

## ИЗМЕНЕНИЕ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ПОД ВЛИЯНИЕМ НЕСТЕРОИДНОГО ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРЕПАРАТА АЦЕТАМИНОФЕНА

Тропская Н.С., Вилкова И.Г., Кислякова Е.А., Кислицына О.С., Черненькая Т.В., Попова Т.С.

ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента Здравоохранения г. Москвы» (Москва, Россия)

## THE CHANGE OF INTESTINAL MICROFLORA IN NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUG ACETAMINOPHEN ADMINISTRATION

Tropskaya N. S., Vilkova I. G., Kislykova E. A., Kislicina O. S., Chernen'kaya T. V., Popova T. S.

N. V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of the Moscow Healthcare (Moscow, Russia)

**Для цитирования:** Тропская Н.С., Вилкова И.Г., Кислякова Е.А., Кислицына О.С., Черненькая Т.В., Попова Т.С. Изменение микробиоты кишечника под влиянием нестероидного противовоспалительного препарата ацетаминофена. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2018;154(6): 86–89.

**For citation:** Tropskaya N. S., Vilkova I. G., Kislykova E. A., Kislicina O. S., Chernen'kaya T. V., Popova T. S. The change of intestinal microflora in nonsteroidal anti-inflammatory drug acetaminophen administration. Experimental and Clinical Gastroenterology. 2018;154(6): 86–89.

**Тропская  
Наталья Сергеевна**  
Tropskaya Nataliya S.  
ntropskaya@mail.ru

**Тропская Н.С.** — ГБУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента Здравоохранения г. Москвы», ведущий научный сотрудник научной лаборатории экспериментальной патологии, д.б.н.

**Вилкова И.Г.** — младший научный сотрудник научной лаборатории экспериментальной патологии

**Кислякова Е.А.** — научный сотрудник научной лаборатории экспериментальной патологии, к.б.н.

**Кислицына О.С.** — научный сотрудник научной лаборатории экспериментальной патологии

**Черненькая Т.В.** — заведующая научной лабораторией клинической микробиологии к.м.н.

**Попова Т.С.** — заведующая научной лабораторией экспериментальной патологии д.б.н., профессор

**Nataliya Tropskaya** — D. Sc. (Biology), Leading Researcher of the Scientific Laboratory of Experimental Pathology

**Irina Vilkova** — junior scientist of the Scientific Laboratory of Experimental Pathology

**Ekaterina Kislykova** — Ph.D. (Biology), scientist of the Scientific Laboratory of Experimental Pathology

**Oksana Kislicina** — scientist of the Scientific Laboratory of Experimental Pathology

**Tatyana Chernen'kaya** — Ph.D. (Medicine), Head of the Scientific Laboratory of Clinical Microbiology

**Tamara Popova** — D. Sc. (Biology), Prof., Head of the Scientific Laboratory of Experimental Pathology

### Резюме

**Цель исследования:** изучить качественный и количественный состав полостной микрофлоры тощей и слепой кишок при воздействии ацетаминофена.

**Материалы и методы:** Эксперименты выполнены на 30 крысах самцах линии Вистар с массой тела 400–450 г. Изучено влияние внутрижелудочного введения ацетаминофена (500 мг/кг) на полостную микрофлору тощей и слепой кишок.

**Результаты.** Показано, что введение ацетаминофена в течение 21 суток не вызывает изменения полостной микрофлоры тощей кишки, но приводит к уменьшению видового состава и значительному подавлению лакто- и бифидобактерий в слепой кишке.

**Ключевые слова:** ацетаминофен, кишечная микрофлора, эксперимент, крысы

### Summary

**Objective:** To study the qualitative and quantitative composition of microflora in the jejunum and the cecum in acetaminophen administration.

**Materials and methods:** The experiments were carried out on 30 rats male Wistar rats weighing 400–450 g. The influence of intragastric administration of acetaminophen (500 mg/kg) on the microflora in the jejunum and cecum has been studied.

**Results:** It is shown that administration of acetaminophen within 21 days no changes composition of the jejunal microbiota, but leads to decrease species composition and to significant inhibition of lactobacillus and bifidobacterium in the cecum.

**Key words:** acetaminophen, intestinal microflora, experiment, rats

## Введение

Нормальная микрофлора кишечника представляет собой полноценную экологическую систему, выполняющую многообразные функции в организме человека. Количественный и качественный состав кишечной микрофлоры может изменяться под воздействием различных факторов эндогенного или экзогенного происхождения. При нарушении качественного и количественного состава микробиоценоза кишечника вследствие размножения условно-патогенных бактерий в количестве, превышающем норму, развивается синдром избыточного бактериального роста, играющий значительную роль в патогенезе многих заболеваний, в том числе цирроза печени [1].

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 [2]. Ацетаминофен вызывает существенные повреждения центральнолобулярных областей печени при введении высоких доз [3].

Ацетаминофен – индуцированные повреждения печени связаны в основном с избыточным образованием активных форм кислорода и азота, формированием реактивного промежуточного соединения N-ацетил-p-бензохинонимина. Более 80% от введенной дозы ацетаминофена легко детоксифицируется в печени путем глюкуронирования или сульфатирования. В процессах детоксикации N-ацетил-p-бензохинонимина принимает участие образующий конъюгаты восстановленный глутатион. Когда избыток метаболита вырабатывается

в организме, уровень эндогенного глутатиона истощается. Этот токсический метаболит связывается с нуклеофильной макромолекулой гепатоцита и вызывает некроз [4, 5]. Действительно, при однократном введении крысам ацетаминофена (500–1500 мг/кг, внутрижелудочно) наблюдали значительное дозозависимое снижение уровня цитоплазматического и внутримитохондриального восстановленного глутатиона в ткани печени. В большей степени истощался цитоплазматический глутатион по сравнению с митохондриальным [6]. При пероральном введении крысам в течение 14 дней было показано, что ацетаминофен в дозе 500 мг / кг вызывал выраженную гепатотоксичность [7]. При внутрижелудочном введении крысам высоких доз ацетаминофена, но кратковременно (1500 мг/кг, пятикратно в течение 10 дней), было установлено, что помимо токсического поражения печени, начинают происходить изменения в микрофлоре кишечника. Несмотря на незначительное изменение титра, под действием ацетаминофена в фекалиях снижается общее микробное число на 55% и изменяется соотношение между основными популяциями микроорганизмов: наблюдается обеднение популяции лактобактерий на 21%, на фоне трехкратного увеличения аэробных микроорганизмов [5].

В связи с вышеизложенным, представляется целесообразным изучение изменений микробиоты кишечника в условиях длительного введения гепатотоксической дозы ацетаминофена.

**Цель исследования** – изучить качественный и количественный состав полостной микрофлоры тощей и слепой кишок при воздействии ацетаминофена.

## Материал и методы

Исследования выполнены на 30 крысах самцах линии Вистар с массой тела 400–450 г. Протокол исследования был одобрен докальным комитетом по биомедицинской этике НИИ СП им. Н. В. Склифосовского. Было сформировано две группы: контрольная (интактные здоровые животные, n=10) – введение внутрижелудочно ежедневно воды в количестве 5 мл/кг в течение 21 дня и опытная (n=20) – введение внутрижелудочно ежедневно раствора ацетаминофена в дозе 500 мг/кг в течение 7 и 21 дня.

Все животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 20–24 °С и влажности 45–65%, с режимом освещенности с 8 до 20 часов – свет, с 20 до 8 часов – сумеречное освещение.

В начале эксперимента и по его окончании перед эвтаназией у всех животных измеряли массу тела. На 8 и 22 сутки эксперимента после введения летальной дозы наркоза и вскрытия брюшной полости проводили забор содержимого тощей (20 см за связкой Трейтца) и слепой кишок для бактериологического анализа. Также выделяли печень, почки, надпочечники, селезенку, слепую кишку для определения относительной массы органов.

Микробиологическое исследование содержимого тощей и слепой кишок проводилось в соответствии с нормативными документами, принятыми для исследования кала у людей: отраслевым стандартом 91500.11.0004–2003 «Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Были изучены 8 групп микроорганизмов: *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Escherichia coli* (*E.coli*), *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* sp. Количество бактерий в каждом виде выражали в КОЕ/мл.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы STATISTICA 6.0. Для каждой группы животных для всех параметров рассчитывали среднее значение, стандартное отклонение, медиану, перцентили. В связи с тем, что распределение значений не носило нормальный характер, то данные в окончательном варианте представляли как медиану и перцентили – Me (25;75)%. При сравнении данных бактериологических исследований и значений относительной массы органов опытной группы с контрольной группой использовали непараметрический U – критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми считались значения с  $p < 0,05$ .

**Таблица 1.**

Содержание различных видов микроорганизмов в тощей и слепой кишке в контрольной и опытных группах, КОЕ/мл, Ме (25; 75)%.

Группа	Вода, 21с		Ацетаминофен, 7с		Ацетаминофен, 21с	
	тощая кишка	слепая кишка	тощая кишка	слепая кишка	тощая кишка	слепая кишка
Вид микроорганизмов						
<i>E.coli</i>	-	10 <sup>6</sup> (10 <sup>6</sup> ;10 <sup>7</sup> )	0(0;0)	10 <sup>6</sup> (10 <sup>5</sup> ;10 <sup>8</sup> )	-	10 <sup>4</sup> (10 <sup>3</sup> ;10 <sup>5</sup> )*
<i>Enterococcus</i> spp.	-	10 <sup>5</sup> (10 <sup>3</sup> ;10 <sup>6</sup> )	0(0;0)	10 <sup>7</sup> (10 <sup>6</sup> ;10 <sup>8</sup> )*	-	10 <sup>2</sup> (0;10 <sup>6</sup> )
<i>Proteus</i> sp.	-	0(0;10 <sup>3</sup> )	-	0(0;10 <sup>2</sup> )	-	0(0;0)
<i>Klebsiella</i> spp.	-	0(0;10 <sup>2</sup> )	0(0;0)	10 <sup>2</sup> (10 <sup>2</sup> ;10 <sup>3</sup> )	-	0(0;0)
<i>Enterobacter</i> sp.	-	0(0;10 <sup>4</sup> )	0(0;0)	0(0;10 <sup>5</sup> )	0(0;0)	10 <sup>2</sup> (0;10 <sup>5</sup> )
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	10 <sup>2</sup> (0;10 <sup>5</sup> )	0(0;0)	0(0;0)*	-	10(0;10 <sup>3</sup> )
<i>Lactobacillus</i> spp.	-	10 <sup>9</sup> (10 <sup>6</sup> ;10 <sup>10</sup> )	0(0;0)	10 <sup>7</sup> (0;10 <sup>9</sup> )	0(0;0)	10(0;10 <sup>2</sup> )*
<i>Bifidobacterium</i> spp.	-	10 <sup>8</sup> (10 <sup>6</sup> ;10 <sup>8</sup> )	0(0;0)	10 <sup>6</sup> (0;10 <sup>8</sup> )	-	0(0;0)*

**Примечание:**

- не обнаружены ни у одного животного

\* p<0,05 отличия опытной группы от контрольной статистически значимы.

**Таблица 2.**

Представленность различных видов микроорганизмов в тощей и слепой кишке в контрольной и опытных группах

Группа	Вода, 21с		Ацетаминофен, 7с		Ацетаминофен, 21с	
	тощая кишка	слепая кишка	тощая кишка	слепая кишка	тощая кишка	слепая кишка
Вид микроорганизмов						
<i>E.coli</i>	-	10/10	1/10	10/10	-	10/10
<i>Enterococcus</i> spp.	-	10/10	2/10	10/10	-	7/10
<i>Proteus</i> sp.	-	3/10	-	3/10	-	1/10
<i>Klebsiella</i> spp.	-	4/10	2/10	8/10	-	1/10
<i>Enterobacter</i> sp.	-	4/10	1/10	3/10	1/10	7/10
<i>Staphylococcus</i> sp.	-	7/10	1/10	2/10	-	5/10
<i>Lactobacillus</i> spp.	-	10/10	2/10	7/10	1/10	5/10
<i>Bifidobacterium</i> spp.	-	10/10	1/10	7/10	-	1/10

**Таблица 3.**

Относительная масса органов,%

Группа	Печень	селезенка	почки	надпочечники	слепая кишка
Контроль, 21с	2,57 (2,48;2,71)	0,22 (0,20;0,26)	0,55 (0,53;0,57)	0,015 (0,014;0,018)	1,10 (1,03;1,27)
Ацетаминофен, 7с	3,02 (2,98;3,11)*	0,24 (0,23;0,25)	0,65 (0,58;0,66)*	0,017 (0,015;0,018)	1,41 (1,05;1,54)
Ацетаминофен, 21с	3,51 (3,14;3,59)*	0,23 (0,19;0,25)	0,65 (0,58;0,66)*	0,017 (0,016;0,020)	0,96 (0,87;1,06)

**Примечание:**

\* - p<0,05, отличия опытной группы от контрольной статистически значимы.

## Результаты

Данные по бактериологическим исследованиям представлены в таблицах 1 и 2.

В контрольной группе у всех крыс в содержимом тощей кишки микроорганизмы не обнаруживались. Состав микрофлоры слепой кишки у каждого животного составлял до 6 видов микроорганизмов. У всех крыс присутствовали *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. У большинства животных высевались *Staphylococcus* spp. У трех из десяти животных присутствовали *Proteus* sp. У четырех из десяти крыс высевались *Klebsiella* spp. и *Enterobacter* spp.

В опытной группе после 7-ми суточного введения ацетаминофена в содержимом тощей кишки появились *E.coli*, *Enterococcus* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. Однако, такие изменения выявлялись только у одного или двух животных из десяти. У остальных животных эти бактерии не обнаруживались. В содержимом слепой кишки у 8 из 10 животных выявлялись *Klebsiella* spp. (в контроле – у четырех из десяти животных), а *Staphylococcus* spp., напротив, высевался только у двух животных (в контроле – у семи из десяти крыс). При этом медианное значение содержания *Staphylococcus* spp. статистически значимо снизилось с 10<sup>2</sup>(0;10<sup>5</sup>) КОЕ/мл (контроль) до 0(0;0) КОЕ/мл. Кроме того, следует отметить значительное увеличение количества *Enterococcus* spp. (до 10<sup>7</sup>(10<sup>6</sup>;10<sup>8</sup>) КОЕ/мл) по сравнению с контрольной группой.

После 21-го суточного введения ацетаминофена у крыс опытной группы отмечались следующие изменения. В содержимом тощей кишки у одного животного высевались *Enterobacter* spp. и у одного – *Lactobacillus* spp. Остальные микроорганизмы не обнаруживались. В содержимом слепой кишки статистически значимо уменьшилось количество *E.coli* (до 10<sup>4</sup>(10<sup>3</sup>;10<sup>5</sup>) КОЕ/мл). Особо следует отметить, что *Lactobacillus* spp. обнаруживались только у 5 из 10 животных, при этом их концентрация значительно снижалась и составляла 10 (0; 10<sup>3</sup>) КОЕ/мл. *Bifidobacterium* spp. практически исчезли и выявлялись только у одного животного. Кроме того, под влиянием ацетаминофена уменьшился видовой состав микрофлоры слепой кишки у каждого животного (до 4 видов микроорганизмов).

Под влиянием ацетаминофена изменялась относительная масса внутренних органов (табл. 3). Из таблицы видно, что наблюдалось статистически значимое по сравнению с контролем увеличение относительной массы печени и почек как через 7, так и через 21 сутки введения ацетаминофена.

Таким образом, введение ацетаминофена в течение 21 суток вызывает гепато- и нефромегалию, а также приводит к обеднению состава микрофлоры и значительному подавлению лакто- и бифидобактерий в слепой кишке.

## Заключение

В желудочно-кишечном тракте млекопитающих микробиота взаимодействует с организмом хозяина через поверхность слизистой кишечника и очень чувствительна к внешним и внутренним воздействиям, которые могут вызвать нарушения во внутреннем гомеостазе кишечника [8]. Показано, что ее состав и метаболическая активность могут привести как к благотворному влиянию на организм хозяина (например, выработка витаминов), так и оказать губительное воздействие путем образования токсических продуктов [9].

Механизмы, с помощью которых кишечная микробиота может влиять на восприимчивость макроорганизма к ацетаминофен-индуцированной гепатотоксичности многочисленны. Одним из них является истощение способности печени к сульфонации через конкурентное торможение бактериальными метаболитами, что может приводить к большему проценту окисляемого лекарственного средства до токсического продукта с помощью ферментной системы цитохрома р450 [10].

Так, некоторые кишечные метаболиты могут повышать токсичность ацетаминофена вследствие продукции р-крезола, который конкурирует с ацетаминофеном в метаболических реакциях [11]. В литературе появились данные о том, что лактобактерии способны по неизвестному механизму связывать или метаболизировать р-крезол [12]. В нашем исследовании через 7 дней введения ацетаминофена статистически значимого снижения лактобактерий в слепой кишке не наблюдалось, что согласуется с данными литературы о незначительном изменении титра лактобактерий после 5-ти кратного введения ацетаминофена [5]. Однако, через 21 день введения ацетаминофена нами установлено значительное снижение количества лактобактерий в слепой кишке до 10 КОЕ/мл. Можно предполагать, что на фоне практически отсутствия лактобактерий в слепой кишке токсичность ацетаминофена будет усилена, и, по-видимому, длительное введение ацетаминофена предпочтительнее при моделировании экспериментальной патологии.

## Литература | Reference

1. Федосина Е.А., Жаркова М.С., Маевская М.В. Бактериальная кишечная микрофлора и заболевания печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии – 2009. – Т. 19. – № 6. – С. 73–81. Fedos'ina E. A., Zharkova M. S., Mayevskaya M. V. Bacterial intestinal microflora and liver diseases // Russian journal of gastroenterology, Hepatology and Coloproctology – 2009. – Vol. 19. – № 6. – P. 73–81.
2. Larson A.M., Polson J., Fontana R. J., Davern T. J. et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study // Hepatology. – 2005. – Vol. 42, № 6. – P. 1364–1372.
3. Bessems J.G., Vermeulen N. P. Paracetamol (acetaminophen)-induced toxicity: molecular and biochemical mechanisms, analogues and protective approaches // Crit. Rev. Toxicol. – 2001. – Vol.31, № 1. – P. 55–138.
4. Iqubal A., Iqubal M. K., Haque S. E. Experimental hepatotoxicity Inducing agents: A Review // International Journal of Pharmacological Research. – 2016. -Vol. 6, № 11. -P.325–335.
5. Николаева И.В., Шейбак В.М., Лелевич С.В., Кравчук Р.И. Структура микробиоценоза кишечника крыс, получавших ацетаминофен // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 56–62. Nikolaeva I. V., Shejbak V.M., Lelevich S. V., Kravchuk R. I. Struktura mikrobiocenoza kishechnika krysa, poluchavshih acetaminofen // Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 56–62.
6. Дремза И.К., Чещевик В.Т., Забродская С.В., Максимчик Ю.З. и др. Гепатотоксические эффекты ацетаминофена. Протекторные свойства производных триптофана // Биомедицинская химия. – 2010. -Т. 56. -№ 6. – С. 710–718. Dresia I. K., Tchesevic V. T., Zabrodskaya S. V., Y. Z. Maksimchik, etc. Hepatotoxic effects of acetaminophen. Tread properties of tryptophan derivatives // Biomedical chemistry. – 2010. – Vol. 56. – № 6. – P. 710–718
7. Parmar S.R., Vashrambhai P. H., Kalia K. Hepatoprotective activity of some plants extract against paracetamol induced hepatotoxicity in rats // J Herbal Med Toxicol. – 2010. – Vol. 4, № 2. – P.101–106.
8. Сивков А.В., Синюхин В.Н., Арзуманов С.В., Стецюк Е.А., Коробова Т.А. Уремические токсины в крови больных с терминальной стадией почечной недостаточности при дисбиозе кишечника // Экспериментальная и клиническая урология. – 2014. – № 2. – С. 94–97. Sivkov A. V., Sinyukhin V. N., Arzumanov S. V., Stetsyuk E. A., Korobova, T. A. Uremic toxins in blood of patients with end-stage renal failure with intestinal dysbiosis // Experimental and clinical urology. – 2014. – № 2. – P. 94–97.
9. Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K. et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes // Science. – 2011. -Vol.334. -№ 6052. – P. 105–108.
10. Possamai L.A., McPhail M.J., Khamri W., Wu B. et al. The role of intestinal microbiota in murine models of acetaminophen induced hepatotoxicity // Liver Int. – 2015. – Vol. 35, № 3. – P.764–773.
11. Clayton T.A., Baker D., Lindon J. C., Everett J. R., Nicholson J. K. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism // Proc Natl Acad Sci USA. – 2009. – Vol. 106, № 34. – P. 14728–14733.
12. Nowak A, Libudzisz Z. Ability of intestinal lactic bacteria to bind or/and metabolise phenol and p-cresol // Ann Microbiol. – 2007. – Vol. 57, № 3. – P 329–335.