young pigs. *PLoS ONE*. 2014;9:e112357. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112357>
15. Etienne-Mesmin L, Chassaing B, Gewirtz AT. Tryptophan: A gut microbiota-derived metabolites regulating inflammation. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*. 2017;8(1):7-9. DOI: <https://doi.org/10.4292%2Fwjgpt.v8.i1.7>
16. Liu WMiS, Ruan Z, Li J, Shu X, Yao K, et al. Dietary tryptophan enhanced the expression of tight junction protein ZO-1 in intestine. *J Food Sci*. 2017;82:562-567. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13603>
17. Шарапов И.Ю., Кварацхелия А.Г., Болгучева М.И., Коротких К.Н. Функциональная морфология бокаловидных клеток тонкой кишки при действии различных факторов. *Журнал анатомии и гистопатологии*. 2021;10(2):73-79. DOI: <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2021-10-2-73-79>
- Sharapov IYu, Kvaratskheliya AG, Bolgucheva MI, Korotkikh KN. Functional Morphology of Goblet Cells of the Small Intestine under the Influence of Various Factors. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2021;10(2):73-79. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.18499/2225-7357-2021-10-2-73-79>

Информация об авторах / Information about the authors

Николаева Ирина Владимировна, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С. И. Гельберга, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5715-7963>

e-mail: nikolayeva_i@mail.ru

Шейбак Владимир Михайлович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С. И. Гельберга, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9192-8298>

e-mail: vsheibak@gmail.com

Irina V. Nikolayeva, Senior Lecturer at the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after S. I. Gelberg, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5715-7963>

e-mail: nikolayeva_i@mail.ru

Vladimir M. Sheibak, PhD (Medicine), Professor; Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after S. I. Gelberg, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9192-8298>

e-mail: vsheibak@gmail.com

Островская Оксана Борисовна, к.м.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга; старший научный сотрудник группы морфологии с электронной микроскопией научно-исследовательской лаборатории, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-2014>

e-mail: astrowskaja@gmail.com

Островцова Светлана Александровна, к.б.н., доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга, УО «Гродненский государственный медицинский университет», Гродно, Беларусь,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7803-3991>

e-mail: sastrautsova23@gmail.com

Aksana B. Astrowskaja, PhD (Medicine), Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after S. I. Gelberg, Senior Researcher of the Morphology Group with Electronic Microscopy of the Research Laboratory, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3513-2014>

e-mail: astrowskaja@gmail.com

Sviatlana A. Astrautsova, PhD (Biology), Associate Professor of the Department of Microbiology, Virology and Immunology named after S. I. Gelberg, Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7803-3991>

e-mail: sastrautsova23@gmail.com

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Николаева Ирина Владимировна

e-mail: nikolayeva_i@mail.ru

Irina V. Nikolayeva

e-mail: nikolayeva_i@mail.ru

Поступила в редакцию / Received 02.11.2022

Поступила после рецензирования / Accepted 27.03.2023

Принята к публикации / Revised 30.05.2023