



<https://doi.org/10.34883/PI.2023.12.4.016>
УДК 615.33:[611.36:611.018.54]-092.9



Шейбак В.М.¹, Якубцевич Р.Э.^{1,2}, Дорошенко Е.М.¹, Островская О.Б.¹, Лемеш А.В.^{1,2} ✉, Кравчук Р.И.¹

¹ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

² Гродненская университетская клиника, Гродно, Беларусь

Влияние эртапенема на структурные изменения ткани печени, а также пул свободных аминокислот в плазме и печени крыс

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: проведение исследования, статистический анализ полученных результатов, написание статьи – Дорошенко Е.М., Островская О.Б., Кравчук Р.И.; сбор данных, статистический анализ полученных результатов, написание статьи, работа с источниками литературы – Лемеш А.В., Шейбак В.М.; написание статьи, работа с источниками литературы – Якубцевич Р.Э.

Подана: 05.10.2023

Принята: 27.11.2023

Контакты: anton_lemesh@mail.ru

Резюме

Введение. Карбапенемы играют важную роль в нашем арсенале антибиотиков. Из многих сотен различных β-лактамов карбапенемы обладают самым широким спектром активности и наибольшей эффективностью против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Карбапенемы легко проникают через клеточную стенку бактерий и взаимодействуют со специфическими пенициллинсвязывающими белками на поверхности цитоплазматической мембраны, тормозят синтез пептидогликанового слоя клеточной стенки, подавляют активность транспептидазы, способствуют высвобождению аутолитических ферментов, что в итоге вызывает повреждение и гибель бактерий. Эртапенем – новый карбапенем, разработанный для устранения фармакокинетических недостатков (короткий период полувыведения) имипенема и меропенема.

Цель. Изучить влияние эртапенема на печень, а также пул свободных аминокислот в плазме.

Материалы и методы. В эксперименте на крысах проведен анализ структуры печени после внутрибрюшинного введения эртапенема и 0,9% NaCl, а также определен пул свободных аминокислот в плазме крови методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты. Воздействие антибиотика приводило к развитию слабой либо умеренной воспалительной реакции в печени животных, преимущественно к лимфоцитарной инфильтрации в области центральных вен, без проникновения в дольку. Регистрировалась внутридольковая воспалительная реакция в виде мелких и средних очагов круглоклеточных элементов, в составе которых местами выявлялись гепатоциты, гибнущие по апоптозному типу. Изучение аминокислотного фонда и спектра отдельных аминокислот в ткани печени показало достоверно значимое увеличение общего количества аминокислот и их азотсодержащих метаболитов, общего количества протеиногенных аминокислот, общего количества заменимых аминокислот.

Заключение. Воздействие эртапенема инициировало слабо либо умеренно выраженную воспалительную реакцию в печени крыс. Аминокислотный дисбаланс, наблюдаемый в плазме крови, может являться следствием как морфологических изменений в кишечнике, так и нарушения биосинтетических процессов в печени.

Ключевые слова: эртапенем, свободные аминокислоты, печень, биосинтез белка

Sheybak V.¹, Yakubtsevich R.^{1,2}, Doroshenko E.¹, Ostrovskaya O.¹, Lemesh A.^{1,2} ✉,
Kravchuk R.¹

¹ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

² Grodno University Clinic, Grodno, Belarus

The Effect of Ertapenem on Structural Changes in Liver Tissue, as Well as the Pool of Free Amino Acids in the Plasma and Liver of Rats

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: conducting the study, statistical analysis of the results obtained, writing the article – Doroshenko E., Ostrovskaya O., Kravchuk R.; data collection, statistical analysis of the results obtained, writing an article, working with literature sources – Lemesh A., Sheybak V.; writing an article, working with literature sources – Yakubtsevich R.

Submitted: 05.10.2023

Accepted: 27.11.2023

Contacts: anton_lemesh@mail.ru

Abstract

Introduction. Carbapenems play an important role in our arsenal of antibiotics. Of the many hundreds of different β -lactams, carbapenems have the broadest spectrum of activity and the greatest effectiveness against Gram-positive and Gram-negative bacteria. Carbapenems easily penetrate the bacterial cell wall and interact with specific penicillin-binding proteins on the surface of the cytoplasmic membrane, inhibit the synthesis of the peptidoglycan layer of the cell wall, suppress transpeptidase activity, and promote the release of autolytic enzymes, which ultimately causes damage and death of bacteria. Ertapenem is a new carbapenem developed to overcome the pharmacokinetic disadvantages (short half-life) of imipenem and meropenem.

Purpose. To study the effect of ertapenem on the liver, as well as the pool of free amino acids in plasma.

Materials and methods. In an experiment on rats, the liver structure was analyzed after intraperitoneal administration of ertapenem and 0.9% NaCl, and the pool of free amino acids in the blood plasma was determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography.

Results. Exposure to the antibiotic led to the development of a weak or moderate inflammatory reaction in the liver of animals, predominantly to lymphocytic infiltration in the area of the central veins, without penetration into the lobule. An intralobular inflammatory reaction was recorded in the form of small and medium-sized foci of round cell elements, which in some places contained hepatocytes dying according to the apoptotic type. The study of the amino acid pool and the spectrum of individual amino

acids in liver tissue showed a significantly significant increase in the total amount of amino acids and their nitrogen-containing metabolites, the total amount of proteinogenic amino acids, and the total amount of non-essential amino acids.

Conclusion. Exposure to ertapenem initiated a mild to moderate inflammatory response in the liver of rats. The amino acid imbalance observed in the blood plasma may be a consequence of both morphological changes in the intestine and disruption of biosynthetic processes in the liver.

Keywords: ertapenem, free amino acids, liver, protein biosynthesis

■ ВВЕДЕНИЕ

Эртапенем – карбапенемовый антибиотик широкого спектра действия, используемый в основном для лечения тяжелых аэробных грамотрицательных бактериальных инфекций. Благодаря 1 β -метиловой группе он обладает повышенной стабильностью в отношении почечной дегидропептидазы-I (DHP-I), поэтому его не нужно комбинировать с циластатином для защиты от почечного DHP-I. Кроме того, анионная боковая цепь бензоата обеспечивает высокую степень связывания соединения с белками, а период его полураспада составляет ~3,8 часа [3]. Потребление карбапенемов возросло после распространения β -лактамаз расширенного спектра действия (ESBL), которые в настоящее время распространяются за пределами лечебных учреждений [1]. Некоторые авторы выступают за использование эртапенема как элемента стратегии снижения резистентности к меропенему и имипенему [2]. Эртапенем связывается с белками плазмы в зависимости от концентрации: от 96% при общей концентрации в плазме 10 мг/л до 84% при общей концентрации в плазме 300 мг/л. Таким образом, только 4–16% общей концентрации в плазме могут проникать во внесосудистое пространство и обуславливают антимикробную активность [4]. Эртапенем адекватно проникает в неинфицированные интраабдоминальные органы с концентрацией в тканях выше МПК₉₀ для чувствительных бактерий, обнаруженных при инфекциях органов брюшной полости. Самые низкие средние концентрации в тканях через 6 ч. после введения составляют 3,3 мг/кг в поджелудочной железе и 3,1 мг/кг – в печени [5].

Карбапенемы также связаны с редкими случаями клинически выраженного острого холестатического повреждения печени. Легкое, транзиторное, бессимптомное повышение уровня аминотрансфераз в сыворотке крови наблюдается примерно у 5% пациентов, получающих парентеральный эртапенем в течение 5–14 дней. Эти нарушения обычно протекают самостоятельно и бессимптомно. За тот ограниченный период, в течение которого он был доступен, не было зарегистрировано ни одного случая гепатита с желтухой. Тем не менее при применении других карбапенемов сообщалось о нескольких случаях холестатической желтухи, возникшей во время или вскоре после терапии. Эртапенем и другие карбапенемы не были связаны со случаями острой печеночной недостаточности. Причина легкого, преходящего повышения уровня ферментов сыворотки крови во время терапии эртапенемом неизвестна. Холестатический гепатит, вызванный карбапенемами, вероятно, является иммуноаллергическим [6].

Информации о возможной перекрестной чувствительности к повреждению печени у различных бета-лактамов антибиотиков мало, но пациентам с клинически выраженным поражением печени, вызванным эртапенемом, вероятно, следует избегать других карбапенемов.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

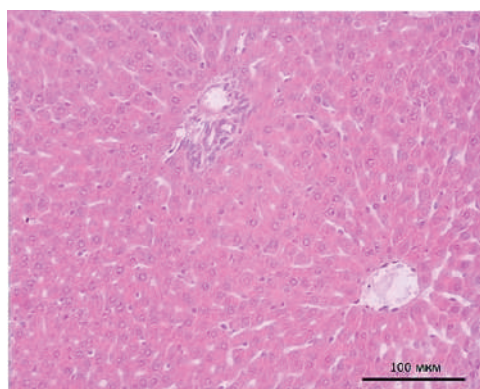
Провести анализ влияния Инванза (эртапенема) на морфологию печени и пул свободных аминокислот в печени и плазме крови крыс.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

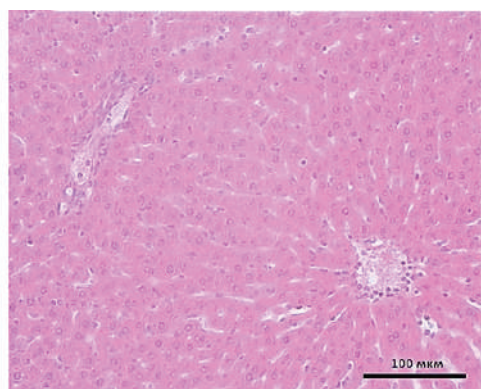
Гистологическое исследование осуществляли у 5 животных из контрольной группы и 6 животных опытной группы. Контрольной группе в течение 10 суток внутрибрюшинно вводили 0,9%-ный раствор NaCl; животным опытной группы в течение 10 суток внутрибрюшинно вводили Инванз (эртапенем) в дозе 60 мг/кг. Все опыты проведены с учетом Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных. На данное исследование получено разрешение Комитета по биомедицинской этике Гродненского государственного медицинского университета. Непосредственно после декапитации вскрывали брюшную полость крысы, производили забор образца ткани печени из правой медиальной доли. Образцы фиксировали в жидкости Карнуа, а затем обрабатывали по стандартной методике [7]. Парафиновые срезы толщиной около 5 мкм окрашивали гематоксилином-эозином и по Шабадаш. Полученные препараты просматривали в микроскопе Leica DM1000, цифровые фотоснимки для демонстрации получали при помощи камеры Panasonic WV-CP410/G. Определение свободных аминокислот в ткани печени и плазме производили методом обращенно-фазной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с о-фталевым альдегидом и 3-меркаптопропионовой кислотой с изократическим элюированием и детектированием по флуоресценции (231/445 нм). Определение ароматических аминокислот (тирозина и триптофана) проводили методом ион-парной ВЭЖХ с детектированием по природной флуоресценции (280/320 нм для тирозина и 280/340 нм для триптофана) [8]. Все определения проводили с помощью хроматографической системы Agilent 1100, прием и обработка данных – с помощью программы AgilentChemStation A10.01. Математическая обработка данных проведена с помощью программы Statistica 6.0.

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

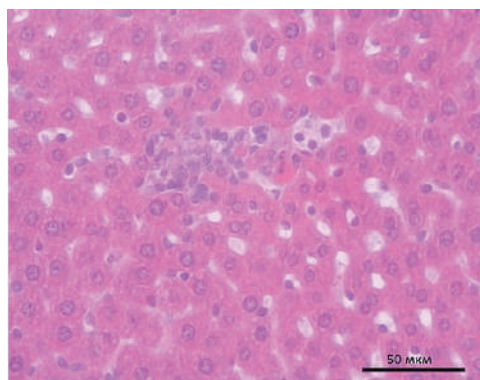
В контрольной группе гистологически ткань печени животных характеризовалась обычной дольчатой архитектоникой. Гепатоциты образовывали анастомозирующие ряды трабекул, контактирующих с разветвленным кровеносным лабиринтом синусоидов. В области отдельных портальных трактов регистрировалась слабовыраженная лимфогистиоцитарная инфильтрация (ЛГИ), в большинстве случаев она отсутствовала. Просветы центральных вен преимущественно были свободными, лишь в некоторых выявлялись малочисленные круглоклеточные элементы (см. рисунок А). В различных участках некоторых долек печени наблюдались единичные мелкоочаговые скопления клеток воспалительного ряда.



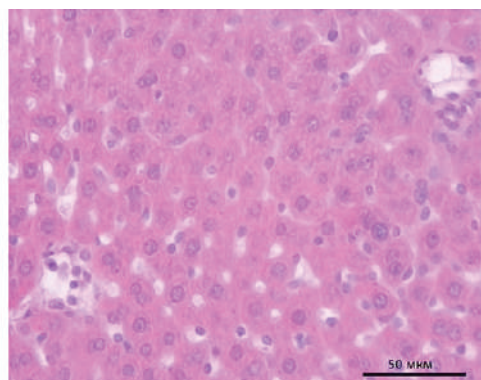
A



B



C



D

Ткань печени: А – контрольная группа, отсутствие внутридольковой инфильтрации; В – опытная группа, лимфоцитарная инфильтрация; С – опытная группа, внутридольковая воспалительная реакция с гибелью гепатоцитов; D – опытная группа, пустоты, окруженные лимфоидными клетками

Liver tissue: A – control group, absence of intralobular infiltration; B – experimental group, lymphocytic infiltration; C – experimental group, intralobular inflammatory reaction with death of hepatocytes; D – experimental group, voids surrounded by lymphoid cells

В опытной группе суточное воздействие антибиотика приводило к развитию слабой либо умеренной воспалительной реакции в печени животных, преимущественно к лимфоцитарной инфильтрации в области центральных вен без проникновения в дольку (см. рисунок В). Кроме того, регистрировалась внутридольковая воспалительная реакция в виде мелких и средних очагов круглоклеточных элементов, в составе которых местами выявлялись гепатоциты, гибнущие по апоптозному типу, морфологическими признаками которого является гомогенность и темно эозинфильный оттенок цитоплазмы, а также пикноз ядер (см. рисунок С). Наряду с этим наблюдалась картина, когда вместо погибших гепатоцитов обнаруживались пустоты, окруженные лимфоидными клетками, что, возможно, является результатом гибели клеток по некротическому типу (см. рисунок D). Оценка лимфогистиоцитарной

инфильтрации портальных трактов не выявила существенной разницы по сравнению с контрольными животными (см. рисунок В). Состояние микроциркуляторного русла было без особенностей.

Изучение характеристик аминокислотного фонда и спектра отдельных аминокислот в плазме (табл. 2) показало увеличение общего количества аминокислот и их метаболитов, наибольший вклад в данное увеличение внесли протеиногенные аминокислоты, содержание которых увеличивается на 7%. Эти изменения подтверждаются достоверно значимым увеличением соотношения протеиногенных/азотсодержащих метаболитов аминокислот ($p<0,05$). Обращает на себя внимание увеличение как общего количества незаменимых аминокислот, так и снижение соотношения заменимых/незаменимых аминокислот.

Нельзя исключить, что причиной нарушения биосинтеза белка может быть торможение абсорбции незаменимых аминокислот триптофана и метионина (табл. 1). Триптофан в минимальном количестве включается в белки, но его можно рассматривать как одну из наиболее лимитирующих аминокислот среди их общего пула. Дефицит метионина, вероятно, является причиной уменьшения количества конечного продукта пути транссульфурации таурина.

Изучение аминокислотного фонда и спектра отдельных аминокислот в ткани печени показало достоверно значимое ($p<0,05$) увеличение общего количества аминокислот и их азотсодержащих метаболитов, общего количества протеиногенных аминокислот, общего количества заменимых аминокислот. Катаболизм протеиногенных аминокислот определяет увеличение общего количества метаболитов, а увеличение соотношения аргинин/орнитин говорит об активации цикла мочевины (табл. 4).

Таблица 1
Концентрации свободных аминокислот в плазме крови животных, получавших Инванз (эртапенем) (внутрибрюшинно 60 мг/кг 10 дней), мкмоль/л, $M\pm m$
Table 1
Concentrations of free amino acids in the blood plasma of animals treated with Invanz (ertapenem) (intraperitoneal 60 mg/kg for 10 days), $\mu\text{mol/l}$, $M\pm m$

	Контроль	Эртапенем
CA	0,3 $\pm$ 0,02	0,4 $\pm$ 0,09
Asp	127 $\pm$ 10	104 $\pm$ 10
Glu	622 $\pm$ 50	576 $\pm$ 33
Asn	143 $\pm$ 3	136 $\pm$ 4
Ser	510 $\pm$ 23	542 $\pm$ 4
aAAA	8,5 $\pm$ 0,8	7 $\pm$ 0,37
Gln	1315 $\pm$ 61	1353 $\pm$ 50
His	150 $\pm$ 8	133 $\pm$ 5
3MHis	0,9 $\pm$ 0,16	0,8 $\pm$ 0,14
Gly	780 $\pm$ 44	750 $\pm$ 46
PEA	1,3 $\pm$ 0,45	1,5 $\pm$ 0,45
Thr	901 $\pm$ 45	916 $\pm$ 30
1MHis	11,3 $\pm$ 0,63	10,1 $\pm$ 0,61
Ctr	185 $\pm$ 10	171 $\pm$ 13



Окончание таблицы 1

Arg	348±16	296±21
Ans	9,8±0,75	12,2±0,99
bAla	16±1	13±1
Ala	754±35	834±48
Tau	637±30	445±25*
bABA	0,3±0,04	0,4±0,07
GABA	13,1±1,57	13,3±2,62
Tyr	164±12	140±8
aABA	87±9	75±8
EA	76±6	65±5
Val	515±24	466±19
Met	129±3	107±4*
Ctn	3,4±0,86	2,3±0,12
Trp	347±29	263±2*
Phe	145±4	138±6
Ile	297±17	266±11
Leu	361±19	338±19
HLys	8,8±0,36	8,2±0,39
Orn	75±5	84±3
Lys	1105±54	1124±102

Таблица 2

Структура пула свободных аминокислот плазмы крови животных, получавших Инванз (эртапенем) (внутрибрюшинно 60 мг/кг 10 дней), мкмоль/л, М±м

Table 2

Structure of the pool of free amino acids in the blood plasma of animals treated with Invanz (ertapenem) (intraperitoneal 60 mg/kg for 10 days), $\mu\text{mol/l}$, $M\pm m$

Исследуемый показатель	Контроль	Эртапенем
Общее количество аминокислот и их азотсодержащих метаболитов	8962±579	9341±125
Общее количество протеиногенных аминокислот	7846±561	8446±108
Общее количество азотсодержащих метаболитов аминокислот	1117±43	895±38*
Протеиногенные/азотсодержащие метаболиты аминокислот	7±0,48	9,5±0,38*
Общее количество заменимых аминокислот	4872±168	4829±126
Общее количество незаменимых аминокислот	2974±419	3617±64
Заменимые/незаменимые аминокислоты	1,9±0,36	1,3±0,05
АРУЦ	1173±58	1069±48
АРУЦ/ААА	541±80	542±15
ААА	2,5±0,41	2±0,04
Общее количество серосодержащих аминокислот	727±48	555±29
Аргинин/орнитин	4,7±0,24	3,5±0,24
Аргинин/цитруллин	1,9±0,11	1,7±0,05
Глутамат + глутамин	1937±105	1929±38
Глутамат/глутамин	0,5±0,02	0,4±0,04

Таблица 3

Концентрации свободных аминокислот в ткани печени животных, получавших Инванз (эртапенем) (внутрибрюшинно 60 мг/кг 10 дней), нмоль/г, M±m

Table 3

Concentrations of free amino acids in the liver tissue of animals treated with Invanz (ertapenem) (intraperitoneal 60 mg/kg for 10 days), nmol/g, M±m

	Контроль	Эртапенем
CA	1,6±0,27	1,2±0,17
Asp	938±52	1316±133*
Glu	3088±174	4187±424*
Asn	108±7	130±12
Ser	1243±78	1920±296
aAAA	175±6	220±15*
Gln	6684±351	9121±1202
His	616±27	713±79
3MHis	0,4±0,13	0,5±0,1
Gly	4286±281	5609±441*
PEA	2045±271	3097±546
Thr	853±54	1260±184
1MHis	2,5±0,23	3,1±0,55
Ctr	70±2	72±6
Arg	27±2	25±2
bAla	296±18	460±66*
HpTau	892±207	494±74
Ala	730±49	1028±120*
Tau	3275±533	2485±117
bABA	39±5	77±14*
GABA	17,5±1,96	25,6±3,96
Tyr	124±6	135±9
aABA	127±11	132±21
EA	246±10	307±45
Val	307±20	333±28
Met	68±3	86±12
Ctn	14,5±1,5	18,1±1,23
Trp	195±6	199±12
Phe	111±8	128±9
Ile	218±24	227±18
Leu	302±19	329±25
HLys	53±11	39±2
Orn	506±45	569±33
Lys	1019±69	1021±148



Таблица 4

Структура пула свободных аминокислот в ткани печени животных, получавших Инванз (эртапенем) (внутрибрюшинно 60 мг/кг 10 дней), нмоль/г, М±m

Table 4

Structure of the pool of free amino acids in the liver tissue of animals treated with Invanz (ertapenem) (intraperitoneal 60 mg/kg for 10 days), nmol/g, M±m

Исследуемый показатель	Контроль	Эртапенем
Общее количество аминокислот и их азотсодержащих метаболитов	25803±76	35415±3247*
Общее количество протеиногенных аминокислот	20363±62	27597±2792*
Общее количество азотсодержащих метаболитов аминокислот	5440±126	7817±734
Протеиногенные/азотсодержащие метаболиты аминокислот	5,5±1,6	3,6±0,37
Общее количество заменимых аминокислот	17630±58	24184±2582*
Общее количество незаменимых аминокислот	2733±215	3413±277
Заменимые/незаменимые аминокислоты	6,7±0,63	7,1±0,49
АРУЦ	827±62	890±71
АРУЦ/ААА	430±15	462±29
ААА	1,9±0,09	1,9±0,04
Общее количество серосодержащих аминокислот	3355±610	2584±123
Аргинин/орнитин	0,1±0,002	0,04±0,002*
Аргинин/цитруллин	0,4±0,01	0,4±0,01
Глутамат + глутамин	9772±523	13308±1594
Глутамат/глутамин	0,5±0	0,5±0,03

Среди незаменимых аминокислот наблюдалось достоверно значимое ($p<0,05$) увеличение концентрации аспартата, глутамата, аланина. Среди катаболитов аминокислот выросло количество бета-аминомасляной кислоты (табл. 3).

■ ВЫВОДЫ

1. Воздействие эртапенема инициировало слабо либо умеренно выраженную воспалительную реакцию в печени крыс, которая местами сопровождалась гибелью отдельных гепатоцитов без морфологических признаков развития других дистрофических процессов.
2. Аминокислотный дисбаланс, наблюдаемый в плазме крови, может являться как следствием морфологических изменений в кишечнике, так и нарушения биосинтетических процессов в печени.
3. Увеличение в плазме крови протеиногенных аминокислот свидетельствует о нарушении биосинтеза белка в печени. Данные изменения могут иметь глобальные последствия для всего организма.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Rocha J.L., Tuon F.F., Johnson J.R. Sex, drugs, bugs, and age: rational selection of empirical therapy for outpatient urinary tract infection in an era of extensive antimicrobial resistance. *Braz J Infect Dis.* 2012 Mar-Apr;16(2):115–21. doi: 10.1016/s1413-8670(12)70291-x.
2. Abdallah M., Badawi M., Amirah M.F., Rasheed A., Mady A.F., Alodat M., Alharthy A. Impact of carbapenem restriction on the antimicrobial susceptibility pattern of *Pseudomonas aeruginosa* isolates in the ICU. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Nov 1;72(11):3187–3190. doi: 10.1093/jac/dkx273.
3. Cunha B.A. Ertapenem. A review of its microbiologic, pharmacokinetic and clinical aspects. *Drugs Today (Barc).* 2002 Mar;38(3):195–213. doi: 10.1358/dot.2002.38.3.820127.
4. Nix D.E., Majumdar A.K., DiNubile M.J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ertapenem: an overview for clinicians. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Jun;53 Suppl 2:ii23–8. doi: 10.1093/jac/dkh205.
5. Wittau M., Wagner E., Kaever V., Koal T., Henne-Bruns D., Isenmann R. Intraabdominal tissue concentration of ertapenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006;57(2):12–316. <https://doi.org/10.1093/jac/dki459>
6. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012. PMID: 31643176.
7. Volkova O.V., Eletsky Yu.K. *Fundamentals of histology with histological techniques*. M.: Medicine, 1982; 304 p. (in Russian)
8. Doroshenko E.M. Methodological aspects and difficulties of analyzing free (physiological) amino acids and related compounds in biological fluids and tissues. Republican scientific conference on analytical chemistry with international participation "Analytics of the Republic of Belarus – 2010": collection of abstracts. Minsk, 2010;126 p. (in Russian)