

Особенности метаболома сыворотки крови при язвенном колите и целиакии по данным газовой хроматографии — масс-спектрометрии

С.И. Ситкин^{1,2}, Е.И. Ткаченко¹, Т.Я. Вахитов², Л.С. Орешко¹, Т.Н. Жигалова¹

¹СЗГМУ им. И.И. Мечникова, ²Гос. НИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, e-mail: sitkins@mail.ru

Метаболомика – развивающаяся наука, занимающаяся изучением и анализом метаболома – совокупности всех низкомолекулярных метаболитов клетки, ткани, органа или организма в целом. Одной из целей метаболомики является изучение ответных реакций организма на патофизиологические воздействия путем оценки уровней низкомолекулярных метаболитов в биологических жидкостях и тканях, а также их динамики. Микробиота кишечника вовлечена в развитие аутоиммунного воспаления при язвенном колите и целиакии. Газовая хроматография – масс-спектрометрия (ГХ-МС) сыворотки крови позволяет оценить совокупный метаболизм организма (эндогенный и микробный), который может быть нарушен при обоих состояниях. Целью исследования явилось изучение методом ГХ-МС метаболома сыворотки крови у пациентов с язвенным колитом и целиакией. В образцах сыворотки крови, полученных от 75 пациентов (20 пациентов с легкими и среднетяжелыми формами язвенного колита, 35 пациентов с целиакией и 20 практически здоровых добровольцев), было идентифицировано 84 метаболита, по крайней мере, 18 из которых имели комбинированное происхождение (эндогенное + микробное). В сыворотке крови пациентов с язвенным колитом выявлено значимое повышение уровня фенилуксусной, парагидроксифенилуксусной, индолуксусной, янтарной и fumarовой кислот, а также снижение уровня фенилпропионовой кислоты. У пациентов с целиакией отмечалось достоверное повышение индолуксусной, индолпропионовой, янтарной и fumarовой кислот. Повышенный уровень янтарной кислоты подтверждал гипотезу о ее возможном повреждающем действии на слизистую оболочку кишечника, особенно при язвенном колите. Пероральное применение метабіотики (масляной кислоты в комбинации с инулином) на фоне базисной терапии месалазином у больных язвенным колитом и на фоне безглютеновой диеты у пациентов с целиакией улучшало клиническую симптоматику, метаболомический профиль сыворотки крови и показатели микробиоценоза, достоверно устраняя анаэробный дисбаланс, повышая долю бутират-продуцирующих бактерий и нормализуя патологически повышенный уровень янтарной кислоты.

Ключевые слова: бутират, инулин, метабіотики, метаболом, метаболомика, целиакия, язвенный колит.

Введение

Метаболомика, наряду с другими omics-технологиями (геномикой, транскриптомикой и протеомикой), является неотъемлемой частью современной молекулярной биологии и одним из наиболее развивающихся научных направлений, как в фундаментальной, так и в клинической медицине. Метаболомика занимается изучением низкомолекулярных соединений (НМС), входящих в состав метаболома, представляющего собой комплекс всех низкомолекулярных (как правило, не более 1–1,5 кДа) метаболитов в клетке, ткани, органе, биологической жидкости, являющихся промежуточными или конечными продуктами обмена веществ.

В 1971 г. Linus Pauling с соавт. впервые высказали идею о том, что вся информация о функциональном состоянии организма отражена в качественном и количественном составе биологических жидкостей организма. Позже Nicholson J.K. с соавт. (1999) ввел понятие «метабіомика», означающее динамический метабіолический ответ живых систем на биологические стимулы, в то время как под термином «метабіомика» понималась наука, изучающая метабіолические профили на клеточном и органном уровне и связанная преимущественно с нормальным эндогенным метаболизмом. В настоящее время разница между двумя этими понятиями практически упразднена, и в мировой литературе чаще используется термин «метабіомика».

Целью метабіомики является изучение ответной реакции организма на какое-либо патофизиологическое воздействие, например болезнь, воздействие лекарственных препаратов или окружающей среды. В результате любого воздействия на организм происходят множественные изменения концентраций различных метабіолитов с целью поддержания гомеостаза. Внутриклеточные метабіолиты находятся в динамическом равновесии с метабіолитами биологических жидкостей, омывающих клетки. Таким образом, любой клеточный ответ будет отражен

в изменяющемся составе биологических жидкостей организма, таких как кровь, моча, семенная, фолликулярная или церебральная жидкости. Анализируя полученные метабіолические профили можно получить своеобразный «отпечаток» (fingerprint), отражающий физиологическое состояние организма. Для изучения метабіолических профилей в качестве исследуемых образцов чаще всего используются биологические жидкости, такие как сыворотка (плазма) крови, моча, асцитическая жидкость, слюна, бронхиальные смывы и т.д., поскольку они наиболее просты для забора и пробоподготовки. Однако наибольшее количество исследований до настоящего времени проводилось с сывороткой крови и мочой.

Для проведения метабіолических исследований чаще всего используются ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия (в виде прямого масс-спектрометрического анализа или в сочетании с газовой хроматографией, высокоэффективной жидкостной хроматографией, капиллярным электрофорезом). Оба метода имеют свои преимущества и недостатки. Прямой масс-спектрометрический анализ не требует предварительной обработки образцов, однако при использовании данной методики происходит подавление сигнала отдельных метабіолитов, приводящее к искажению полученных результатов. В сочетании с жидкостной хроматографией масс-спектрометрия обладает более высокой чувствительностью и позволяет идентифицировать метабіолиты, имеющие очень низкие концентрации. Однако ее чувствительность зависит от уровня pH и гидрофобности метабіолитов. Методы предварительной обработки, необходимые для исследования образцов с помощью данной методики, такие как быстрая заморозка, экстрагирование, могут изменить структуру метабіолитов и дать, в итоге, искаженные результаты. Перспективным является применение высокоэффективной жидкостной хроматографии, сопряженной с масс-спектрометрией, при которой в сыворотке крови измеряется до 2000 метабіолитов.

По сравнению с масс-спектрометрией ЯМР-спектроскопия менее чувствительна и требует наличия более дорогого оборудования. Однако ЯМР-спектроскопию можно использовать для исследования как биологических жидкостей, так и биологических тканей в нативном состоянии (или же с минимальной обработкой образцов). Другое значительное преимущество ЯМР-спектроскопии заключается в том, что метаболиты, обнаруженные и проанализированные *in vitro*, могут быть исследованы и *in vivo*. Используя сочетание ЯМР-спектроскопии и МРТ можно визуализировать специфические метаболиты *in vivo* и подтвердить достоверность данных, полученных при исследовании *in vitro*.

Отличительной особенностью метаболомических исследований в гастроэнтерологии является то, что один из акцентов в них, а иногда и основной акцент, делается на изучение метаболитов микробного происхождения. Кишечник (прежде всего, толстая кишка) в «суперорганизме» человека и микробиоты представляет собой своеобразный биореактор с практически неограниченным метаболомическим потенциалом, определяемым возможностями именно микробиома. Организм человека при этом «сотрудничает» с микробиотой благодаря так называемому явлению метаболомической интеграции, существование которого недавно было постулировано отечественными учеными (Белобородова Н.В., 2012). При этом человек получает от микроорганизмов целый ряд ключевых метаболитов, не только поддерживающих его энергетический баланс (короткоцепочечные жирные кислоты и др.), но и активно участвующих в регуляции экспрессии его генов, нейротрансмиссии и иммуномодуляции (Tremaroli V. & Bäckhed F., 2012).

По мнению ряда исследователей, уровень ряда низкомолекулярных метаболитов в крови, например, некоторых карбоновых кислот, во многом определяется именно метаболомической активностью микробиоты кишечника (Белобородова Н.В. и соавт., 2009, 2011; Beloborodova N. et al., 2012; Osipov G.A. & Verkhovtseva N.V., 2011). В связи с этим особый интерес представляют метаболомические исследования при таких заболеваниях органов пищеварения, как воспалительные заболевания кишечника (язвенный колит и болезнь Крона), синдром раздраженного кишечника (СРК), целиакия (глютеновая энтеропатия), кишечные инфекции (*Clostridium difficile*, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*) и др.), где роль нарушений микробиоценоза кишечника весьма велика (DuPont A.W. & DuPont H.L., 2011).

Дифференциально-диагностические возможности метаболомических исследований были продемонстрированы в исследовании Schicho R. и соавт. (2012), показавшем, что количественное метаболомическое профилирование сыворотки, плазмы и мочи позволяет достоверно разделить группы пациентов с ВЗК и здоровых лиц. При этом у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника уровень метанола, маннозы, изолейцина, муравьиной и 3-метил-2-оксвалериановой кислот в крови был значимо повышен, а уровень мочевины и лимонной кислоты понижен. Изменение уровня некоторых метаболитов у больных ВЗК (повышение уровня креатина в плазме, снижение уровня гиппуровой кислоты в моче), по мнению авторов, могло быть связано с нарушениями микробиоценоза кишечника. В другом исследовании были показаны возможности многомерного индекса на основе технологии AminoIndex™, отражающего метаболомический аминокислотный профиль плазмы крови («аминограмму») и позволяющего проводить дифференциальную диагностику как между пациентами с язвенным колитом и болезнью Крона, так и между больными ВЗК и здоровыми лицами (Hisamatsu T. et al., 2012).

Интенсивно ведутся исследования и в области метаболомической диагностики колоректального рака. Так, Nishiumi S. и соавт.

(2012) представили новую модель ранней диагностики колоректального рака, основанную на определении метаболомического профиля сыворотки крови методом хромато-масс-спектрометрии. Показатели чувствительности, специфичности и точности модели, основанной на определении нескольких сывороточных биомаркеров, в том числе альфа-оксимасляной (2-оксибутановой) кислоты, аспарагиновой кислоты, кинуренина и цистамина, составили 85,0%, 85,0% и 85,0% соответственно и были сопоставимыми или даже более высокими, чем показатели чувствительности, специфичности и точности стандартных онкомаркеров – раково-эмбрионального (карциноэмбрионального) антигена (РЭА [КЭА]) (35,0%, 96,7% и 65,8% соответственно) и СА19-9 (16,7%, 100,0% и 58,3% соответственно). Оценка метаболомического профиля сыворотки крови позволит, вероятно, не только выявлять колоректальный рак на ранних стадиях, но и дифференцировать его стадии (Farshidfar F. et al., 2012). В исследовании Qiu Y. и соавт. (2010) было показано, что при колоректальном раке существенно повышается уровень фенилуксусной и парагидроксифенилуксусной кислот в моче. В свою очередь, в другом исследовании Cheng Y. и соавт. (2012) показали хорошие диагностические возможности панели, включающей такие метаболиты мочи, как лимонная, гиппуровая, 2-аминомасляная, миристиновая и кинуреновая кислоты, паракрезол и путресцин, являющиеся продуктами совместного метаболизма организма хозяина и микробиоты кишечника.

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилось изучение методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС) метаболома сыворотки крови у пациентов с язвенным колитом и целиакией (глютеновой энтеропатией), а также оценка динамики изменений метаболомического профиля и показателей микробиоценоза кишечника на фоне приема метабіотики – комбинированного препарата масляной кислоты (бутирата кальция) и инулина.

Материалы и методы

В открытое сравнительное рандомизированное исследование включались обследованные практически здоровые лица (добровольцы) обоего пола в возрасте от 18 до 60 лет и соответствующие им по полу и возрасту пациенты с легкими/среднетяжелыми формами язвенного колита в фазе обострения и больные целиакией, подписавшие добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Всего в исследование было включено 75 пациентов: 20 пациентов с легкими и среднетяжелыми формами язвенного колита, 35 пациентов с целиакией и 20 практически здоровых добровольцев.

Диагноз язвенного колита устанавливался на основании данных анамнеза, эндоскопического (колоноскопия), гистоморфологического (гистологическое исследование биоптатов слизистой оболочки толстой кишки) и биохимического исследований. Клиническая и эндоскопическая активность воспалительного процесса оценивались с помощью индексов Мейо и Рахмилевича (Schroeder K.W. et al., 1987; Sutherland L.R. et al., 1987; Rachmilewitz D., 1989).

Диагноз целиакии устанавливали на основании данных анамнеза, эндоскопического, гистоморфологического и биохимического исследований (морфометрия слизистой оболочки ретробульбарного отдела двенадцатиперстной кишки, HLA-типирование, иммунологическое исследование крови) (Орешко Л.С., 2008).

В исследование не включались пациенты с тяжелыми и осложненными формами язвенного колита (в том числе пациенты с внекишечными осложнениями и проявлениями), требующими назначения кортикостероидов и/или иммуносупрессантов, па-

циенты с хроническими диффузными заболеваниями печени различной этиологии, пациенты с тяжелыми сопутствующими заболеваниями системного характера, в том числе пациенты с сердечно-сосудистой, дыхательной, печеночной и почечной недостаточностью, пациенты с эндокринной патологией, а также женщины в период беременности и лактации.

Здоровые добровольцы (группа 1) в течение 28 дней получали метабиотик – комбинированный препарат масляной кислоты и инулина (Закофальк NMX, «Др. Фальк Фарма ГмБХ») по 3 табл. в день.

Больные язвенным колитом (группа 2) и больные целиакией (группа 3) были рандомизированы внутри своих групп в 2 подгруппы (2а и 2б, 3а и 3б соответственно). Пациенты, вошедшие в подгруппы 2а и 3а, в течение 28 дней получали только стандартную терапию – пероральный месалазин (салофальк в таблетках или гранулах) в дозе 3,0 г в сутки при язвенном колите (при необходимости – в комбинации с ректальным месалазином в форме свечей, суспензии или пены в дозе 7,0–14,0 г в неделю и средствами симптоматической терапии) и безглютеновую диету при целиакии.

Пациенты, вошедшие в подгруппы 2б и 3б, получали в течение 28 дней в дополнение к стандартной терапии метабиотик – комбинированный препарат масляной кислоты (бутирата) и инулина (Закофальк NMX) по 3 табл. в день.

Прием любых антибактериальных, противовирусных, противогрибковых и противопаразитарных средств, пробиотиков, пребиотиков и препаратов (БАД к пище), содержащих бактериальные метаболиты, в течение всего периода исследования исключался. При условии приема таких препаратов в прошлом, пациенты (в том числе и практически здоровые лица) для включения в исследования должны были прекратить их прием, по крайней мере, за 30 дней до начала исследования.

Забор венозной крови, получение и хранение сыворотки для целей исследований проводили в соответствии с действующими стандартами: ГОСТ Р 53079.4–2008 «Технологии лабораторные клинические. Обеспечение качества клинических лабораторных исследований. Часть 4. Правила ведения преаналитического этапа» (введен с 01.01.2010 г.); ГОСТ Р ИСО 6710-2009 и другими нормативными документами. Забор крови у пациентов производили утром натощак с помощью вакуумных системы для взятия венозной крови RusTech. После забора образцы крови для получения сыворотки подвергали центрифугированию в течение 15 мин. при скорости вращения 3000 оборотов. Далее полученную сыворотку с помощью одноразовых пластмассовых пипеток (емкостью до 3 мл) распределяли в 2 стерильные пробирки с герметично закручивающимися крышками (не менее 0,5 мл сыворотки в каждую пробирку). После маркировки пробирки помещали в специальный биомедицинский морозильник, предназначенный для хранения компонентов крови и вакцин, диагностических образцов и проб при температурах от –20 °С до –35 °С. Хранение образцов сыворотки крови осуществляли при температуре –20 °С. В рамках исследования было организовано хранение сывороток крови всех принимавших участие в исследовании здоровых добровольцев и больных – создан банк сывороток крови. При этом сыворотку крови из одной пробирки (2 пробирки на каждого пациента) использовали для определения метаболомического профиля крови методом ГХ-МС, а из второй пробирки – для формирования банка.

Образцы сывороток крови непосредственно перед анализом размораживали при комнатной температуре, в вials помещали от 0,5 до 1 мл сыворотки крови, 50 мкл 5% раствора муравьиной кислоты и 2 мл метил-трет-бутилового эфира. Полученную смесь активно перемешивали в течение 5 минут с использованием встряхивателя. Образовавшуюся эмульсию количественно переносили в пластмассовые пробирки типа Eppendorf и цен-

трифугировали при 8000 оборотов в течение 10 минут. Верхний эфирный слой переносили в сухую чистую посуду и отдували в токе азота досуха. Полученный твердый остаток обрабатывали 10 мкл традиционного дериватизирующего агента N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида в течение 5 минут при температуре 60 °С. Разделение проводили на газовом хроматографе с масс-спектрометром GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu Corporation, Япония) в режиме программирования температуры, начиная с температуры +50 °С (3 мин). Дальнейшая скорость нагрева составляла 10 °С в мин, конечная температура – +290 °С, время при конечной температуре – 13 мин. Температура испарителя – +280 °С, газ-носитель – гелий (1 мл/мин). Для разделения использовали универсальную хроматографическую капиллярную колонку Equity-5 длиной 30 м с внутренним диаметром 0,25 мм и неподвижной фазой на основе сополимера диметилсилоксана (95%) и дифенилсилоксана (5%) (Supelco, Sigma-Aldrich Group, США). Объем вводимой пробы – 1 мкл.

Во всех группах оценивали состояние микробиоценоза толстой кишки до и после назначения метабиотика (в 0–1-й и 29–30-й дни). Для количественного определения микроорганизмов ДНК, выделенную из образцов кала, подвергали полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени согласно методикам Penders J. et al. (2006, 2007) и Sokol H. et al. (2009). Для идентификации группы бутират-продуцирующих бактерий методом ПЦР в реальном времени использовали соответствующие праймеры: Butyryl-CoA CoA transferases (*R. hom.*, *R. hominis* A2-183; *E. hal.*, *E. hallii* L2-7; *A. cac.* I, *A. caccae* L1-92; *F. prau.*, *F. prausnitzii* A2-165), Acetyl-CoA hydrolase (*D. haf.*, *D. hafniense*), 4-Hydroxybutyrate CoA transferases (*C. klu.*, *C. kluuyveri*; *C. tet.*, *C. tetani*; *A. cac.* II, *A. caccae* L1-92; *C. am.*, *C. aminobutyricum*) (Louis P. & Flint H.J., 2007, 2009).

Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с использованием программ Microsoft Excel 2010, SPSS и PAST (Hammer Ø. et al., 2011).

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования метаболома крови человека методом ГХ-МС в сыворотке крови было идентифицировано 84 низкомолекулярных соединения. По количеству метаболитов этот результат хорошо согласуется с данными, полученными в других лабораториях, и даже превосходит некоторые из них. Так, например, международной группе зарубежных ученых – авторов базы данных Serum Metabolome database (SMDDB) – аналогичным методом удалось идентифицировать 74 метаболита (Psychogios N. et al., 2011), среди которых 21 составляли аминокислоты (АК), а 10 – сахара.

Из идентифицированных 84 соединений 18 входили и в состав выделенных нами ранее экзометаболитов бактерий. Еще, как минимум, 7 метаболитов, по данным литературы, могли иметь двойное (эндогенное + микробное) или же преимущественно микробное происхождение. Средние показатели по содержанию этих метаболитов были различны для здоровых людей, больных целиакией и язвенным колитом.

В настоящей статье приведены данные лишь по некоторым группам идентифицированных метаболитов, играющих, с нашей точки зрения, значимую роль в системе взаимоотношений микробиоты кишечника и организма человека.

Фенилкарбоновые кислоты. Основным источником фенилкарбоновых кислот (ФКК) в организме человека служат ароматические аминокислоты – фенилаланин и тирозин (Smith E.A. & Macfarlane G.T., 1996). В сыворотке крови здоровых добровольцев и пациентов с целиакией и язвенным колитом методом ГХ-МС нами были идентифицированы такие ФКК, как бензойная кислота (БК), фенилуксусная кислота (ФУК), фенилмасляная кислота (ФМК), фенилпропионовая кислота

(ФПК), парагидроксифенилуксусная (4-оксифенилуксусная) кислота (ПГФУК) и 2-метилбензойная кислота (2-МБК).

С точки зрения изучения метаболической активности микробиоты кишечника наибольший интерес из идентифицированных нами ФКК представляют фенилуксусная, парагидроксифенилуксусная, фенилпропионовая и бензойная кислоты. Из постоянных представителей анаэробной флоры организма человека в метаболизме ароматических аминокислот принимают участие в основном представители двух родов – *Clostridia* (тип *Firmicutes*) и *Bacteroides* (тип *Bacteroidetes*). Так, например, *Clostridium botulinum* тип G и *Clostridium subterminale* метаболизируют фенилаланин и тирозин в фенилуксусную и парагидроксифенилуксусную кислоты (Elsden S.R. & Hilton M.G., 1979). *Subdoligranulum variabile* (кластер *Clostridium leptum*), не так давно выделенный из фекалий человека, также может вырабатывать парагидроксифенилуксусную кислоту (Li M. et al., 2008). Из числа клостридий, наиболее часто встречающихся в кишечнике, такие виды, как *Clostridium bifementans*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* и *Clostridium sordellii* активно продуцируют фенилуксусную кислоту (Mayrand D. & Bourgeau G., 1982), а *Clostridium sporogenes* – фенилпропионовую и парагидроксифенилпропионовую кислоты (Белобородова Н.В. и соавт., 2011). В свою очередь в результате β-окисления фенилпропионовой и парагидроксифенилпропионовой кислот в печени образуется бензойная кислота (Мао L.F. et al., 1994).

Из бактероидов, характерных для микробиоты кишечника человека, фенилуксусную кислоту продуцируют *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides ovatus* и *Bacteroides distasonis* (Mayrand D. & Bourgeau G., 1982; Белобородова Н.В. и соавт., 2011). Из представителей других родов можно упомянуть *Peptostreptococcus anaerobius* (семейство *Clostridiaceae*, тип *Firmicutes*), способный метаболизировать тирозин в фенилпропионовую и парагидроксифенилпропионовую кислоты (Lambert M.A. & Moss C.W., 1980). Способность к продукции фенилмолочной и парагидроксифенилмолочной кислот обнаружена у *Klebsiella pneumoniae* и *Escherichia coli* (оба микроорганизма относятся к семейству *Enterobacteriaceae*, тип *Proteobacteria*) и *Staphylococcus aureus* (семейство *Staphylococcaceae*, тип *Firmicutes*) (Белобородова Н.В. и соавт., 2009).

Стоит отметить и тот факт, что некоторые микроорганизмы могут продуцировать фенилкарбоновые кислоты и из других субстратов. Например, *Clostridium bartlettii* sp. nov. (*Clostridium* cluster XI) способна вырабатывать фенилуксусную кислоту, утилизируя глюкозу (Song Y.L. et al., 2004). Оруби (ржаные, пшеничные, овсяные и др.) также могут служить источником ФКК. Основным фенольным бактериальным метаболитом при этом является фенилпропионовая кислота, образующаяся, по всей видимости, из феруловой кислоты (Nordlund E. et al., 2012).

В норме фенилкарбоновые кислоты присутствуют в крови человека. По данным Белобородовой Н.В. и соавт. (2006), средние концентрации ФУК и ФПК в сыворотке крови здорового человека составили соответственно 226 и 147 нг/мл (с интерквартильным размахом в 0–512 и 0–220 соответственно). При генетически обусловленных нарушениях эндогенных путей метаболизма фенилаланина и тирозина, например, при фенилкетонурии и тирозинемии, уровень ФКК в сыворотке крови и в моче может существенно повышаться. Снижение уровня ФУК в крови и в моче, обусловленное возможными нарушениями метаболизма фенилаланина, тирозина и дофамина, описано у пациентов с большими депрессивными расстройствами и некоторыми формами шизофрении (Karoum F. et al., 1984).

Изменение содержания ФКК в крови и моче встречается и при других заболеваниях. Так, Jankowski J. et al. (2003) выявили повышенный уровень ФУК у пациентов в терминальной ста-

дии хронической почечной недостаточности. Kopple J.D. (2007) в статье, посвященной метаболизму фенилаланина и тирозина, приводит данные о повышении концентраций фенилмолочной, парагидроксифенилуксусной кислоты, парагидроксибензойной и других кислот у пациентов с хронической почечной недостаточностью. Mutsaers H.A. et al. (2011) также сообщает о повышении уровня фенилуксусной кислоты у пациентов, находящихся на терминальной стадии хронической почечной недостаточности, а Schmidt S. et al. (2008) рассматривает ФУК как один из уремических токсинов, обладающий ингибирующим эффектом в отношении экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS). Ингибирование iNOS, в свою очередь, угнетает функцию макрофагов и может привести к развитию иммунодефицитных состояний у таких пациентов. Повышенное содержание некоторых ФКК (например, фенилмолочной и парагидроксифенилмолочной) в крови наблюдается у септических больных и, скорее всего, связано с микробной деградацией фенилаланина и тирозина (Белобородова Н.В. и соавт., 2009).

Изменения в уровне парагидроксифенилуксусной кислоты в моче, обусловленные нарушением микробиоценоза кишечника, наблюдаются при раннем половом созревании (Qi Y. et al., 2012).

В доступной нам литературе мы не нашли сведений о содержании в крови фенилкарбоновых кислот при воспалительных заболеваниях кишечника (ВЗК), таких как язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), а также при целиакии. Практически единственное упоминание о возможной связи ФКК с фенотипами ВЗК имеется в исследовании Jansson J. et al. (2009), показавшей, что содержание парагидроксифенилпропионовой кислоты в фекалиях пациентов с болезнью Крона существенно выше (в 6–7 раз), чем у здоровых индивидуумов. Кроме того, в одном исследовании было показано, что при колоректальном раке, частота развития которого при ВЗК (особенно при язвенном колите) достоверно увеличена, уровень ФУК и ПГФУК в моче повышается (Qiu Y. et al., 2010).

Данные об уровне 5 идентифицированных фенилкарбоновых кислот в сыворотке крови больных целиакией, язвенным колитом и здоровых добровольцев представлены на рис. 1.

При анализе данных обращает на себя внимание значимое повышение уровня фенилуксусной и парагидроксифенилуксусной кислот и снижение уровня фенилпропионовой кислоты в крови у больных язвенным колитом по сравнению, как со здоровыми лицами, так и с больными целиакией (0,19 усл. ед. vs. 0,10 усл. ед. и 0,13 усл. ед.; 0,41 усл. ед. vs. 0,19 усл. ед. и 0,29 усл. ед.; 0,18 усл. ед. vs. 0,33 усл. ед. и 0,29 усл. ед.); во всех случаях различия достоверны). У больных целиакией также имелась небольшая тенденция к повышению уровня фенилуксусной и парагидроксифенилуксусной кислот в крови по сравнению со здоровыми

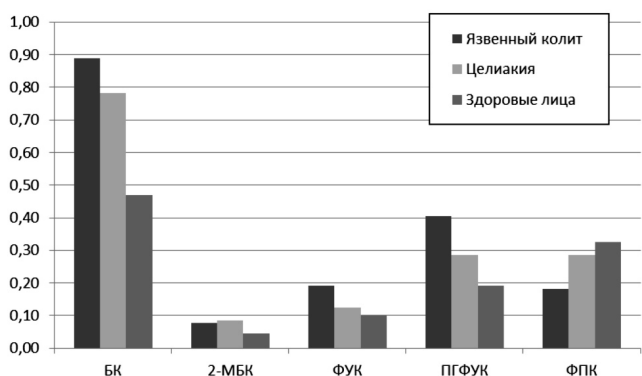


Рис. 1. Концентрации фенилкарбоновых в сыворотке крови больных язвенным колитом, целиакией и здоровых добровольцев по данным ГХ-МС (в усл. ед.).

добровольцами, однако различия в концентрациях были не достоверными. Эти данные могут свидетельствовать о возможном повышении метаболической активности некоторых видов родов *Clostridia* и *Bacteroides*, метаболизирующих фенилаланин и тирозин в фенилуксусную и парагидроксифенилуксусную кислоты, а также о вероятном снижении продукции фенилпропионовой кислоты бактерией *Clostridium sporogenes* у больных язвенным колитом. Изменение метаболической активности бактериальной флоры кишечника, в свою очередь, может являться следствием серьезных нарушений микробиоценоза (дисбиоз толстой кишки, синдром избыточного бактериального роста в тонкой кишке), сопровождающих как воспалительные заболевания кишечника (Fava F. & Danese S., 2011; De Cruz P. et al., 2012), так и целиакию (Rubio-Tapia A. et al., 2009; De Palma G. et al., 2010; Nistal E. et al., 2012). Кроме того, с учетом данных Qiu Y. et al. (2010), повышенный уровень ФУК и ПГФУК при язвенном колите может свидетельствовать и о более высоком риске развития колоректального рака у этой группы пациентов.

Полученные нами данные о более чем двукратном повышении уровня ПГФУК у больных язвенным колитом представляют несомненный интерес еще с одной точки зрения. Не так давно было показано, что добавление парагидроксифенилуксусной кислоты в культуру *Clostridium difficile* приводит к активной продукции паракрезола (токсического фенольного соединения с выраженной бактериостатической активностью в отношении нормофлоры) в результате декарбосилирования ПГФУК ферментом *C. difficile*. Этот феномен является уникальным свойством вида *C. difficile* (среди других представителей рода клостридий), фактически ответственным за развитие *C. difficile*-ассоциированных заболеваний в условиях гиперпродукции парагидроксифенилуксусной кислоты (Selmer T. & Andrei P.L., 2001). Возможно, что данные о существенном повышении уровня ПГФУК у пациентов с ЯК помогут (хотя бы частично) объяснить повышенную частоту инфекции *C. difficile* при язвенном колите, подтвержденную многочисленными эпидемиологическими исследованиями, а также возможную патогенетическую связь между инфекцией *C. difficile* и ВЗК (Walk S.T. & Young V.B., 2008; Surawicz C.M., 2010; Bien J. et al., 2013).

Следует отметить факт 1,5–2-кратного повышения концентрации бензойной кислоты и 2-метилбензойной кислот в сыворотке крови у больных обеих групп по сравнению со здоровыми лицами. Причина этого явления не вполне ясна, однако имеются данные о повышении уровня экскреции бензоата и других ФКК (ФУК и ПГФУК) с мочой при синдроме избыточного бактериального роста, сопровождающего различные заболевания желудочно-кишечного тракта, в том числе, целиакию, синдром короткой кишки и др. (van der Heiden C. et al., 1971; Lord R.S. & Bralley J.A., 2008).

Индолкарбоновые кислоты. Предшественником индолкарбоновых кислот является триптофан – незаменимая аминокислота, играющая важную роль в биосинтезе белка и являющаяся также биохимическим прекурсором таких соединений, как серотонин и никотиновая кислота. Кроме того, получены доказательства того, что повышенный катаболизм триптофана является ключевым метаболическим процессом, поддерживающим феномен индуцированных иммунных привилегий, а управление метаболизмом триптофана в перспективе может дать новый терапевтический инструмент для коррекции гипоиммунных, гипериммунных и аутоиммунных состояний (Li L. et al., 2012). В ряде исследований было показано, что индолкарбоновые кислоты могут принимать участие в регуляции экспрессии некоторых бактериальных генов (Kline E.L. et al., 1980).

В настоящем исследовании нами были идентифицированы 2 индолкарбоновые кислоты – индолуксусная кислота и индолпропионовая кислота (рис. 2).

Индолуксусная кислота (ИУК) является одним из основных метаболитов триптофана, наряду с 3-индолпропионовой кислотой, индолилакрилоилглицином (indolylacryloylglycine), 5-оксииндолуксусной кислотой (5-hydroxyindolylacetic [5-НИАА]) и 3-оксиантраниловой кислотой (3-hydroxyanthranilic acids), а также индолом и скатолом. В невысоких концентрациях ИУК обнаруживается в моче здорового человека, причем ее содержание коррелирует с содержанием индолилакрилоилглицина (Marklová E. et al., 1992).

Продуцентами индолуксусной кислоты являются некоторые виды клостридий, в частности, *Clostridium botulinum* тип G, *Clostridium difficile*, *Clostridium lituseburense*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium subterminale* и др., метаболизирующие триптофан и другие ароматические аминокислоты (Elsden S.R. & Hilton M.G., 1979; Yokoyama M.T. & Carlson J.R., 1979). Из представителей других родов ее способны вырабатывать *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Citrobacter* sp. (семейство *Enterobacteriaceae*, тип *Proteobacteria*) и *Escherichia coli* (Chung K.T. et al., 1975).

При экспериментальном колите у мышей уровень ИУК в сыворотке крови и колоректальной ткани понижается, а ее содержание (наряду с содержанием янтарной и глутаминовой кислот, а также глутамин) тесно связано с активностью воспалительного процесса (Shiomi Y. et al., 2011). Как и фенилуксусная кислота, индолуксусная кислота вследствие ее цитотоксичности также рассматривается как один из уремических токсинов (Vanholder R. et al., 2012).

Известно также, что индолуксусная кислота токсична для некоторых опухолевых клеток человека, в связи с чем рассматриваются возможности использования ИУК растительного происхождения (ауксина) для прицельной терапии злокачественных новообразований, например, меланомы, рака поджелудочной железы и рака мочевого пузыря (Rossiter S. et al., 2002; De Melo M.P. 2004; Jeong Y.M. et al., 2010).

В недавнем исследовании Qi Y. et al. (2012) показали, что при раннем половом созревании наблюдаются значимые изменения в уровне ИУК и ПГФУК в моче, и на этом основании сделали вывод, что раннее половое созревание может быть тесно связано с изменениями симбиотической микробиоты кишечника.

Индолпропионовая кислота (ИПК), так же как и индолуксусная кислота, является метаболитом триптофана. Физиологические функции ее до сих пор не выяснены, однако в ряде работ сообщается о ее возможности предотвращать окислительный стресс, а также о потенциальном нейропротективном действии (Chyan Y.J. et al., 1999; Bendheim P.E. et al., 2002; Cheng X. et al., 2005; Karbownik M. et al., 2005, 2006; Hwang I.K. et al., 2009). Известна также способность ИПК подавлять рост *Legionella*

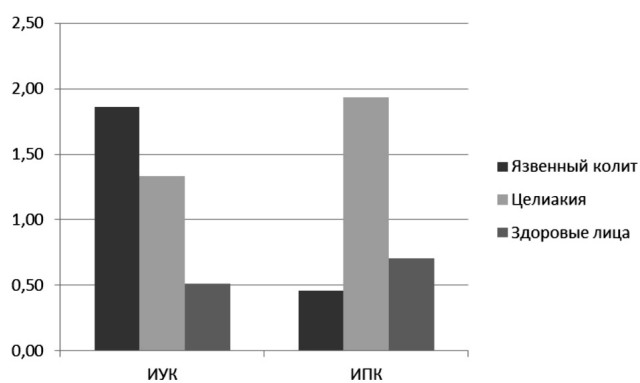


Рис. 2. Концентрации индолкарбоновых кислот в сыворотке крови больных целиакией, язвенным колитом и здоровых добровольцев по данным газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (в усл. ед.).

pneumophila, микроорганизма, этиологически связанного с болезнью легионеров (Mandelbaum-Shavit F. et al., 1991).

Спектр микроорганизмов, способных продуцировать ИПК, по всей видимости, ограничен представителями рода *Clostridia*, в том числе *Clostridium sporogenes* и *Clostridium cylindrosporum* (Elsden S.R. et al., 1976; Jellet J.J. et al., 1980; Wikoff W.R. et al., 2009). Косвенным подтверждением бактериального происхождения 3-индолпропионовой кислоты могут служить данные о снижении уровня ИПК у животных после назначения антибиотиков (Young S.N. et al., 1980). Прямое подтверждение микробного происхождения ИПК было получено в экспериментальном исследовании на мышах (обычных и безмикробных линий), результаты которого показали, что продукция индолпропионовой кислоты полностью зависит от микрофлоры кишечника и, в частности, от колонизации *Clostridium sporogenes*. ИПК обнаруживалась только в сыворотке крови обычных мышей и полностью отсутствовала в крови безмикробных мышей. Из 24 видов микроорганизмов, принадлежащих к различным типам бактерий (*Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*) и архей (*Methanobrevibacter smithii*), только *Clostridium sporogenes* был способен продуцировать ИПК в культуре (Wikoff W.R. et al., 2009).

В доступной нам литературе мы не нашли данных о содержании 3-индолпропионовой кислоты в крови пациентов с язвенным колитом и целиакией.

Анализ полученных нами данных показал достоверное повышение концентраций индолуксусной кислоты, как у больных язвенным колитом, так и у больных целиакией (1,86 усл. ед. и 1,33 усл. ед. соответственно vs. 0,51 усл. ед. у здоровых добровольцев; различия достоверны), что может быть обусловлено повышенной активностью клостридий, метаболизирующих ароматические аминокислоты, и согласуется с сопутствующим повышением уровня фенилуксусной и парагидроксифенилуксусной кислот в обеих группах больных (см. выше).

Выявленное значимое повышение уровня индолпропионовой кислоты у больных целиакией по сравнению с больными язвенным колитом и здоровыми лицами (1,93 усл. ед. vs. 0,46 усл. ед. и 0,70 усл. ед. соответственно; различия достоверны) может быть обусловлено возможной разницей в количестве/метаболической активности *Clostridium sporogenes* у больных целиакией и язвенным колитом и полностью согласуется с описанным выше снижением концентрации ФПК у пациентов с язвенным колитом.

Дикарбоновые кислоты. Из дикарбоновых кислот мы идентифицировали в сыворотке крови янтарную и фумаровую кислоты. Янтарная и фумаровая кислоты, наряду с щавелевоуксусной, лимонной и другими кислотами, являются интермедиатами в цикле трикарбоновых кислот (цикле Кребса), который служит универсальным конечным путем окисления углеводов, липидов и белков и играет ключевую роль в процессах глюконеогенеза, липогенеза и катаболизма азота. Фумаровая кислота также является одним из побочных продуктов цикла мочевины (цикла Кребса-Хензелейта), реакции которого протекают в клетках печени и обеспечивают преобразование азотосодержащих продуктов распада в мочевины.

Янтарная кислота. Основными бактериальными продуцентами янтарной кислоты в организме человека являются *Bacteroides* spp. (*B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron*, *B. cellulosilyticus*, *B. caccae*, *B. merdae*, *B. stercoris* и др.) (Robert C. et al., 2007; Shah H.N. et al., 2009), а также *Eggerthella lenta* (семейство *Coriobacteriaceae*, тип *Actinobacteria*), ранее известная как *Eubacterium lentum* (Белобородова Н.В. и соавт., 2011), которая в ряде случаев может быть причиной клинически выраженной бактериемии, в том числе у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (Thota V.R. et al., 2011; Venugopal A.A. et al., 2012).

Из других представителей микробиоценоза кишечника человека янтарную кислоту способны производить *Paraprevotella clara* и *Paraprevotella xylaniphila* (семейство *Prevotellaceae*, тип *Bacteroidetes*) (Morotomi M. et al., 2009), ацетогенная бактерия *Marcovinbryantia formatexigens* (семейство *Lachnospiraceae*, тип *Firmicutes*), ранее известная, как *Bryantella Formatexigens* (Rey F.E. et al., 2010), *Ruminococcus champanellensis* (семейство *Ruminococcaceae*, тип *Firmicutes*) (Chassard C. et al., 2012). Некоторые микроорганизмы, например, *Phascolarctobacterium succinatutens*, недавно выделенная из фекалий здорового человека (семейство *Acidaminococcaceae*, тип *Firmicutes*), могут, в свою очередь, утилизировать янтарную кислоту, производимую другими кишечными бактериями, конвертируя ее в пропионовую кислоту путем декарбоксилирования (Watanabe Y. et al., 2012).

Определение концентрации янтарной кислоты в крови и других биологических жидкостях может иметь клиническое значение. Так, уровень янтарной кислоты (как и уровень молочной кислоты) в крови повышается при гипоксических состояниях, что дает возможность рассматривать этот показатель как один из возможных маркеров гипоксии (Komagomy-Hiller G. et al., 1997). При болезни Крона концентрация янтарной кислоты в сыворотке крови повышается, при язвенном колите повышается ее количество в просвете толстой кишки (Tamura K. et al., 1995; Inagaki A. et al., 2007), однако при этом может снижаться ее содержание в колоректальной ткани (Ooi M. et al., 2011). При экспериментальном колите у мышей уровень янтарной кислоты в сыворотке крови и колоректальной ткани (наряду с уровнем индолуксусной и глутаминовой кислот, а также глутамина) тесно связан с активностью воспалительного процесса (Shiomi Y. et al., 2011). При колоректальном раке выявлено снижение концентрации янтарной кислоты в моче (Qiu Y. et al., 2010).

Фумаровая кислота. Из бактерий кишечной микрофлоры фумаровую кислоту, так же как и янтарную, производят представители рода *Bacteroides* (*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*) и вышеупомянутая *Eggerthella lenta*, однако в гораздо меньших (в десятки раз) количествах (Белобородова Н.В. и соавт., 2011), поэтому, скорее всего, основным источником фумаровой кислоты в тканях и жидкостях организма являются не микроорганизмы, а эндогенные метаболические процессы (цикл Кребса и цикл Кребса-Хензелейта).

При воспалительных заболеваниях кишечника (как при язвенном колите, так и при болезни Крона) уровень фумаровой кислоты в сыворотке крови повышается, а содержание ее в ткани толстой кишки у пациентов с язвенным колитом и колоректальным раком может снижаться (Ooi M. et al., 2011; Chan E.C. et al., 2009).

В настоящем исследовании было выявлено достоверное повышение уровня янтарной кислоты в сыворотке крови, как при язвенном колите, так и при целиакии, по сравнению со здоровыми добровольцами (в 2,8 и 1,5 раза соответственно; в обоих случаях различия достоверны) (рис. 3). Уровень фумаровой кислоты у больных обеих групп также повышался (в 2,1 и 2,6 раза соответственно; различия достоверны). Интересно, что соотношение концентраций янтарной и фумаровой кислот у больных язвенным колитом, целиакией и здоровых добровольцев значимо различалось (11,3, 4,9, и 8,4 соответственно), что может быть обусловлено различной направленностью метаболических процессов в каждой из групп. Поскольку в цикле трикарбоновых кислот фумаровая кислота образуется из янтарной, то повышенная утилизация янтарной кислоты, сопровождающаяся снижением ее концентрации, может приводить к повышению концентрации фумаровой кислоты и наоборот.

Дополнительное применение метабиотика (масляной кислоты в комбинации с инулином) в течение 4 недель на фоне ба-

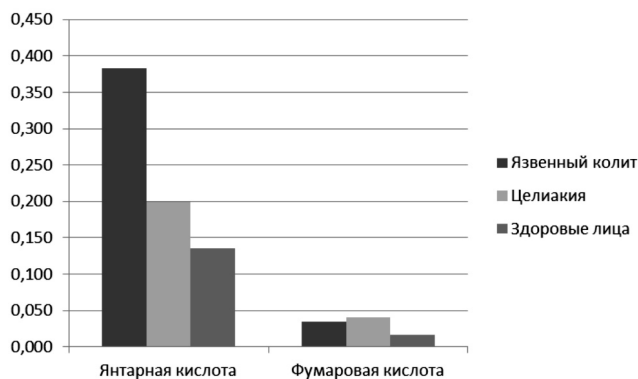


Рис. 3. Концентрации янтарной и фумаровой кислот в сыворотке крови больных целиакией, язвенным колитом и здоровых добровольцев по данным ГХ-МС (в усл. ед.).

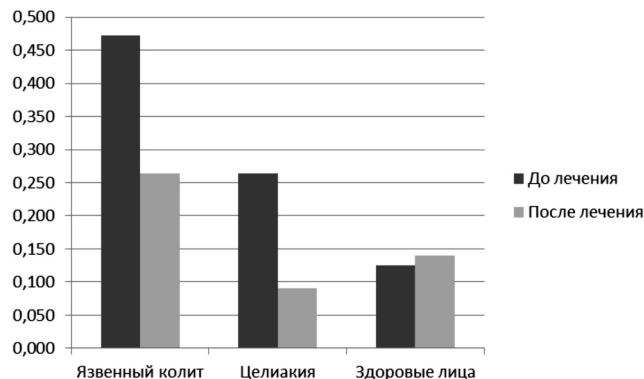


Рис. 4. Динамика концентрации янтарной кислоты в сыворотке крови у больных и здоровых лиц на фоне приема масляной кислоты (бутирата) и инулина (в усл. ед.).

зисной терапии приводило, наряду с улучшением клинической симптоматики и показателей микробиоценоза, к достоверной нормализации уровня янтарной кислоты, как у больных язвенным колитом, так и у пациентов с целиакией (в обоих случаях различия достоверны). Уровень янтарной кислоты в сыворотке крови у здоровых лиц на фоне приема масляной кислоты и инулина не изменился (рис. 4). Побочных эффектов при применении масляной кислоты и инулина не наблюдалось.

Количественная оценка состояния микробиоценоза выявила достоверное устранение анаэробного дисбаланса (снижение доли бактериоидов, связанных с хроническим воспалением, что отражалось в уменьшении соотношения *Bacteroides fragilis*/*Faecalibacterium prausnitzii* до нормальных значений (< 80), повышение доли некультивируемых бутират-продуцирующих бактерий (примерно в 1,5 раза) и уменьшение количества условно-патогенных микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Clostridium difficile*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*/*vulgaris*, *Staphylococcus aureus*) в подгруппах пациентов с язвенным колитом и целиакией (2b и 3b), дополнительно получавших метабиотик (бутират + инулин). Стоит отметить, что повышение доли бутират-продуцирующих бактерий, играющих ключевую роль в энергетическом обеспечении кишечного эпителия, а также положительная динамика соотношения *Bacteroides fragilis*/*Faecalibacterium prausnitzii* на фоне приема масляной кислоты и инулина наблюдались и в группе практических здоровых лиц (рис. 5).

Обсуждая полученные данные, следует подчеркнуть, что продукция янтарной кислоты представителями микробиоты кишечника в настоящее время рассматривается как потенциальный фактор их вирулентности. Так, например, было показано, что *Bacteroides fragilis* могут вырабатывать янтарную кислоту в количествах, способных ингибировать так называемый респираторный (окислительный) взрыв в нейтрофильных лейкоцитах за счет снижения внутриклеточного pH (Rotstein O.D. et al., 1987). В исследовании Abdul-Majid K.B. et al. (1997) янтарная кислота бактериального происхождения подавляла бактерицидную активность нейтрофилов. Роль янтарной кислоты в повреждении слизистой оболочки при экспериментальном колите у крыс была показана Fukui S. et al. (1997). Введение янтарной кислоты при этом сопровождалось снижением кровотока в слизистой оболочке толстой кишки и инфильтрацией полиморфноядерных клеток, способных генерировать свободные радикалы кислорода (супероксидные радикалы), играющие значимую роль в развитии воспалительного процесса. В другом исследовании Ariake K. et al. (2000) подтвердили, что янтарная кислота, продуцируемая представителями рода *Bacteroides* (особенно *B. caccae*), может выступать в роли ulcerогенного фак-

тора при экспериментальном колите у мышей. Уровень янтарной кислоты в фекалиях мышей с колитом при этом был повышен. Shiomi Y. et al. (2011), в свою очередь, выявили достоверное снижение уровня янтарной кислоты в ткани толстой кишки у мышей с экспериментальным колитом, вызванным декстраном сульфата натрия (DSS-колит), что, по мнению авторов, может быть связано с повреждением слизистой оболочки кишечника янтарной кислотой. В сыворотке крови мышей с DSS-колитом уровень янтарной кислоты незначительно снижался (на 7-й день исследования), восстанавливаясь при этом к 10-му дню до нормальных значений.

В японском экспериментальном исследовании было показано, что в отличие от короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), стимулирующих пролиферацию эпителиальных клеток кишечника, янтарная кислота достоверно ингибирует пролиферацию колоноцитов и уменьшает размер крипт (Inagaki A. et al., 2007). С учетом имеющихся данных о накоплении янтарной кислоты в толстой кишке у больных язвенным колитом (Tamura K. et al, 1995), авторы предположили, что ингибирующий эффект янтарной кислоты в отношении пролиферации эпителия толстой кишки может быть непосредственно связан как с развитием язвенного колита, так и с ухудшением течения этого заболевания.

Назначение пребиотических продуктов на основе проросшего ячменя в экспериментальных исследованиях на животных (на модели рака толстой кишки и при экспериментальном колите) приводит к достоверному снижению продукции янтарной кислоты и повышению продукции таких КЖК, как масляная. По мнению авторов, снижение продукции сукцина-та связано с изменениями микробиоценоза толстой кишки под

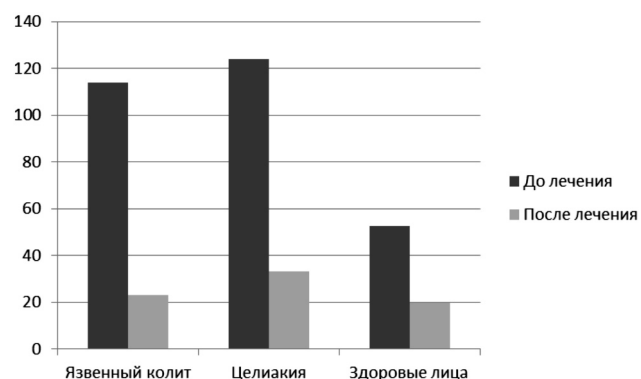


Рис. 5. Динамика соотношения *Bacteroides fragilis*/*Faecalibacterium prausnitzii* на фоне приема бутирата и инулина (во всех случаях различия достоверны).

действием пребиотика, в частности, с уменьшением количества *Bacteroides* spp., вырабатывающих янтарную кислоту (Kanauchi O. et al., 2008; Komiyama Y. et al., 2011). Ранее проведенные клинические исследования показали, что назначение пребиотиков на основе проросшего ячменя достоверно снижает индекс клинической активности у пациентов с активным язвенным колитом и пролонгирует ремиссию при язвенном колите (Kanauchi O. et al., 2003; Hanai N. et al., 2004).

И наконец, в одном из последних экспериментальных исследований было установлено, что янтарная кислота микробного происхождения (источником ее могут служить грамотрицательные кишечные бактерии, например, бактероиды, *Escherichia coli*, *Salmonella*) является не чем иным, как противовоспалительной сигнальной молекулой, индуцирующей интерлейкин-1 β через протеин HIF-1 α (Tannahill G.M. et al., 2013).

Полиненасыщенные и насыщенные жирные кислоты. Из группы полиненасыщенных жирных кислот нами были идентифицированы линолевая и арахидоновая кислоты, из группы насыщенных – пальмитиновая кислота.

Линолевая кислота является одной из незаменимых (эссенциальных) жирных кислот и относится к классу омега-6-полиненасыщенных жирных кислот. Основным источником линолевой кислоты – жиры (как животные жиры, так и растительные масла), поступающие с пищей. Косвенно это подтверждается тем фактом, что уровень таких жирных кислот, как линолевая и пальмитиновая, коррелирует с содержанием животных и растительных жиров в пище (Uusitalo L. et al., 2011).

Биомедицинское значение линолевой кислоты заключается в том, что она участвует в синтезе арахидоновой кислоты (и, таким образом, некоторых простагландинов), а также в формировании фосфолипидов клеточных мембран. Повышенное потребление линолевой кислоты, связанное с диетическими рекомендациями, возможно, уменьшает риск сердечно-сосудистых заболеваний.

С другой стороны, линолевая кислота является прекурсором ряда окисленных биологически активных метаболитов, 9- и 13- гидроксиктадекадиеновых кислот и 9- и 13-оксооктадекадиеновых кислот (9- и 13-HODE и 9- и 13-oxoODE), с которыми связывают некоторые патологические состояния, например, болезнь Альцгеймера и неалкогольный стеатогепатит (Ramsden C.E. et al., 2012). Кроме того, ряд авторов указывают на роль линолевой кислоты в развитии системного воспаления (опосредованно через синтез провоспалительных эйкозаноидов из арахидоновой кислоты и/или ингибирование синтеза противовоспалительных эйкозаноидов из эйкозапентаеновой кислоты и/или докозагексаеновой кислоты). Так, например, в европейском исследовании «случай–контроль», включившем оценку характера питания у 203193 человек в возрасте 30–74 из Великобритании, Швеции, Дании, Германии и Италии, было показано, что повышенное потребление линолевой кислоты с пищей более чем в 2 раза повышает риск развития язвенного колита (Tjonneland A. et al., 2009). Однако среди здоровых лиц систематический анализ результатов рандомизированных клинических исследований не выявил повышения уровня маркеров воспаления в связи с повышенным употреблением линолевой кислоты (Johnson G.H. & Fritsche K., 2012), а исследование, проведенное в Японии, показало, что повышенное потребление линолевой кислоты (а не только альфа-линолевой кислоты, относящейся к классу омега-3-полиненасыщенных жирных кислот), напротив, связано с уменьшением уровня маркеров воспаления, таких как С-реактивный белок (Poudel-Tandukar K. et al., 2009).

Кроме линолевой кислоты вместе с молочной и мясной пищей в организм человека поступает и конъюгированная линолевая кислота (КЛА), являющаяся продуктом процессов био-

гидрогенизации, протекающих в рубце жвачных животных (Banni S., 2002). Кроме того, КЛА содержится в яйцах, некоторых видах грибов и растительных маслах (в минимальных количествах). Некоторые представители микробиоты кишечника человека (например, молочнокислые бактерии, такие как *Lactobacillus plantarum*), а также пробиотические штаммы (например, VSL#3, содержащий *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis* и *Streptococcus thermophilus*) способны производить КЛА из линолевой кислоты (Ogawa J. et al., 2005; Bassaganya-Riera J. et al., 2012). Стоит отметить, что продукция КЛА и бактериоцинов пробиотическими штаммами рассматривается сегодня как один из основных механизмов их терапевтического и профилактического действия (O'Shea E.F. et al., 2012). В экспериментальных исследованиях было показано, что конъюгированная линолевая кислота обладает потенциальным антиканцерогенным, антиатерогенным и, возможно, иммуномодулирующим действием (Aydin R., 2005), а также рядом других положительных эффектов, затрагивающих функции печени, метаболизм глюкозы и окислительный стресс (Dilzer A. & Park Y., 2012).

Арахидоновая кислота также относится к классу омега-6-полиненасыщенных жирных кислот, но не является незаменимой, поскольку может синтезироваться в организме из линолевой кислоты. Арахидоновая кислота входит в состав фосфолипидов клеточных мембран (например, клеток печени, мозга, мышечных волокон), а также является прекурсором эйкозаноидов (простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов) и одним из ключевых посредников воспаления. В организм человека арахидоновая кислота поступает преимущественно с пищей (мясомолочные продукты, яйца) или синтезируется из линолевой кислоты.

Пальмитиновая кислота является насыщенной жирной кислотой и входит в состав большинства растительных масел и животных жиров. Это первая жирная кислота в организме человека, синтезируемая в процессе липогенеза. Наряду с глюкозой, насыщенные жирные кислоты (пальмитиновая и стеариновая) являются основными субстратами для синтеза АТФ, т.е. для обеспечения клеток энергией (Тершина Е.В., 2007). В организм пальмитиновая кислота поступает с пищей или синтезируется эндогенно. Повышенное потребление пальмитиновой кислоты, по данным ВОЗ, повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний (Технический отчет ВОЗ № 916, 2003). Данные о продукции пальмитиновой кислоты микроорганизмами в кишечнике человека в доступных нам литературных источниках отсутствуют.

Пул свободных жирных кислот крови образован в основном пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и арахидоновой кислотами. Изменение концентраций этих кислот наблюдается при различных хронических заболеваниях. Так, повышенный уровень арахидоновой и пальмитиновой кислот в сыворотке крови наблюдался при колоректальном раке (Ma Y. et al., 2010). При раке поджелудочной железы содержание арахидоновой кислоты в плазме крови повышалось (Urayama S. et al., 2010), а содержание пальмитиновой кислоты снижалось (Nishiumi S. et al., 2010). При раке печени уровень пальмитиновой кислоты в сыворотке крови повышался.

При воспалительных заболеваниях кишечника концентрации жирных кислот, как полиненасыщенных, так и насыщенных, в крови изменяются в зависимости от активности процесса и нозологической формы. Так, при активном язвенном колите концентрация пальмитиновой кислоты в плазме крови достоверно повышалась, в то время как концентрации линолевой и арахидоновой кислот не изменялись (Esteve-Comas M. et al., 1992). У больных с неактивным язвенным колитом (фаза ремиссии) уровень всех этих кислот (линолевой, арахидоно-

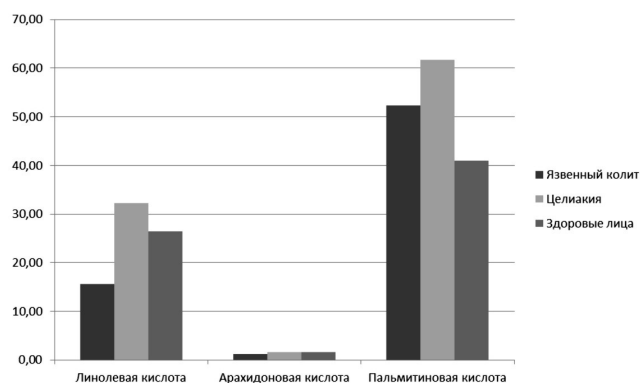


Рис. 6. Концентрации линолевой, арахидоновой и пальмитиновой кислот в сыворотке крови больных язвенным колитом, целиакией и здоровых добровольцев по данным ГХ-МС (в усл. ед.).

вой и пальмитиновой) в плазме крови был достоверно выше, чем в контрольной группе здоровых лиц. При болезни Крона наблюдались аналогичные изменения за исключением повышения уровня пальмитиновой кислоты. Результаты этих исследований позволили авторам сделать вывод о повышенном биосинтезе исследуемых кислот при воспалительных заболеваниях кишечника (Esteve-Comas M. et al., 1993).

Относительно недавнее исследование, напротив, продемонстрировало достоверное снижение уровня линолевой и арахидоновой кислот в плазме крови детей с язвенным колитом и болезнью Крона, связанное с активностью заболевания и обусловленное, по мнению авторов, малабсорбцией и мальдигестией, характерными для детей, страдающих воспалительными заболеваниями кишечника (Socha P. et al., 2005).

В настоящем исследовании было выявлено достоверное снижение уровня линолевой кислоты в сыворотке крови больных язвенным колитом по сравнению с больными целиакией и здоровыми лицами (на 41–52%). Концентрация арахидоновой кислоты в сыворотке крови пациентов с язвенным колитом также была несколько снижена по сравнению с больными целиакией и здоровыми лицами (на 21–23%), однако различия не были достоверными. Уровень пальмитиновой кислоты в группах больных язвенным колитом и целиакией был достоверно выше, чем в группе здоровых добровольцев (в 1,28 и 1,51 раза соответственно) (рис. 6).

Полученные нами данные не противоречат результатам опубликованных ранее исследований. Выявленные изменения в пуле указанных жирных кислот в крови больных язвенным колитом и целиакией, скорее всего, не связаны с нарушениями микробиоценоза. Причиной снижения уровня линолевой и арахидоновой кислот при язвенном колите может быть недостаточное поступление этих кислот с пищей. Повышение уровня пальмитиновой кислоты в группах больных целиакией и язвенным колитом, в свою очередь, может быть обусловлено повышением эндогенного синтеза данной кислоты, связанного с аутоиммунным воспалением, характерным для обоих заболеваний.

Заключение

Метаболический профиль сыворотки крови и других биологических образцов (возможно, ограниченный рядом соединений, таких как КЖК, фенилкарбоновые, индолкарбоновые, дикарбоновые, оксикарбоновые кислоты, некоторые аминокислоты и др.), а также отдельные высокоинформативные метаболиты (например, янтарная кислота) могут рассматриваться,

по нашему мнению, как потенциальные биомаркеры активности, тяжести течения и прогноза при хронических заболеваниях кишечника, ассоциированных с нарушениями микробиоценоза (например, язвенного колита или целиакии), а исследование их уровня в динамике, в свою очередь, может служить косвенным методом оценки эффективности препаратов, механизм действия которых связан с влиянием на микробиоту кишечника и метаболические процессы (пробиотики, пребиотики, метабиотики, кишечные антисептики и антибиотики).

Применение метабиотика (масляной кислоты в комбинации с инулином) на фоне базисной терапии месалазином у больных язвенным колитом и на фоне безглютеновой диеты у пациентов с целиакией улучшает клиническую симптоматику, метаболический профиль сыворотки крови, и показатели микробиоценоза, достоверно устраняя анаэробный дисбаланс, повышая долю бутират-продуцирующих бактерий, играющих значимую роль в снабжении колоноцитов энергией, и нормализуя патологически повышенный уровень янтарной кислоты, связанной с воспалением.

По вопросам использованной авторами литературы обращайтесь в редакцию.

Serum metabolome features in ulcerative colitis and celiac disease based on gas chromatography-mass spectrometry

Sitkin S., Tkachenko E., Vakhitov T.,

Oreshko L., Zhigalova T.

North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russia

Abstract

Metabolomics is the emerging science of measurement and analysis of metabolome – the complete set of low molecular weight compounds in a cell, tissue, organ or whole organism. One of the aims of metabolomics is to research the response of an organism to a pathophysiological insult by measuring the concentrations of small molecule metabolites in biofluids and tissues and its dynamics. Intestinal microbiota is most probably involved in the development and maintenance of autoimmune inflammation in ulcerative colitis and celiac disease. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of serum generates comprehensive metabolic profiles, reflecting integrated human (systemic) and gut microbial metabolism which may be altered in disease states. The aim of this study was to investigate GC-MS-based serum metabolomic profiles in UC and CD patients. Serum metabolomic profiles were collected from 75 individuals: 20 patients with mild-moderate active UC, 35 CD patients, and 20 healthy controls (HC). We characterized 84 serum metabolites by use GC-MS. 18 metabolites at least have a combined (human + microbial) origin. In serum of UC patients, phenylacetic acid (PAA), 4-hydroxyphenylacetic acid (4-HPAA), 3-indolylacetic acid (IAA), succinic acid (SA) and fumaric acid (FA) were the metabolites most prominently increased, whereas 3-phenylpropionic acid (PPA) was significantly decreased. Serum of CD patients showed significant increases in IAA, 3-indolepropionic acid (IPA), SA and FA. Increased serum levels of succinic acid suggest its possible damaging effect on intestinal mucosa especially in ulcerative colitis. Orally administered butyrate + inulin as supplement to mesalazine in UC or gluten free diet in CD was effective in reducing disease activity with a marked improvement of serum metabolomic profiles (including SA reduction) and gut microbiota in both diseases. There were no any adverse events.

Key words: butyrate, celiac disease, inulin, metabiotics, metabolome, metabolomics, ulcerative colitis.