

СТРУКТУРА МИКРОБИОЦЕНОЗА КИШЕЧНИКА КРЫС, ПОЛУЧАВШИХ АЦЕТАМИНОФЕН

НИКОЛАЕВА И.В., ШЕЙБАК В.М., ЛЕЛЕВИЧ С.В., КРАВЧУК Р.И.

УО «Гродненский государственный медицинский университет», Республика Беларусь

Резюме.

Целью работы явилась оценка микробиологических изменений в кишечнике при введении крысам гепатотоксической дозы ацетаминофена.

Эксперименты 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 внутривентриально, в 2% растворе крахмала. Гепатотоксичность введенной дозы ацетаминофена, оценивали по гистологическим изменениям печени, а также активности маркерных ферментов и содержания общего билирубина. Для микробиологического исследования брали образцы фекалий, в которых определяли содержание основных представителей кишечной микрофлоры: бифидобактерий, лактобацилл, эшерихий, условно-патогенных энтеробактерий.

Результаты. Выявлено, что введение ацетаминофена в гепатотоксической дозе приводит к развитию дисбиоза, характеризующегося количественными и качественными изменениями кишечной микрофлоры. Внутривентриальное введение животным ацетаминофена существенно изменяет нормофлору толстого кишечника, снижая содержание анаэробов, лактобактерий, бифидобактерий, повышает численность популяций условно-патогенной, особенно аэробной, микрофлоры.

Полученные данные могут быть использованы для дальнейшего обоснования целесообразности разработки средств профилактики негативных эффектов нестероидных противовоспалительных препаратов.

Ключевые слова: ацетаминофен, микробиоценоз, кишечник, крысы.

Abstract.

Objectives. To evaluate microbiological changes in the intestine on administration of acetaminophen hepatotoxic doses to rats.

Material and methods. Experiments were performed on 24 white male rats weighing 180-200 g. The rats had standard vivarium diet: group 1 – the control group (n=12) – got 2% of starch mucilage intragastrically, group 2 – got intragastrically acetaminophen (Sigma) at the dose of 1500 mg per 1 kg of body weight in the form of 2% solution of starch mucilage 5 times every other day. Hepatotoxicity of the administered acetaminophen dose was evaluated by histological changes in the liver, as well as by the activity of marker enzymes and total bilirubin content. For microbiological examination faeces samples were taken, in which the composition of main representatives of the intestinal microflora: bifidobacteria, lactobacilli, escherichia, opportunistic enterobacteria was determined.

Results. It has been found out that the administration of acetaminophen in hepatotoxic dose leads to the development of dysbiosis, characterized by quantitative and qualitative changes in the intestinal microflora. Intragastric administration of acetaminophen to animals significantly alters the normal flora of the large intestine, reducing the content of anaerobic bacteria, lactobacilli, bifidobacteria and increases populations of opportunistic microorganisms, mostly of aerobic microflora.

The data obtained can be used for further substantiation of the feasibility to develop agents for prevention of negative effects of anti-inflammatory non-steroidal drugs.

Key words: acetaminophen, microbiocenosis, intestine, rats.

Микробиоценоз кишечника является эволюционно-сложившейся и саморегулирующейся микрoэкологической системой организма [1-2]. Нарушение состава и функций

индигенного микробиоценоза приводит к изменению биологических и физико-химических параметров внутренней среды биотопа, способствует повреждению эпителиоцитов, нару-

шению процессов переваривания и всасывания компонентов пищи, повышает проницаемость слизистого барьера для макромолекул и клеток микроорганизмов, нарушает моторику желудочно-кишечного тракта, создает условия для увеличения популяций патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [1, 3-5]. Эти патоморфологические и патофизиологические изменения, в свою очередь, проявляются в форме нарушений процессов пищеварения и всасывания, метаболических и иммунных расстройств, нарушений моторной функции кишечника, морфофункциональных изменений слизистой, аутоиммунными поражениями внутренних органов [3-6]. В конечном итоге развитие дисбиоза сопровождается угнетением иммунобиологической реактивности (неспецифической резистентности) организма [4]. Условно-патогенная микрофлора, особенно ее грамотрицательные виды, обладают более высокой иммуногенностью, чем физиологически более толерантные грамположительные анаэробные представители родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Кроме того, многие условно-патогенные микроорганизмы обладают высокой гистидиндекарбоксилазной активностью, что способствует накоплению в биотопах высоких концентраций гистамина, играющего важную роль в патогенезе аллергических состояний. Это является одной из причин присоединения к формирующемуся дисбиозу иммунодефицитных состояний и аллергических реакций со стороны макроорганизма [4, 5]. Сочетание дисбиоза с иммунодефицитом значительно осложняет состояние пациента, часто сопровождается присоединением стойких, склонных к хронизации, эндогенных инфекций [4, 5, 7].

В последние годы широко обсуждается роль микроэкологических нарушений в этиопатогенезе ряда заболеваний неинфекционной природы. При этом дисбиоз рассматривается как токсико-инфекционное состояние, развитие которого сопровождается формированием в организме сообщества условно-патогенных микроорганизмов, оказывающих токсикогенное и дисметаболическое воздействие. В результате, в сочетании с нарушением обменных процессов при основной патологии, это приводит к усилению тяжести многих хронических неинфекционных заболеваний как неэндокринной, так и эндокринной природы [6-8].

Микробиоценоз толстого кишечника является основным резервуаром индигенной микробиоты в организме (около 60% всей микрофлоры) и играет ключевую роль в поддержании или нарушении всей микробной экологической системы [2, 6, 7]. Известно, что при дисбиозе в первую очередь снижается концентрация клеток и активность наиболее важного компонента индигенной микрофлоры (грамположительных неспорообразующих сахаролитических анаэробных бактерий), играющих ключевую роль в нормальном функционировании биоценоза. Следствием этого является неконтролируемый рост популяций условно-патогенных микроорганизмов и повышение их вирулентности. Условно-патогенные микроорганизмы, обладая определенными механизмами адгезии и способностью к синтезу ряда ферментов патогенности, может вызвать воспалительный процесс. Эти микроорганизмы могут служить причиной внекишечной локальной и генерализованной инфекций [6, 7].

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВС) являются основным средством симптоматической терапии многих заболеваний, а также купирования боли умеренной и средней интенсивности [9]. Однако широкие показания к применению указанных препаратов часто приводит к их бессистемному использованию, что не исключает развития ряда побочных токсических реакций. К последним следует отнести поражения печени, нарушение функции почек и клеток костного мозга (анемия, агранулоцитоз, тромбоцитопения), аллергизирующее действие и иммунодепрессию [9-11].

Ацетаминофен (парацетамол) — наиболее распространенное нестероидное средство, обладающее жаропонижающими, болеутоляющими и противовоспалительными свойствами, но его выраженная гепатотоксичность при приеме больших доз является наиболее частой причиной острой печеночной недостаточности [9-12]. Следует отметить, что ацетаминофен не только содержится в одноименных препаратах или торговых аналогах, но и входит в состав комбинированных препаратов. Прием большой дозы препарата способен вызывать тяжелый центрлобулярный гепатонекроз [10, 11]. Парацетамол-индуцированные повреждения печени связаны в основном с избыточным образованием активных форм кислорода и азота,

формированием реактивного промежуточного соединения N-ацетил-p-бензохинонимина (NAPQI). Более 80% от введенной дозы парацетамола легко детоксифицируется в печени путем глюкуронирования или сульфатирования. Однако часть препарата подвергается цитохром CYP2E1-опосредованной биоактивации в высокореакционный электрофильный арилирующий метаболит NAPQI, который способен ковалентно связываться с белками. NAPQI угнетает дыхательную цепь, что приводит к снижению до 90% концентрации АТФ в митохондриях гепатоцитов. Одновременно NAPQI генерирует свободные радикалы, что способствует повреждению митохондрий и гибели клетки. В процессах детоксикации NAPQI принимает участие образующий конъюгаты восстановленный глутатион (GSH), продукты которого обладают невысокой токсичностью и могут быть элиминированы из организма [10].

Нами разработана методика моделирования поражения печени у крыс при введении им внутрижелудочно препарата в суммарной дозе 7500 мг/кг массы, которая, помимо токсического поражения печени, приводит к развитию дисбиоза, характеризующегося изменением не только количества кишечной микрофлоры, но и морфологической структуры энтероцитов [10]. При этом наиболее глубокие микробиологические нарушения ассоциируются со значительным усилением аутоинтоксикации [11].

Аномальная микрофлора, значительный вклад в которую вносят условно-патогенные микроорганизмы, синтезирует большие количества индола, скатола, аммиака, сероводорода и других токсических соединений и тем самым увеличивают токсикогенную нагрузку на печень, провоцируя развитие нарушений со стороны гепатобилиарной системы. Очевидно, что характеристика структуры микробиоценоза и выделение основного типа условно-патогенной микрофлоры может способствовать профилактике и коррекции данного вида нарушений и дальнейшему развитию терапевтической стратегии лечения основных заболеваний.

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

Методы

Эксперименты были выполнены на 24 белых крысах-самцах массой 180-200 г., которые были разделены на 2 группы и находились на стандартном рационе вивария: 1-я – контрольная группа (n=12) – получала 2% слизь крахмала в желудок, 2-я группа (n=12) получала 5-кратно, через день ацетаминофен (Sigma) в дозе 1500 мг/кг массы тела внутрижелудочно, в 2% растворе крахмала. Через 24 ч после последнего введения ацетаминофена животных декапитировали. Для исследований брали образцы печени и плазму. Кусочки печени фиксировали в жидкости Карнуа и заключали в парафин. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином/эозином. и суданом чёрным на выявление липидов. Изучение гистологических препаратов, их микрофотографирование проводили с помощью микроскопа Axioskop 2 plus (Zeiss, Германия), цифровой видеокмеры (Leica DFC 320, Германия) и программы анализа изображения Image Warp (Bit Flow, США). В плазме определяли активности аламинной аминотрансферазы (АлАТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и содержание общего билирубина, используя общепринятые биохимические методы.

Образцы фекалий (по одному от каждой крысы) собирали в стерильные флакончики, в которых они немедленно доставлялись в бактериологическую лабораторию. Бактериологическое исследование проводили по стандартной методике [12]. Образец взвешивали, гомогенизировали в 0,85% растворе хлорида натрия, получая исходное разведение 10⁻¹. Из исходного разведения готовили 9 десятикратных разведений в физиологическом растворе вплоть до разведения 10⁻¹⁰. Засев из десятикратных разведений фекалий проводили сразу же после их приготовления.

Для комплексного изучения аэробной и анаэробной микрофлоры по 0,1 мл из каждого разведения заседали на питательные среды (трехкратно). В работе использованы эндо-агар (Fluka) – для энтеробактерий с нормальной ферментативной активностью и условно-патогенных лактозонегативных энтеробактерий, пластинчатый МПА (Conda pronadisa) – для определения аэробной флоры, Рагоза-агар (Fluka) – для лактобактерий, RCM (OXOID) – для анаэробных (клостридии), в

том числе молочнокислых (бифидобактерии) бактерий, высокий столбик сахарного МПА – для банальных анаэробов (кlostридии) и оценки уровня микрофлоры с выраженным газообразованием. Посевы культивировали в течение 24–72 часов при температуре 37°C. Выделенные микроорганизмы идентифицировали по культуральным, морфологическим, тинкториальным и биохимическим свойствам. Подсчет каждой группы микроорганизмов в 1 грамме фекалий проводили по формуле:

$$M = N * 10^{n+1};$$

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 фекалий выражали как lg КОЕ/г. Среднее значение, полученное из образцов, взятого от одного животного, использовали для расчета статистических показателей в группе [12, 13].

Количество протоя характеризовали разведением материала, в котором регистрировали характерный рост «феномен роения».

Для определения абсолютного числа микроорганизмов использовали разведение материала 10^7 , в котором подсчитывали общее микробное число и процентное содержание каждой группы микроорганизмов. Общее число микроорганизмов определяли подсчетом количества колониеобразующих единиц на поверхности пластинчатого агара и в глубине высокого столбика. Рассчитывали величину квадратичного отклонения как квадратный корень из числа непосредственно подсчитанных колоний, доверительный интервал – как сумму и разность среднего числа колоний, выросшего из разведения 10^7 и среднего квадратичного отклонения [14].

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 и обсуждение

Энтеральное поступление в организм ацетаминофена оказывает гепатотоксическое действие. При гистологическом исследовании обнаружено полнокровие междольковых артерий, вен и расширение синусоидных капилляров в центральных частях долек. По периферии оно выражено в минимальной степени. Балочное строение печени сохранено. В некоторых участках отмечается лейкоцитарная инфильтрация. Цитоплазма гепатоцитов менее ячеистая, особенно в центральной части долек. Она сохраняется и на периферии. Степень расширения капилляров у животных варьирует. У половины животных регистрируются средние по размерам участки повреждения печеночной паренхимы. Их расположение в дольке хаотично (рис. 1).

Содержание липидов в печени снижено: меньше в центральной части долек, более значительно – в периферической. Локализация липидов в гепатоцитах однотипна. Выраженность этих изменений не одинаковая не только среди долек одного животного, но и у разных животных (рис. 2).

Результат биохимического исследования плазмы показал повышение активности АлАТ, АсАТ, ГГТП, а также содержания общего билирубина и холестерина (табл. 1).

Анализ бактериологического исследования микрофлоры толстого кишечника выявил наличие выраженных изменений со стороны как анаэробного, так и аэробного компонен-

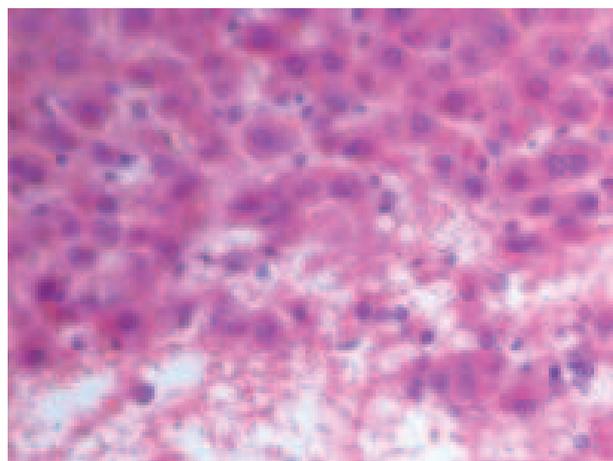
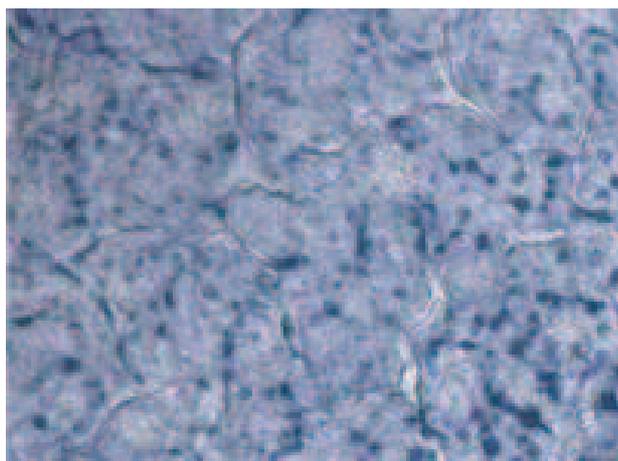
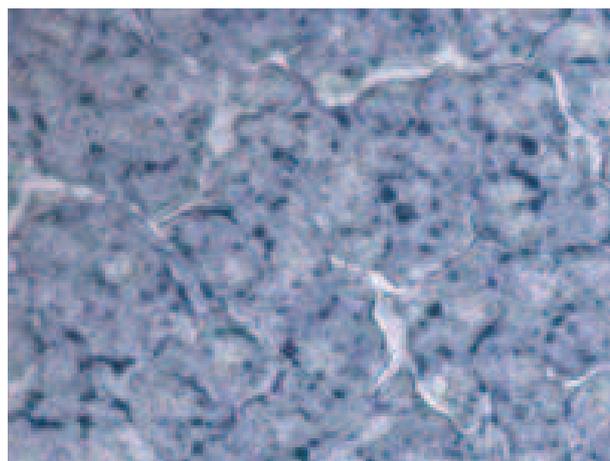


Рисунок 1 – Поврежденная паренхима печени крысы, получавшей ацетаминофен. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100.



А



Б

Рисунок 2 – Содержание липидов в печени: А – контроль (вокруг междольковой печеночной триады), Б – контроль (вокруг центральной вены).

Таблица 1 - Влияние ацетаминофена на биохимические показатели в плазме крыс Ме (25; 75%)

Условия эксперимента	Исследуемые показатели				
	АлАТ (Ед/ л)	АсАТ (Ед/ л)	ГГТП (Ед/ л)	Общий билирубин (мкмоль/л)	Холестерол общий (мкмоль/л)
Контроль	39,5 (34; 44)	82,1 (69,84; 87,3)	4,632 (4,632; 5,79)	4,9 (4,6; 5,5)	1,25 (1; 1,5)
Ацетаминофен	50,5 (46; 60) 0,02	153,6 (144,9; 157,1) 0,0004	6,948 (6,948; 6,948) 0,004	5,7 (5,55; 6,15) 0,01	1,95 (1,65; 2,2) 0,03

Примечание: p - статистически значимые различия.

тов кишечного биоценоза, по сравнению наблюдаемыми в контрольной группе животных. Введение ацетаминофена приводило к снижению в фекалиях численности анаэробов, молочнокислых бактерий: бифидобактерий, лактобактерий, но одновременно повышалось 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 (табл. 2).

Важно отметить, что появление в кишечнике повышенного количества условно-патогенной флоры, особенно аэробной, свидетельствует об ослаблении активности индигенного анаэробного компонента нормофло-

ры [3, 6]. Известно, что в условиях пониженной резистентности макроорганизма определенные виды условно-патогенных микроорганизмов, достигшие популяционного уровня (10^5 – 10^6 КОЕ/мл), формируют ассоциации, объединенные в бактериальные биопленки, способные инициировать инфекционный процесс [7].

Несмотря на незначительное изменение титра, под действием ацетаминофена 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 21%, на фоне трехкратного увеличения аэробных микроорганизмов ($p=0,003$), включая эшерихии с нормальной ферментативной активностью и условно-патогенные лактозонегативные энтеробактерии.

Таблица 2 – Изменения просветной микрофлоры толстого кишечника Ме (25; 75%), р.

Группы микроорганизмов lg КОЕ/г	Условия эксперимента	
	Контрольная группа (n=12)	Ацетиминофен (n=12)
Общее количество анаэробов	10,0 (10,0; 11,0)	9,0 (9,0; 9,0) 0,001
Бифидобактерии	10,9 (10,2; 11,2)	9,8 (9,7; 10,4) 0,03
Лактобактерии	10,8 (10,4; 11,3)	9,8 (9,7; 10,1) 0,003
Общее количество банальных анаэробов (клостридии, бактероиды)	9,5 (9,4; 9,7)	10,1 (10,0; 10,4) 0,002
Общее количество аэробных микроорганизмов	9,3 (8,9; 9,5)	9,8 (9,4; 10,2) 0,06
Эшерихии с нормальной ферментативной активностью	7,5 (6,5; 7,9)	7,6 (5,3; 7,9) 0,94
Лактозонегативные энтеробактерии	6,3 (6,3; 6,4)	5,9 (5,5; 6,5) 0,46
Газообразующая микрофлора	7,5 (7,0; 8,0)	8,5 (7,3; 9,0) 0,23
<i>Proteus vulgaris</i>	0,0 (0,0; 3,0)	7,4 (7,1; 7,7)
Общее количество микроорганизмов (при высеве из разведения 10 ⁷)	2539,0 (726; 3411)	327,9 (241,0; 441,7) 0,002

Примечание: р - статистически значимые различия.

Заключение

1. Внутрижелудочное введение животным введение ацетиминофена существенно изменяет нормофлору толстого кишечника, снижая содержание анаэробов, молочнокислых бактерий.

2. В условиях интоксикации ацетиминофеном в кишечнике повышается численность популяций условно-патогенной, особенно аэробной, микрофлоры.

3. Помимо гепатотоксического действия, ацетиминофен снижает общую резистентность организма животных, путем негативного воздействия на микробиоценоз толстого кишечника.

Литература

1. Molecular microbial ecology of the gastrointestinal tract: from phylogeny to function / E. G. Zoetendal [et al.] // *Curr Issues Intest Microbiol.* — 2004. — Vol. 5, № 2. — P. 31–47.
2. Шендеров, Б. А. Медицинская микробная экология: некоторые итоги и перспективы исследований / Б. А. Шендеров // *Вестник Российской академии медицинских наук.* — 2005. — № 12. — С. 13–17.
3. Бондаренко, В. М. Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы / В. М. Бондаренко, Т. В. Мацулевич. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 304 с.
4. Воеводин, Д. А. Дисбактериоз и иммунопа-

- тологический процесс / Д. А. Воеводин, Г. Н. Розанова, Н. А. Стенина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2005. – № 2. – С. 89–92.
5. Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis / V. Veckman [et al.] // J Leukoc Biol. – 2003. – Vol. 74, № 3. – P. 395 – 402.
 6. Циммерман, Я. С. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника и/или «синдром избыточного бактериального роста» / Я. С. Циммерман // Клиническая медицина. – 2005. – Т. 83, № 4. – С. 14-22.
 7. Роль дисбактериоза в формировании хронической неинфекционной патологии у детей / Д. А. Воеводин [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2001. – № 6. – С. 88–93.
 8. Акимкин, В. Г. Дисбактериоз кишечника как фактор риска заболевания нозокомиальным сальмонеллезом / В. Г. Акимкин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1997. – № 3. – С. 105-106.
 9. Фисенко, В. П. Парацетамол: проблемы эффективности и безопасности / В. П. Фисенко // Ведомости Фармакологического комитета. – 1998. – № 4. – С. 3–4.
 10. Горецкая, М. В. Гепатопротекторные свойства таурина при интоксикации парацетамолом / М. В. Горецкая, В. М. Шейбак // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2013. – № 3. – С. 97-103.
 11. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study / A. M. Larson [et al.] // Hepatology. – 2005. – Vol. 42, № 6. – P. 1364–1372.
 12. Газиумарова, Л. Д. Бактериологическая диагностика дисбактериоза кишечника : инструкция по применению № 086–0310 : утв. 19.03.2010 / Л. Д. Газиумарова, Л. П. Титов, Н. Л. Ключко // Современные методы диагностики, лечения и профилактики заболеваний : сб. инструктив.-метод. док. — Минск, 2010. — Т. 6, вып. 11. — С. 189-208.
 13. Нарушение микробиоты желудочно-кишечного тракта здоровых людей / Ю. В. Червинец [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – № 3. – С. 55-58.
 14. Иванов, В. П. Совершенствование методов диагностики дисбактериоза толстого кишечника: информационное письмо / В. П. Иванов [и др.]. – Санкт-Петербург, 2002. – 22 с.

Поступила 10.01.2014 г.

Принята в печать 05.03.2014 г.

Сведения об авторах:

Николаева И.В. – ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Шейбак В.М. – д.м.н., профессор кафедры биологической химии УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Лелевич С.В. – к.м.н., доцент кафедры клинической и лабораторной диагностики УО «Гродненский государственный медицинский университет»;

Кравчук Р.И. – к.б.н., старший научный сотрудник НИЧ УО «Гродненский государственный медицинский университет».

Адрес для корреспонденции: 230009, г.Гродно, ул.Горького, 80, УО «Гродненский государственный медицинский университет», кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга.
E-mail: irina_nikolayeva@rambler.ru – Николаева Ирина Владимировна.