

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ  
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Химико-биологический факультет  
Кафедра биохимии и микробиологии

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА**

Направление подготовки 06.03.01 Биология

**Характеристика короткоцепочечных и  
полиненасыщенных жирных кислот метаболитов  
пробиотических микроорганизмов**

ОГУ 06.03.01. 1320. 020 00

Заведующий кафедрой  
д-р мед. наук, доцент  
Барышева

\_\_\_\_\_

подпись                      дата

Е.С.

Руководитель  
д-р мед. наук, доцент  
Барышева

\_\_\_\_\_

подпись                      дата

Е.С.

Студент  
Карпова

\_\_\_\_\_

Е.А.

Оренбург 2020

Утверждаю  
заведующий кафедрой  
биохимии и  
микробиологии  
\_\_\_\_\_ Барышева Е.С.  
«27» апреля 2020г.

## Задание

### на выполнение выпускной квалификационной работы

студенту Карповой Евгении Александровне  
по направлению подготовки 06.03.01 Биология

1 Тема ВКР: Характеристика короткоцепочечных и полиненасыщенных жирных кислот метаболитов пробиотических микроорганизмов.

2 Срок сдачи студентом ВКР «15» июня 2020 г.

3 Цель ВКР:

Определить количественный состав жирных кислот метаболитов пробиотических и клинических штаммов микроорганизмов методом газожидкостной хроматографии.

Задачи:

1) Определить количественный состав летучих жирных кислот супернатантов пробиотических и клинических штаммов бифидо- и лактобактерий;

2) Провести сравнительный анализ концентрации жирных кислот в метаболитах клинических штаммов при различных степенях дисбиоза толстого кишечника человека;

3) Охарактеризовать спектр и уровень летучих жирных кислот пробиотических штаммов как перспективных культур для создания метабиотиков для коррекции микробиологических нарушений толстого кишечника человека.

4 Исходные данные к ВКР: отечественная и иностранная литература, диссертации, статьи в журналах.

5 Перечень вопросов, подлежащих разработке: характеристика жирных кислот, изучение современных аспектов создания метабиотиков и их применение в медицине, хроматографический метод, определение спектров и количественного состава жирных кислот метаболитов кишечных и пробиотических бифидо- и лактобактерий, описание результатов и выводы.

6 Перечень графического (иллюстративного) материала: 31 рисунок, 12 таблиц.

7 Консультанты, с указанием относящихся к ним разделов ВКР: Иванова Елена Валерьевна, доктор медицинских наук, доцент, в.н.с. ИКВС УрО РАН; раздел №3.

Дата выдачи и получения задания

Руководитель ВКР «27» апреля 2020г. \_\_\_\_\_ Е.С.  
Барышева

Студент «27» апреля 2020г. \_\_\_\_\_ Е.А.  
Карпова

Дата выполнения студентом задания консультанта  
Консультант «27» апреля 2020г. \_\_\_\_\_  
Е.В. Иванова

## **Анн о ация**

Выпускная квалификационная работа посвящена исследованию состава жирных кислот метаболитов пробиотических и клинических штаммов микроорганизмов методом газо-жидкостной хроматографии.

Нарушение состояния эубиоза может происходить под влиянием окружающей среды, стресса, бесконтрольного применения антимикробных препаратов, химиотерапии и нерационального питания. Все эти факторы негативно влияют на состав микросимбиоза толстого кишечника человека, уменьшая продукцию микроорганизмами короткоцепочечных жирных кислот, что влечет за собой проявление дисбиоза кишечника и размножения условно-патогенной микробиоты. Дисбиоз является начальным этапом формирования многих заболеваний в организме человека.

В результате выполненной работы, выделен и охарактеризован жирно-кислотный состав пробиотических штаммов, а также дана сравнительная характеристика концентрации жирных кислот кишечных бифидобактерий при различных состояниях биотопа толстого кишечника человека.

Опираясь на проведенные исследования, на основе метаболического паспорта пробиотических микроорганизмов будут охарактеризованы штаммы перспективные для создания современных бактериальных препаратов (метабиотиков).

Работа содержит 63 страницы текста, 31 рисунок, 12 таблиц.

## **Ann~~o~~ ation**

The final qualification work is devoted to the study of the composition of fatty acids of probiotic and clinical microbial metabolites by gas-liquid chromatography.

Violation of eubiosis can occur under the influence of the environment, stress, uncontrolled use of antimicrobials, chemotherapy, and poor nutrition. All these factors negatively affect the composition of the human colon microsymbiocenosis, reducing the production of short-chain fatty acids by microorganisms, which leads to the manifestation of intestinal dysbiosis and the reproduction of opportunistic microbiota. Dysbiosis is the initial stage of the formation of many diseases in the human body.

As a result of the work performed, the fatty acid composition of probiotic strains was isolated and characterized, as well as a comparative characteristic of the concentration of fatty acids of intestinal bifidobacteria in various States of the human colon biotope.

Based on the conducted research, on the basis of the metabolic passport of probiotic microorganisms, strains promising for the creation of modern bacterial preparations (metabiotics) will be characterized.

The work contains 63 pages of text, 31 figures, 12 tables.

## Содержание

Введение.....	6
1 Обзор литературы.....	7
1.1 Структура жирных кислот и их значение для организма человека.....	7
1.2 Состав и функции нормальной микрофлоры толстого кишечника. Понятие о дисбиозе.....	24
1.3 Современные аспекты создания метабиотиков и их применение в медицине.....	28
2 Материалы и методы исследования.....	32
2.1 Этапы и схема исследования.....	32
2.2 Характеристика микроорганизмов, используемых в экспериментальной работе.....	34

2.3 Выделение клинических штаммов микроорганизмов.....	36
2.4 Получение супернатантов пробиотических бифидо- и лактобактерий.....	37
2.5 Определение спектра жирных кислот супернатантов пробиотических культур методом газо-жидкостной хроматографии.....	38
2.6 Методы математического анализа результатов.....	41
3 Результаты собственных исследований.....	42
3.1 Определение концентрации жирных кислот у клинических штаммов бифидобактерий при различных состояниях биотопата толстого кишечника человека.....	42
3.2 Сравнительный анализ концентрации жирных кислот при различных степенях дисбиоза.....	45
3.3 Определение количественного состава жирных кислот метаболитов пробиотических микроорганизмов.....	47
3.4 Сравнительный анализ концентраций жирных кислот в супернатантах пробиотических микроорганизмов.....	51
Заключение.....	56
Список использованных источников.....	58

## **Введение**

Исследования микробиоты человеческого организма начались более ста лет. Впервые мысли о роли и влиянии микрофлоры на организм человека задавался русский основоположник бактериологии – И.И. Мечников. Многочисленные исследования позволили получить широкий спектр знаний о микрофлоре кишечника. Так стало известно, что бактерии толстого кишечника человека делятся на доминирующие и транзиторные виды, которые циркулируют по всему пищеварительному тракту [38, 40].

В современном мире микрофлора в организме человека выделяется как одна из важных систем адаптации. Широко изучаются метаболические возможности микробиоты толстого кишечника, ее способность влиять на работу желудочно-кишечного тракта, а также продуцировать важные для макроорганизма метаболиты в ходе ферментативной активности.

Главные метаболиты пробиотических организмов синтезируются вследствие ферментативного расщепления микрофлорой пищевых волокон до простых углеводов и представлены жирными кислотами, которые оказывают непосредственное действие на различные системы организма человека. В частности, метаболиты пробиотических микроорганизмов обеспечивает защитные, антимуtagenные и антиканцерогенные функции, а также оказывают положительный эффект, улучшая моторную и секреторную функции желудочно-кишечного тракта, участвуя в образовании нейромедиаторов, регулируя водно-электролитный баланс [40, 69].

Все вышеперечисленные положительные эффекты позволяют рассматривать бифидобактерии в виде основы для создания препаратов нового поколения для стабилизации микробного баланса микробиоты толстого кишечника человека.

Целью исследования является определение количественного состава жирных кислот метаболитов пробиотических микроорганизмов и клинических штаммов методом газо-жидкостной хроматографии.

В связи с поставленной целью следует решить следующие задачи:

1) Определить количественный состав летучих жирных кислот супернатантов пробиотических и клинических штаммов бифидо- и лактобактерий;

2) Провести сравнительный анализ концентрации жирных кислот в метаболитах клинических штаммов при различных степенях дисбиоза толстого кишечника человека;

3) Охарактеризовать спектр и уровень летучих жирных кислот пробиотических штаммов как перспективных культур для создания метабиотиков для коррекции микробиологических нарушений толстого кишечника человека.

## **1 Обзор литературы**

## **1.1 Структура жирных кислот и их значение для организма человека**

### 1.1.1 Короткоцепочечные жирные кислоты

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК; англ. short-chain fatty acids (SCFAs)) — общее название предельных одноосновных карбоновых кислот, которые имеют не более 6 атомов углерода.

Образование короткоцепочечных жирных кислот происходит в толстом кишечнике человека в процессе их ферментативной активности нормальной микрофлорой (бифидо- или лактобактериями), которая заключается в расщеплении не перевариваемых пищевых волокон. Данные кислоты являются метаболитами бактерий и активно включаются в работу организма хозяина.

Как гиперпродукция, так и дефицит короткоцепочечных жирных кислот оказывают негативное влияние на жизнедеятельность макроорганизма. При дисбактериозе снижается продукция короткоцепочечных жирных кислот, которые, являясь основными энергоносителями, обеспечивают нормальную трофику слизистой кишечника, снижают его проницаемость по отношению к различным антигенам [24].

Чем ниже содержание летучих жирных кислот (уксусной, пропионовой и др.), тем глубже нарушения микробиоценоза кишечника человека. В результате нарушения обменных процессов развивается воспаление, снижается синтез вторичных желчных кислот. При нарушении энтерогепатической циркуляции желчных кислот происходят изменения в метаболизме холестерина, стероидных гормонов; наблюдаются повреждения слизистой оболочки тонкой кишки за счет накопления деконъюгированных желчных кислот в ее просвете.

Жирные кислоты существуют в различных формах на различных стадиях циркуляции в крови. Они поглощаются в кишечнике, образуя хиломикроны, но в то же время они существуют в виде липопротеинов очень низкой плотности или липопротеинов низкой плотности после превращений в печени. Всасывание происходит напрямую в кровь через капилляры кишечного тракта и, как и другие питательные вещества, проходят через воротную вену, претерпевая превращения в печени [10, 63].



Чаще всего жирные (карбоновые) кислоты классифицируют по числу карбоксильных групп на монокарбоновые, или одноосновные (одна группа - COOH), дикарбоновые, или двухосновные (две группы - COOH), и т.д.

Так, в основном все короткоцепочечные жирные кислоты являются одноосновными карбоновыми кислотами и включают в себя муравьиную (C1), уксусную (C2), пропионовую (C3), масляную / изомасляную (C4), валериановую / изовалериановую (C5) и капроновую / изокапроновую (C6) кислоты.

Перечисленные жирные кислоты в медицинской литературе обозначаются как короткоцепочечные, хотя с биохимической точки зрения таковыми являются не все. Изомасляная, изовалериановая и изокапроновая кислоты являются изомерами масляной, валериановой и капроновой кислот, соответственно, и так называемыми «жирными кислотами с разветвлённой углеродной цепью».

Нормальная микрофлора толстой кишки перерабатывая непереваренные в тонкой кишке углеводы производит перечисленные кислоты с минимальным количеством их изоформ. В то же время, при нарушении микробиоценоза и увеличении доли протеолитической микрофлоры указанные жирные кислоты начинают синтезироваться из белков преимущественно в виде изоформ, что отрицательным образом сказывается на состоянии толстой кишки и может быть диагностическим маркером [33, 63].

Уксусная кислота (или этановая кислота - CH<sub>3</sub>COOH) представляет собой слабую, предельную одноосновную карбоновую кислоту (рисунок 1).

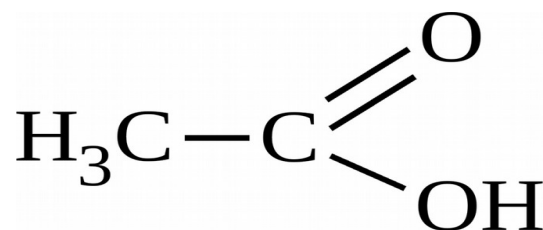


Рисунок 1 - Структурная формула уксусной кислоты

Уксусная кислота при комнатной температуре - бесцветная жидкость с резким запахом. Температура кипения - 118 °С. Температура плавления - 16,8 °С. Молярная масса - 60 г/моль. Систематическое наименование: этановая кислота (англ. ethanoic acid). Соли и эфиры уксусной кислоты называются ацетатами. Безводную уксусную кислоту называют

ледяной. Это связано с тем, что она при охлаждении до температуры  $\sim 16^{\circ}\text{C}$  переходит в кристаллическое состояние и становится похожей на лёд. Уксусную кислоту в гастроэнтерологии обычно относят к классу короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) и в этом контексте её также справедливо относить и к насыщенным жирным кислотам, и к летучим жирным кислотам.

Уксусная кислота образуется в процессе биохимических реакции углеводного обмена, в частности в цикле Кребса. Также ацетат, является основным метаболитом нормальной микрофлоры кишечника человека (грамположительных анаэробных бактерий *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Bacteroides* и других) [37, 72].

Основные физиологические эффекты уксусной кислоты, как метаболита микрофлоры кишечника:

- 1) улучшает кровообращение слизистой кишечника;
- 2) моторную и секреторную функцию кишечника;
- 3) обладает антимикробным действием.

Значительная часть уксусной кислоты, ферментированной кишечной микробиотой, проникает в локальные кишечные капилляры и по системе воротной вены достигает печени, где подвергается трансформации с образованием глюкозы. От 50 % до 70 % абсорбированной уксусной кислоты поглощается печенью — остаток поступает в периферическую циркуляцию и, в конечном счете, метаболизируется периферическими тканями, особенно мышцами, как источник энергии. Уксусная кислота является первичным субстратом для синтеза холестерина, столь необходимого для нейронального и гормонального анаболизма. Она принимает участие в липогенезе и является важным энергетическим субстратом для сердца, мозга, почек, мышц и других периферических тканей [1, 61].

Процентное соотношение концентраций уксусной, пропионовой и масляной кислот в толстой кишке человека составляет примерно 60:20:20. Остальные КЖК присутствуют в незначительных количествах. Состояние кишечной микрофлоры, в первую очередь толстой кишки, в значительной степени определяется характером моторики ЖКТ, что находит отражение в её метаболической активности. При ряде заболеваний желудочно-кишечного тракта количество уксусной кислоты как в абсолютном значении, так и относительно других короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) в кишечнике изменяется [37, 62].

Пропионовая кислота (или пропановая кислота –  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ) является одной из трех важнейших короткоцепочечных жирных кислот, наряду с масляной и уксусной. Пропионовая кислота (рисунок 2) при комнатной температуре — бесцветная жидкость с резким запахом. Температура кипения –  $141\text{ }^\circ\text{C}$ . Температура плавления –  $-21\text{ }^\circ\text{C}$ . Молярная масса –  $74\text{ г/моль}$ . Систематическое наименование: пропановая кислота (англ. propanoic acid). Эмпирическая формула пропионовой кислоты –  $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ .

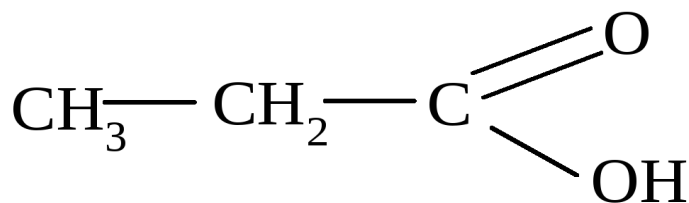


Рисунок 2 – Структурная формула пропионовой кислоты

Среди постоянно обитающей в кишечнике человека индигенной микробиоты важную роль играют бактерии, продуцирующие пропионовую кислоту. Это представители рода *Veillonella*, *Propionibacterium*, *Arachnia*, *Anaerovibrio (polar flagella)*. Бифидо- и лактобактерии также способны синтезировать пропионовую кислоту, но в меньшем количестве. Микроорганизмы сбраживают молочную кислоту, глюкозу, лактозу и другие углеводы, а также некоторые спирты с образованием пропионовой и уксусной кислот и углекислого газа [55].

Пропионовая кислота принимает участие в энергообеспечении эпителия толстого кишечника, оказывает антибактериальный эффект. Одни из наиболее важных эффектов – это регуляция пролиферации и дифференцировки эпителия и поддержание ионного обмена.

Пропионовая кислота также преимущественно поглощается печенью, где участвует в процессе глюконеогенеза, а также регулирует метаболические процессы и липидный обмен. Пропионовая, масляная и валериановая кислоты участвуют в синтезе гормонов, нейромедиаторов (серотонина, эндорфинов).

Если пропионовая кислота присутствует в высокой концентрации, то она, угнетает ферменты и блокирует обмен веществ. Также снижает pH межклеточной среды, что также способствует угнетению роста и гибели клеток [37, 39].

Масляная кислота – одноосновная предельная карбоновая кислота. Химическая формула соединения  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_2-\text{COOH}$  (рисунок 3). Масляная кислота при комнатной температуре – это бесцветная жидкость с резким запахом прогорклого масла. Температура кипения –  $163^\circ\text{C}$ . Температура плавления –  $-5,26^\circ\text{C}$ . Молярная масса –  $81\text{ г/моль}$ . Систематическое наименование: бутановая кислота (англ. butanoic acid). Эмпирическая формула масляной кислоты –  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ . Соли и сложные эфиры масляной кислоты носят наименование бутираты.

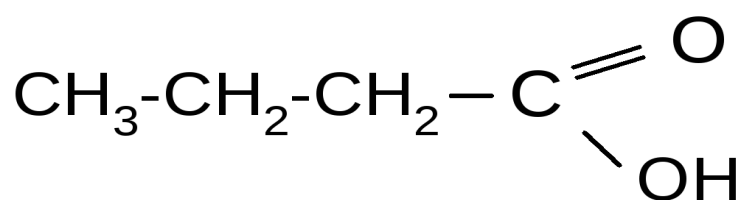


Рисунок 3 – Структурная формула масляной кислоты

На кишечном уровне роль масляной кислоты или бутирата заключается в стимуляции обновления клеток слизистой оболочки толстого кишечника, усилении защитного барьера эпителия, стимулируя синтез муцина и секреции слизи; транспорте трансэпителиальной жидкости, а также модуляции чувствительности и моторики кишечника. Кроме того, большое количество исследований подчеркивает роль бутирата в регуляции водно-электролитного баланса, создании благоприятной среды для роста собственной полезной микрофлоры в толстой кишке, а также профилактике и ингибировании рака [37, 48].

На внекишечном уровне бутират оказывает воздействие на такие состояния как гемоглобинопатия, гиперхолестеринемия, инсулинорезистентность, ишемический инсульт, также некоторые генетические метаболические заболевания. Основными продуцентами бутирата являются эубактерии, пептококки, фузобактерии и клостридии [55].

Основная функция масляной кислоты – это снабжение колоноцитов энергией для улучшения метаболизма и контроля нормального развития клетки. В эпителиальных клетках бутират (70 %) быстро усваивается и метаболизируется в митохондриях до  $\text{CO}_2$  и ацетил-КоА, что представляет собой ключевой этап окислительного метаболического пути. Далее часть ацетил-КоА идет на синтез липидов мембран

колоноцитов. Около 30 % бутирата используется для синтеза длинноцепочечных жирных кислот [48, 57].

Изомасляная кислота – одноосновная предельная разветвлённая карбоновая кислота. Химическая формула соединения:  $(\text{CH}_3)_2\text{-CH-COOH}$  (рисунок 4). Эмпирическая формула изомасляной кислоты –  $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ . Соли и сложные эфиры изомасляной кислоты носят наименование изобутираты. Температура кипения –  $155\text{ }^\circ\text{C}$ . Температура плавления –  $-46,1\text{ }^\circ\text{C}$ . Молярная масса –  $88\text{ г/моль}$ . Изомасляная кислота при комнатной температуре – жидкость с несколько неприятным запахом. Является изомером масляной кислоты [33].

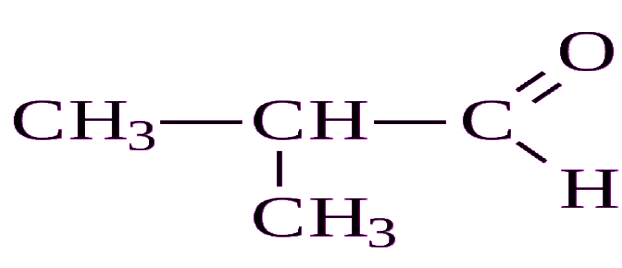


Рисунок 4 – Структурная формула изомасляной кислоты

Изомасляная кислота является метаболитом нормальной микрофлоры кишечника. Здесь она образуется в результате микробного метаболизма белков (валина) в толстой кишке. Чаще всего изомасляная кислота является маркером отклонений в организме человека [47, 54].

Валериановая кислота – одноосновная предельная карбоновая кислота. Химическая формула соединения  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_3\text{-COOH}$  (рисунок 5). Валериановая кислота при комнатной температуре – бесцветная жидкость с неприятным запахом. Температура кипения –  $185,4\text{ }^\circ\text{C}$ . Температура плавления –  $-32\text{ }^\circ\text{C}$ . Молярная масса –  $102\text{ г/моль}$ . Систематическое наименование: пентановая кислота (англ. *pentanoic acid*). Эмпирическая формула валериановой кислоты –  $\text{C}_5\text{H}_9\text{O}_2$ . Соли и сложные эфиры валериановой кислоты носят наименование валератов [17].

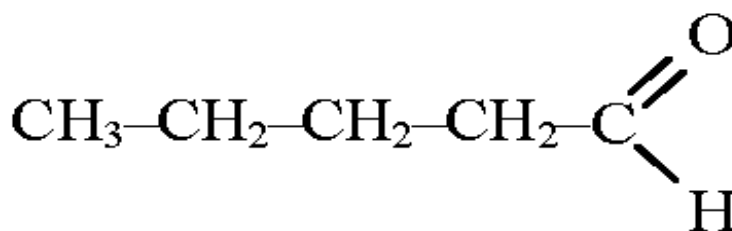


Рисунок 5 – Структурная формула валериановой кислоты

В основном валериановая кислота встречается в корне и корневище растений (например, валерианы), в тюленьем и дельфиньем жире. Часть в свободном состоянии, часть в виде солей и сложных эфиров. Валериановая кислота образуется при окислении многих жиров, а также при гниении альбуминов. Основной эффект в организме человека – регуляция моторно-эвакуаторных расстройств кишечника и участие в образовании нейромедиаторов, например, серотонина. Также может влиять на активность некоторых ферментов, например, деацетилазы гистонов (HDAC, Histone deacetylases), которые регулируют экспрессию генов. Известно участие данных ферментов в различных патологиях, таких как сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенерации рак и др [75].

Среди изомеров валериановой кислоты наибольшее значение имеет 3-метилбутановая кислота (изовалериановая кислота)  $\text{CH}_3\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-CH}_2\text{-COOH}$  (рисунок 6), которую получают из валерианового корня или синтетически. Она применяется для синтеза лекарственных веществ: валидола, бромурала и др., а также для химического синтеза рацематов аминокислоты валина [35].

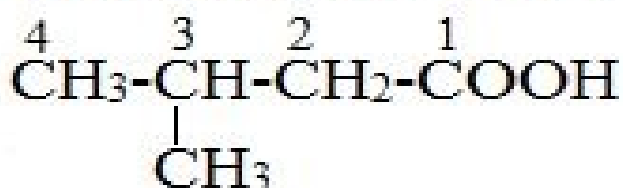


Рисунок 6 – Структурная формула изовалериановой кислоты

Эмпирическая формула изовалериановой кислоты –  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}_2$ . Соли и сложные эфиры изовалериановой кислоты носят наименование изовалератов. Температура кипения –  $176,5\text{ }^\circ\text{C}$ . Температура плавления –  $-29,3\text{ }^\circ\text{C}$ . Молярная масса –  $102\text{ г/моль}$ . Изовалериановая кислота при комнатной температуре – бесцветная жидкость с острым неприятным запахом. Частично растворима в воде, растворима в этиловом спирте.

Изовалериановая кислота – это 5-углеродная жирная кислота с разветвленной цепью, присутствующая в ферментированных пищевых продуктах и получаемая в толстой кишке путем бактериального брожения лейцина. Совместно с ацетатом, пропионатом и бутиратом дифференцированно

влияет на моторику толстой кишки. Как и изомасляная жирная кислота чаще всего является маркером заболеваний [39, 47].

Капроновая кислота (гексановая кислота)  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$  – одноосновная предельная карбоновая кислота (рисунок 7). Соли и анионы капроновой кислоты называют капроатами. Капроновая кислота – это бесцветная маслянистая жидкость с неприятным запахом. Плохо растворима в воде. Хорошо растворима в метаноле, этаноле, эфире. Температура кипения – 202 °С. Температура плавления – -3,4 °С. Молярная масса – 116,6 г/моль. Эмпирическая формула капроновой кислоты –  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$ .

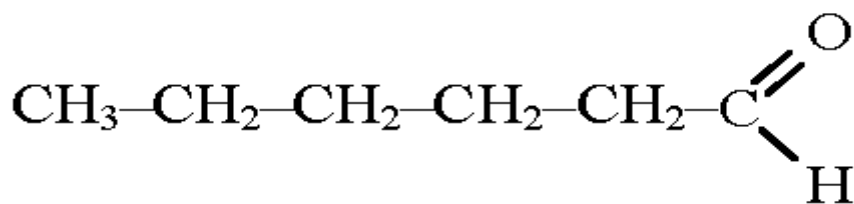


Рисунок 7 – Структурная формула капроновой кислоты

Изокапроновая кислота является изомером капроновой кислоты. Также предстает собой бесцветную маслянистую жидкость с крайне неприятным запахом. Плохо растворяется в воде, хорошо в органических растворителях, таких как метанол, этанол, эфир. Температура кипения – 153,5 °С. Молярная масса – 116,6 г/моль. Эмпирическая формула изокапроновой кислоты –  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_2$ .

Микробиота кишечника принимает активное участие в обмене веществ организма человека, она имеет способность переваривать различные пищевые ингредиенты: белки, жиры и углеводы, а также синтезировать витамины группы В и К [74].

Основные ферментативные реакции расщепления полисахаридов, олигосахаридов и дисахаридов до простых сахаров, сопровождаются увеличением биомассы бактерий. Бактерии способны расщеплять белок, при этом из поступивших в кишечник 20 г нерасщепленного белка, экскретируется с калом лишь 1 г, что говорит о потреблении его микробиотой. Протеолитики образуют изоформы КЦЖК (изокилоты) и их доля увеличивается при воспалительных процессах кишечника. В основном это изоасляная или изовадериановая кислоты [18].

Также бактерии переваривают и жиры, как средне-, так и длинноцепочечных триглицеридов. В результате образуются жирные кислоты, кетокислоты, глицерин, углекислый газ.

Полиненасыщенные жирные кислоты могут трансформироваться в насыщенные: трансцетиновую и стеариновую.

Обычно пища не служит источником короткоцепочечных жирных кислот, но потребление пищевых волокон (неусвояемые неперевариваемые углеводы) или как их по-другому называют клетчатка, способствуют бактериальной ферментации в толстой кишке. Перевариваемые углеводы дают мало КЦЖК [70, 73].

Пищевые волокна являются основным пищевым субстратом для нормофлоры кишечника человека. Поступившие с питанием пищевые волокна не являются источником энергии и не склонны к расщеплению ферментными системами организма человека. Однако, неперевариваемые углеводы могут частично расщепляться в толстой кишке под действием микроорганизмов и являться источником короткоцепочечных жирных кислот. При разложении пищевых волокон большая часть образовавшихся моносахаридов превращается в летучие жирные кислоты (пропионовую, масляную и уксусную) и газы, регулирующие функции толстой кишки [2, 54].

Короткоцепочечные жирные кислоты из-за маленьких размеров способны быстро всасываться в кровь, и являются главным источником энергии для слизистой толстой кишки. Жирные кислоты стимулируют пролиферацию и дифференциацию клеток слизистой, предохраняя ее от дистрофических изменений. КЦЖК – главный источник дыхательного субстрата и ацетил-коэнзима А, необходимых для синтеза липидов и строительства клеточных мембран [23, 36].

Значение короткоцепочечных жирных кислот для макроорганизма (человеческого организма) заключается в их участии следующих важных процессах:

1) регуляция состава микрофлоры (препятствуют патогенным микроорганизмам (шигеллам, сальмонеллам) колонизировать кишечник, улучшают рост некоторых анаэробных бактерий);

2) поддержание водно-электролитного баланса в просвете кишки (захват КЦЖК ассоциирован с транспортом воды, стимулируют кишечное всасывание электролитов (Na, K) и воды, а также всасывание Ca и Mg, препятствуя тем самым остеопении);

3) антиканцерогенное действие (синтез апоптоз-индуцирующих короткоцепочечных жирных кислот пропионовыми кислотами, которые могут быть



использованы как эффективные пробиотики в профилактике рака кишечника) [6, 18].

Также еще не до конца известно участие короткоцепочечных жирных кислот в регуляции гликогенеза и кетонобразования в печени, способности к расслаблению гладкой мускулатуры кишечника и мезентериальных сосудов, влиянии на уровень гипотизарных гормонов (гонадотропинов, соматотропного гормона) [30].

Среди основных ролей КЦЖК рассматривается их действие на иммунную систему и развитие таких заболеваний как бронхиальная астма, атопический дерматит, пищевая аллергия и др. Основной механизм действия – это взаимодействие с G-белковыми рецепторами полиморфноядерных нейтрофилов и макрофагов — GPR41. Рецепторы GPR40, GPR41, GPR43, GPR119 и др. к КЦЖК сопряженные с G белком играют особую роль в регуляции углеводного и липидного обмена веществ, и рассматриваются как мишени для разработки инновационных лекарственных средств.

GPR43 (также называемый FFA2R) принадлежит к субсемейству рецепторов, сопряженных с Gбелком (GPCR), включающему GPR40 и GPR41. Три члена семейства имеют идентичные на 30%-40% последовательности со специфичностью к жирным кислотам с углеродными цепями различной длины, где SCAF (короткоцепочечные жирные кислоты) активируют GPR41 и GPR43, и средне- и длинноцепочечные жирные кислоты (MCFA, LCFA), активируют GPR40. Ацетат и пропионат являются наиболее сильными активаторами GPR43 [42, 67].

Ряд исследований показывают значимую роль рецепторов GPR41 и GPR43 в качестве посредников при взаимодействии микрофлоры, компонентов пищи и организма человека. Отмечена способность короткоцепочечных жирных кислот активировать рецепторы этой группы, что приводит к увеличению выработки инсулина, снижению глюкозы в крови. Стимуляция продлевает чувство насыщения, снижает чувство голода и повышает уровень лептина – гормона, регулирующего энергетический обмен. Снижение концентрации лептина ведёт к развитию ожирения. Однако эти вопросы еще не до конца изучены. (рисунок 8) [32].

### Короткоцепочечные жирные кислоты

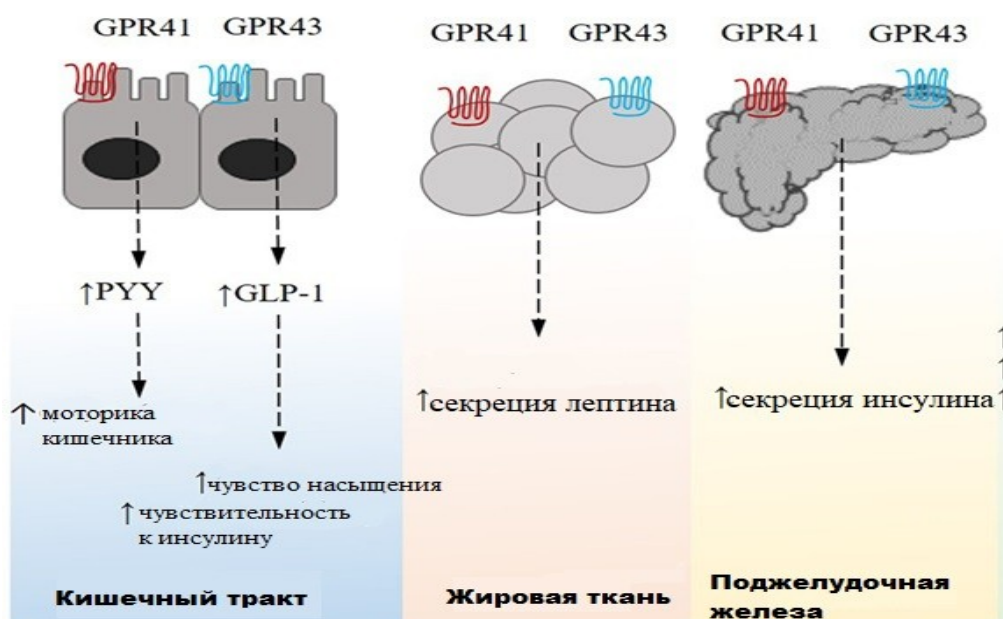


Рисунок 8 – Влияние короткоцепочечных жирных кислот на рецепторы GPR41, GPR43

Многочисленные исследования указывают на участие короткоцепочечных жирных кислот в трофической (пищеварительной) функции микробиоты. Отщепление моносахаридных фрагментов слизи, гликокаликса и продуктов экзогенного происхождения посредством внеклеточных гликозидаз анаэробов-сахаролитиков с последующим брожением этих сахаров в цикле Кребса, ведет к энергообеспечению эпителиальных клеток за счет низкомолекулярных метаболитов (КЦЖК), в основном таких как уксусная, пропионовая, масляная жирных кислоты.

По результатам данных, опубликованных в зарубежной литературе, также обсуждается участие микрофлоры в контроле моторной активности кишечника, посредством продукции монокарбонных (короткоцепочечных) жирных кислот [37, 48, 63].

#### 1.1.2 Полиненасыщенные жирные кислоты

Полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК) – семейство ненасыщенных жирных кислот, имеющих двойную углерод-углеродную связь. Относятся к длинноцепочечным жирным кислотам.

По расположению первой двойной связи от метильной группы полиеновые жирные кислоты в свою очередь делятся на  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 и  $\omega$ -9 (Омега-3, Омега-6, Омега-9) семейства. Жирные кислоты, которые должны поступать с пищей, так как не синтезируются в организме человека, называются незаменимыми (эссенциальными). Основными источниками  $\omega$ -3 ПНЖК являются жирные сорта рыб (лосось, скумбрия, сельдь, палтус, форель, сардины и др.) и некоторые морепродукты, а также льняное масло. ПНЖК  $\omega$ -6 содержатся практически во всех растительных маслах (пальмовое, соевое, рапсовое, подсолнечное и др.) и в орехах [7, 52].

К Омега-3 кислотам относят альфа-линоленовую, эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты. К Омега-6 кислотам принято относить линолевою и арахидоновую кислоты. Омега-9 жирные кислоты включают в себя олеиновую, элаидиновую, гондоиновую, эруковую и нервоновую кислоты. Жирные кислоты в организме человека в свободном виде практически не встречаются, а входят как структурный компонент в состав липидов различных классов: триглицеридов, фосфолипидов, кардиолипина, сфинголипидов [30, 33].

Только растения могут синтезировать линолевою и альфа-линоленовую кислоты. Животные, получив эти кислоты с пищей, синтезируют из них длинноцепочечные арахидоновую, эйкозапентаеновую и докозагексаеновую кислоты.

Линоленовая кислота является триеновой кислотой (имеет три двойные связи), систематическое наименование 9,12,15-октадекатриеновая кислота (рисунок 9), химическая формула соединения  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-CH}_2\text{-CH=CH-(CH}_2\text{)}_7\text{-COOH}$ .

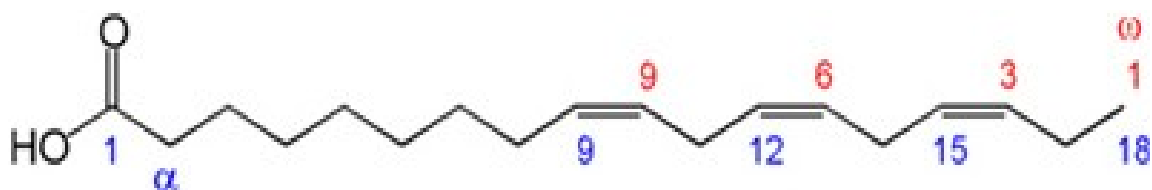


Рисунок 9 – Структурная формула линоленовой кислоты

После приема  $\alpha$ -линоленовой кислоты организм превращает ее в полиненасыщенные жирные кислоты с очень

длинной цепью: быстро до эйкозапентаеновой кислоты и более медленно до докозагексаеновой кислоты, которые в свою очередь играют роль в регуляции уровня липидов, тромбообразовании, вазодилатации [46].

Поэтому многие иностранные исследования показывают, что потребление альфа-линоленовой кислоты снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний связанных с аритмиями, тромбозом, повышенным уровнем триглицеридов, атеросклерозом и др [64, 70].

Эйкозапентаеновая кислота является пентаеновой кислотой (имеется 5 двойных связей), химическое наименование 5,8,11,14,17-эйкозапентаеновая кислота, эмпирическая формула эйкозапентаеновой кислоты –  $C_{20}H_{30}O_2$ . Рациональная полуразвёрнутая формула:  $CH_3-(CH_2)-(CH=CH-CH_2)_5-(CH_2)_2-COOH$  (рисунок 10).

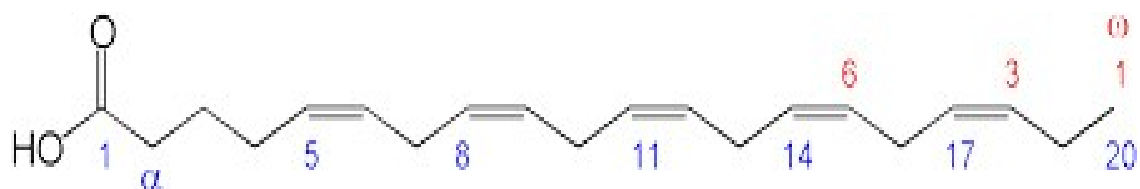


Рисунок 10 - Структурная формула эйкозапентаеновой кислоты

Основные физиологические действия эйкозапентаеновой кислоты включают в себя ингибирование коагуляции тромбоцитов (тромболитическое действие), понижения уровня холестерина (антиатеросклеротическое действие). Более того, эйкозапентаеновая кислота действует как субстрат для образования группы простагландинов. В исследованиях группы ученых под руководством Т.А. Моги говорится о потенциальной противоопухолевой и химиопревентивной активности данной жирной кислоты [59, 60].

Докозагексаеновая или цервоновая кислота (англ. docosahexaenoic acid, или cervonic acid) относится к наиболее ценным для здоровья человека полиненасыщенным омега-3 жирным кислотам. Является гексаеновой кислотой (то есть между атомами углерода в её молекуле имеется 6 двойных связей), систематическое наименование докоза-4,7,10,13,16,19-гексаеновая кислота, эмпирическая формула докозагексаеновой кислоты —  $C_{22}H_{32}O_2$  (рисунок 11).

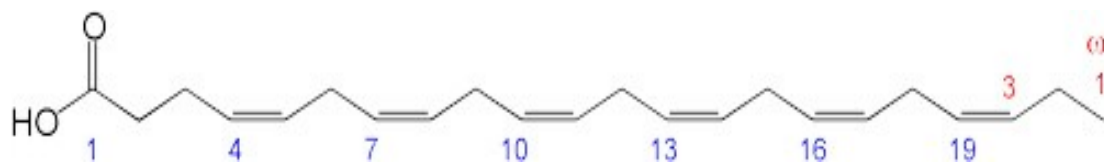


Рисунок 11 - Структурная формула докозагексаеновой кислоты

В основном докозагексаеновая кислота сконцентрирована в сером веществе головного мозга, где участвует в передаче нервных импульсов. Также совместно с альфа-линоленовой кислотой входит в состав мембран и влияет на проницаемость и активность белков, контролируя поступление веществ в клетки, транспорта ионов и нейромедиаторов [58, 67].

Линолевая кислота (англ. linolic acid) - одноосновная карбоновая диеновая кислота (содержит 2 двойные связи на девятом и 12-м из карбонильной функциональной группы.) Относится к семейству омега-6 ( $\omega$ -6) ненасыщенных жирных кислот. Систематическое наименование 9,12,15-октадекадиеновая кислота, химическая формула соединения  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$  (рисунок 12).



Рисунок 12 - Структурная формула линолевой кислоты

Линолевая кислота выполняет особую роль в поддержании здоровья сердца. Исследования показывают, что замена насыщенного жира в пище линолевой кислотой снижает общее количество холестерина. Имеются также некоторые свидетельства того, что линолевая кислота улучшает чувствительность к инсулину и нормализует артериальное давление [44].

Линолевая кислота является предшественником наиболее физиологически активной кислоты семейства Омега-6 жирных кислот - арахидоновой. Арахидоновая кислота - одноосновная омега-6 ( $\omega$ -6) карбоновая кислота с четырьмя изолированными двойными связями, является тетраеновой кислотой, систематическое наименование цис-5,8,11,14-эйкозатетраеновая кислота. Эмпирическая формула арахидоновой кислоты -  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_2$  (рисунок 13).

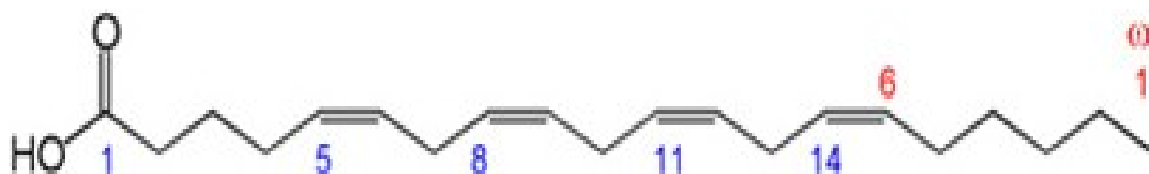


Рисунок 13 – Структурная формула арахидоновой кислоты

Данная полиненасыщенная жирная кислота участвует в образовании липидных медиаторов или гормонов местного действия, которые называются эйкозаноиды. Метаболизм арахидоновой кислоты идет двумя основными путями – циклооксигеназным и липоксигеназным [11, 60].

Циклооксигеназный путь метаболизма арахидоновой кислоты приводит к образованию простагландинов, которые выступают в роли медиаторов отдельных биохимических реакций (в частности, обмена липидов, отдельных ферментативных систем). Они влияют на проницаемость мембран, принимают участие в передаче нервных импульсов, ответственны за воспалительные или аллергические реакции организма [6, 58].

Липоксигеназный активен в лейкоцитах и макрофагах – к образованию лейкотриенов, которые вызывают характерные для развития воспаления процессы. Поэтому лейкотриены называют медиаторами воспаления [15].

Олеиновая кислота (англ. oleic acid; цис-9-октадеценовая кислота)  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$  — мононенасыщенная жирная кислота (с одной двойной связью). Относится к группе омега-9 ненасыщенных жирных кислот (рисунок 14).

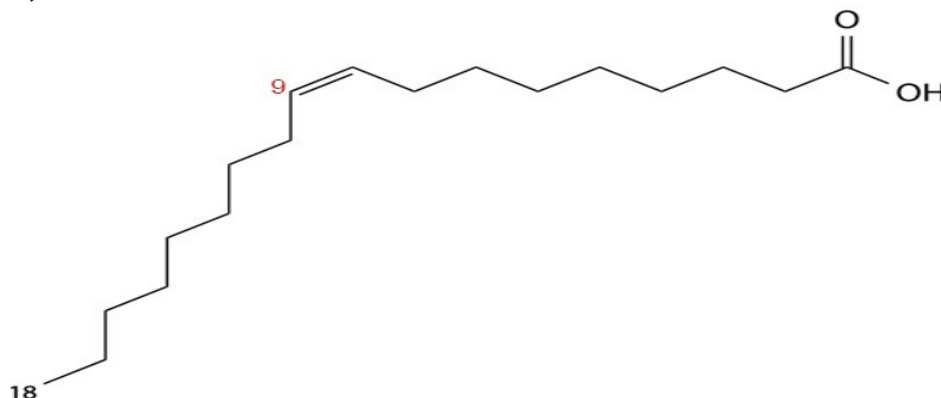


Рисунок 14 – Структурная формула олеиновой кислоты

Олеиновая кислота входит в состав липидов клеточных мембран. Постоянно контактирует со слизистой желудка,

стимулируя продукцию слизи. При стимуляции рецепторов олеиновой кислотой S-клетки двенадцатиперстной кишки продуцируют пептидный гормон секретин. Особая благотворная роль олеиновой кислоты была отмечена при таких заболеваниях сердца, ревматоидном артрите и раке [36, 62].

Элаидиновая кислота или транс-9-октадеценовая кислота со структурной формулой -  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$  - мононенасыщенная жирная кислота (рисунок 15).

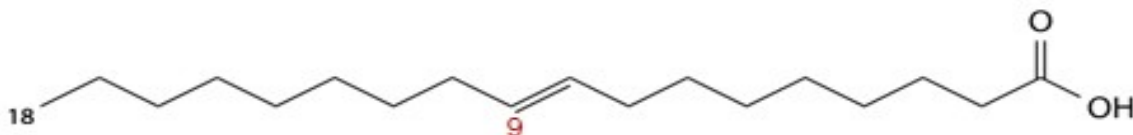


Рисунок 15 - Структурная формула элаидиновой кислоты

Элаидиновая кислота, как транс-изомер олеиновой кислоты, относится к трансжирам, оказывающим негативное влияние на организм человека. В частности, трансжиры увеличивают вероятность атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Также установлено, что 9-транс-октадеценовая кислота оказывает ингибирующее действие на десатуразы - главные ферменты биотрансформации линолевой кислоты в арахидоновую и альфа-леноленовой в эйкозапентаеновую кислоту [56, 61].

Гондоиновая кислота (цис-11-эйкозеновая; англ. gondoic acid или 11-eicosenoic acid). Химическая формула соединения  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_9-\text{COOH}$  (рисунок 16).

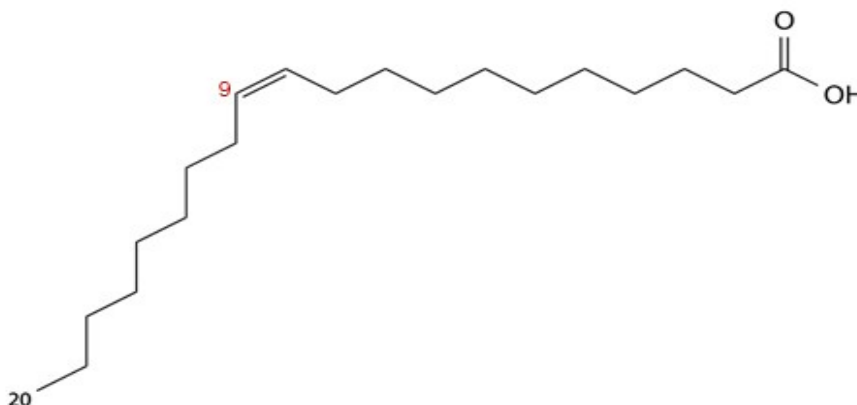


Рисунок 16 - Структурная формула гондоиновой кислоты

Чаще всего применяется в косметологической практике для усиления регенерации и защиты дермы от



ультрафиолетовых лучей, укрепления волосяных фолликул, поддержания функциональности клеточных мембран [56].

Эруковая кислота (англ. erucic acid) – ненасыщенная карбоновая кислота с одной двойной связью. Относится к семейству омега-9 ( $\omega$ -9) мононенасыщенных жирных кислот. Химическая формула соединения  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{11}-\text{COOH}$  (рисунок 17).

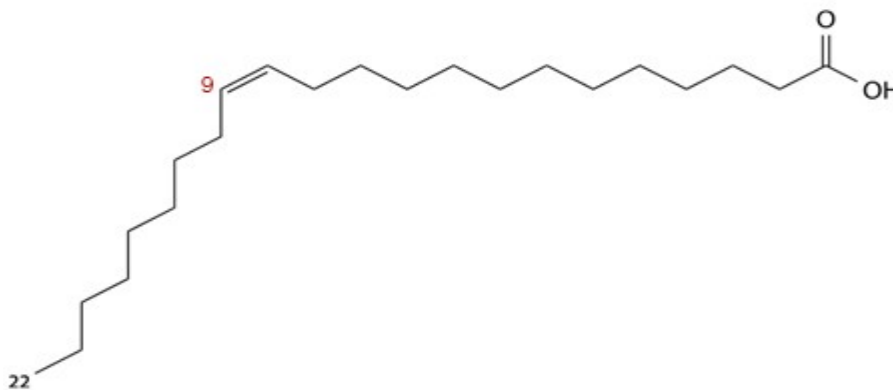


Рисунок 17 – Структурная формула эруковой кислоты

Накопление эруковой кислоты в организме приводит к патологическим изменениям внутренних органов. Известно токсичное влияние эруковой кислоты на сердечную мышцу, приводящее к нарушениям сердечно-сосудистой системы, атеросклерозу и тромбозу сосудов [71, 73].

Нервоновая или селэхолевая кислота является высшей карбоновой кислотой. Химическая формула соединения  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_{13}-\text{COOH}$  (рисунок 18).

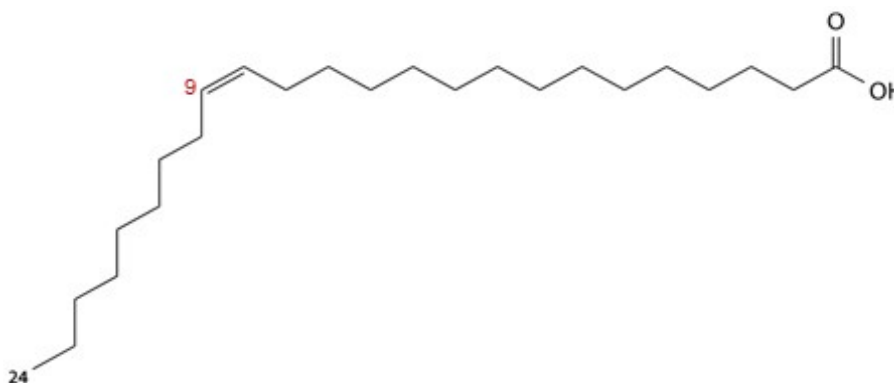


Рисунок 18 – Структурная формула нервоновой кислоты

Нервоновая кислота является компонентом сфинголипидов, в частности цереброзидов. В организме человека нервоновая кислота связывается со сфингозином,



образуя сфингомиелин, необходимый компонент миелина. Также входит в состав белого вещества головного мозга, улучшает прохождение активных веществ через гематоэнцефалический барьер, восстанавливает поврежденные нервные волокна [53].

Все, что человек употребляет в пищу сказывается на составе его микрофлоры, а, следовательно, и на здоровье в целом. Однако, несмотря на большое количество публикаций влияние углеводов, жиров и белков на микробиоту кишечника человека, до конца четко не определено. В частности, недостаточно изучены изменения микробиоты кишечника, связанные с омега-3 жирными кислотами.

Исследования, проведенные у взрослых, показали изменения в микробиоте кишечника после добавления омега-3 ПНЖК. В частности, происходило уменьшение количества *Faecalibacterium*, что связано с увеличением количества *Bacteroidetes* и бутират-продуцирующих бактерий, принадлежащих к семейству *Lachnospiraceae*. Омега-3 жирные кислоты могут оказывать положительное действие, восстанавливая микробиоту при воспалительных заболеваниях кишечника, увеличивая продукцию противовоспалительных соединений, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК). Кроме того, исследования на животных показали, что омега-3 жирные кислоты поддерживают целостность кишечной стенки и взаимодействует с иммунными клетками хозяина [41].

Влияние омега-6 ( $\omega$ -6) полиненасыщенных жирных кислот в настоящее время находятся под вопросом. Однако, многие исследования свидетельствуют о пагубном влиянии избыточного потребления омега-6 ( $\omega$ -6) полиненасыщенных жирных кислот, особенно при хронических метаболических нарушениях. Омега-6 полиненасыщенные жирные кислоты активируют провоспалительные микробы и усиливает колит, но ингибируют системное воспаление, вызванное инфекцией. В отличие от омега-6, омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты обратны эффектам омега-6 полиненасыщенных жирных кислот: ингибируют противовоспалительную микробиоту, но ухудшают инфекционно-индуцированные реакции, приводящие к сепсису [45, 65].

В своей работе «Роль бифидобактерий в кишечном микробиоценозе ВИЧ-инфицированных детей» Захарова Ю.В. говорит о том, что в большинстве случаев гидрофобность клетке придают жирные кислоты липидов цитоплазматической мембраны бактерий, то есть полиненасыщенные жирные кислоты.

Ферменты синтеза жирных кислот локализованы у бактерий между цитоплазмой и внутренней стороной плазматической мембраны. Их активность определяется внешними факторами, поэтому любые изменения в микросимбиозе будут обуславливать различия в путях синтеза жирных кислот у бактерий, что приводит к изменению поверхностных свойств микроорганизмов.

Для выделения поверхностного липопротеина *Wor A* была использована высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Исследование макромолекулярного комплекса проводили у штаммов с разной гидрофобностью. Анализ хроматограмм показал, что липиды, входящие в состав липопротеина характеризуются преобладанием жирных кислот с максимальной степенью насыщенности.

Среди насыщенных жирных кислот у бифидобактерий были обнаружены следующие: лауриновая (C12:0), миристиновая (C14:0), пентадекановая (C15:0), пальмитиновая (C16:0), гептадекановая (C17:0), стеариновая (C18:0), арахидовая (эйкозановая) (C20:0) кислоты. Также среди них присутствовали метилированные кислоты или кислоты с разветвленной цепочкой - 12-метил-тетрадекановая (12Me-C14:0), 13-метил-тетрадекановая (13Me-C14:0), изопентадекановая (*iso*C15:0), изопальмитиновая (*iso*C16:0).

Разветвленные или алициклические жирные кислоты, благодаря особенностям химического строения у грамположительных бактерий выполняют адаптивную функцию, придавая текучесть и пластичность мембране. Такая же функция присуща и ненасыщенным жирным кислотам, наибольшая доля которых обнаружена у бифидобактерий с высокогидрофобными свойствами (29,7%), несколько меньше у штаммов с низкой гидрофобностью (25,3%). Самое низкое содержание ненасыщенных жирных кислот регистрировали при средней гидрофобности, их доля в общей структуре жирных кислот не превышала 8,9%.

Среди мононенасыщенных жирных кислот у бифидобактерий присутствовали миристоолеиновая (C14:1), пентадеценивая (C15:1), пальмитолеиновая (C16:1), *n*-гептадеценивая (C17:1), олеиновая (C18:1). Также были обнаружены полиненасыщенные жирные кислоты - гексадекадиеновая (C16:2) и линолевая (C18:2) [12]. Проанализированные данные по диссертации представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика жирнокислотного состава клеточных стенок бифидобактерий с разной гидрофобностью у ВИЧ-инфицированных детей

№	Состав и количество жирных кислот (мкг)			
	Показатели	<i>B.bifidum</i> Высоко- гидрофобны е	<i>B.bifidum</i> Средне- гидрофобны е	<i>B.bifidum</i> Низко- гидрофобны е
C12:0	Лауриновая	1,4591	1,2316	0,4292
C14:0	Миристиновая	4,0175	1,6072	2,0592
C14:1	Миристолеиновая	1,9844	-	0,3259
isoC15:0	Изопентадеканов ая	0,3404	-	-
12Me- C14:0	12-метил- тетрадекановая	0,7003	-	0,2553
13Me- C14:0	13-метил- тетрадекановая	0,2626	-	-
C15:0	Пентадекановая	2,3735	0,9087	1,1355
C15:1	Пентадеценовая	1,0894	-	0,3803
isoC16:0	Изопальмитинова я	0,5544	20,405	0,2227
isoC16:1	Изогексадеценов ая	0,7976	1,8024	0,2173
C16:0	Пальмитиновая	22,412	-	12,165
C16:1	Пальмитолеинова я	9,3093	-	2,9991
C16:2	Гексадекановая	0,4455	-	0,4455
C17:0	Гептадекановая	0,8852	0,5482	0,4555
C17:1	<i>n</i> -гептадеценовая	1,2937	-	0,2933
C18:0	Стеариновая	19,834	23,574	8,6661
C18:1	Олеиновая	6,3132	1,3593	2,7166
C18:2	Линолевая	2,6945	1,7574	1,3311
C20:0	Арахидиновая	0,9727	1,9001	0,2088

У среднегидрофобных бифидобактерий регистрировали высокое содержание изопальмитиновой (*iso*C16:0) и стеариновой (C18:0) кислот. У них отсутствовали мононенасыщенные жирные кислоты - миристолеиновая (C14:1), пентадеценовая (C15:1), пальмитолеиновая (C16:1), *n*-гептадеценовая (C17:1). Из мононенасыщенных присутствовала только олеиновая (C18:1) кислота.

При высокой гидрофобности клеточной стенки регистрировали все вышеуказанные ненасыщенные жирные кислоты. Пальмитолеиновая кислота (C16:1) содержалась в наибольшем количестве

Установлено, что у бифидобактерий с низкой гидрофобностью из моновенасыщенных кислот также как у высокогидрофобной культуры в наибольшем количестве содержалась пальмитолеиновая (C16:1) и олеиновая (C18:1) кислоты. Полученные результаты позволили предположить нарушение механизмов межбактериального взаимодействия на уровне слизистой [12].

## **1.2 Состав и функции нормальной микрофлоры толстого кишечника. Понятие о дисбиозе**

Организм человека заселен (колонизирован) примерно 500 видами микроорганизмов, составляющими его нормальную микрофлору, в виде сообщества микроорганизмов или микробиоценоза. Они находятся в состоянии равновесия (эубиоза) друг с другом и организмом хозяина (человека). Большинство этих микроорганизмов являются комменсалами, не причиняющими вреда человеку [3, 37].

Наибольшее количество микроорганизмов накапливается в толстой кишке. В организме человека выделяют постоянную и транзиторную микрофлору. Постоянная (резидентная, индигенная, или автохтонная) микрофлора представлена микроорганизмами, постоянно присутствующими в организме (бифидобактерии, лактобактерии, пептострептококки, кишечные палочки и др.). Транзиторная (непостоянная, или аллохтонная) микрофлора не способна к длительному существованию в организме микрофлора (стафилококки, стрептококки, клебсиеллы, клостридии, некоторые грибы и др.).

Значение нормальной микрофлоры толстого кишечника:

1) участие в водно-солевом обмене, обмене белков, углеводов, жирных кислот, холестерина, нуклеиновых кислот, а также в продукции антибиотиков, витаминов (К, группы В и др.), токсинов, короткоцепочечных жирных кислот;

2) принимает участие в механизмах формирования гуморального и клеточного иммунитета, а также неспецифических защитных реакций организма (стимуляция образования интерферона, лизоцима);

3) антагонистические свойства против патогенной и гнилостной микрофлоры (продукция молочной, уксусной кислот; конкуренция с посторонней микрофлорой за счет более высокого биологического потенциала);

- 4) переваривание и детоксикация экзогенных субстратов и метаболитов (лекарственных средств и т. п.);
- 5) разрушение канцерогенных веществ в кишечнике;
- 6) поддержание слизистой оболочки кишечника (рисунок 19) [63].

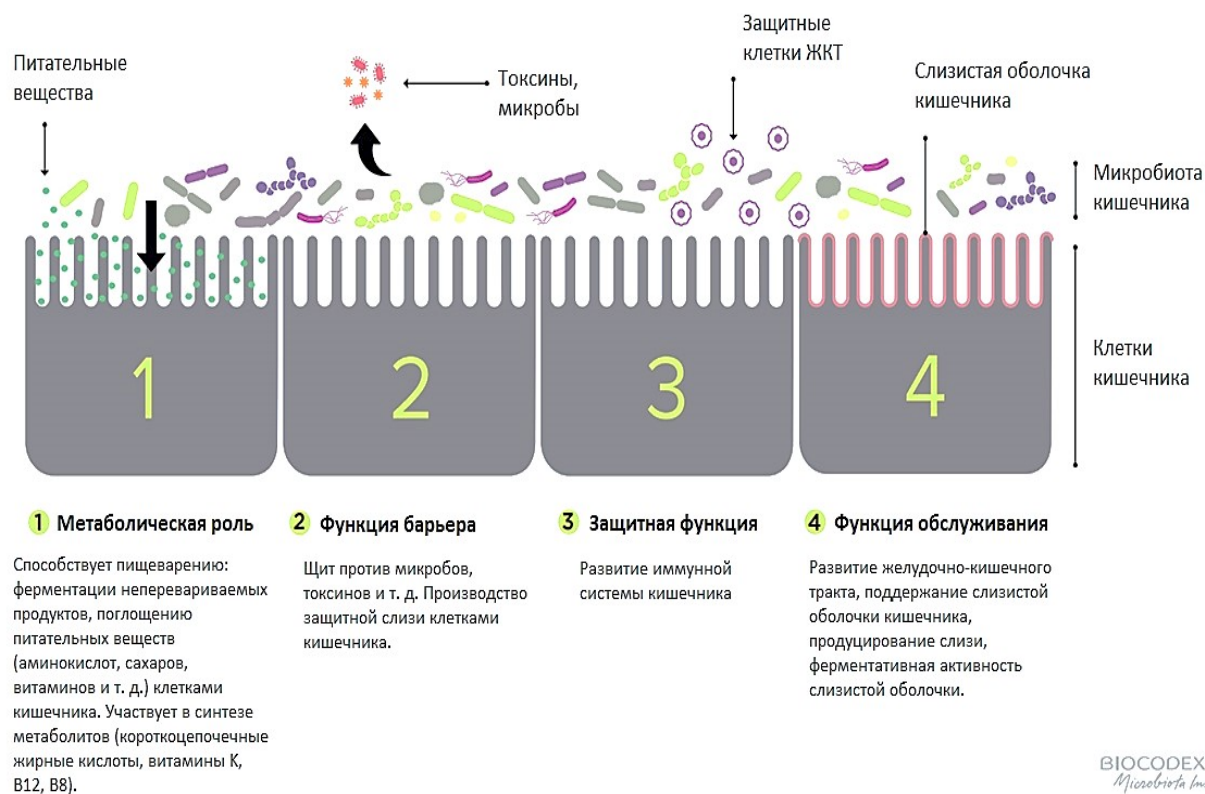


Рисунок 19 – Роль микробиоты кишечника человека

Физиологически нормальное количественное равновесие естественной микрофлоры организма человека называется эубиозом. Он может быть охарактеризован двумя факторами: стабильный состав микроорганизмов в толстом кишечнике и полный объем выполняемых ими физиологических функций.

Облигатная или постоянная микрофлора представлена строгими анаэробами бифидобактериями и бактероидами ( $10^8$ - $10^9$  КОЕ/г фекалий), лактобактериями ( $10^6$ - $10^8$  КОЕ/г), энтерококками –  $10^5$ - $10^6$  КОЕ/г.

Кроме вышеперечисленных выделяют факультативную (условно-патогенную) микрофлору. К ней относят: бактероиды, стрептококки, клостридии, плесневые грибы стафилококки, аэробные бациллы, кандиды, протей и другие. Факультативная или непостоянная микрофлора должна представлять не более 1 % от общей микрофлоры.

Бифидобактерии являются грамположительными палочками и строгими анаэробами. Являясь

сахаролитическими микробами, выделяют большое количество кислых продуктов. Образующаяся молочная, уксусная кислоты способствуют усилению всасывания ионов кальция, железа, витамина D. При снижении концентрации бифидобактерий происходит нарушение всасывания питательных веществ в кишечнике.

Лактобактерии выполняют преимущественно защитную функцию. Основными являются *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*. Антибактериальное действие лактобактерий связано с выработкой ими молочной кислоты, спирта и лизоцима, а также продуктов с высокой антибиотической активностью. Снижение концентрации лактобактерий приводит к сдвигу рН в щелочную сторону, при этом снижая утилизацию кишечником соединений.

В норме у каждого здорового человека естественная микрофлора имеет достаточно сильную устойчивость к действию повреждающих факторов. Состав и функциональность нормофлоры зависит от межпопуляционных различий, климатических условий, географического расположения, экологического состояния среды, рациона питания и др. Также важно учитывать особенности эубиоза у детей, подростков, взрослых и стариков [34, 51]. Таким образом, можно сказать, что эубиоз – это симбиоз между макроорганизмом (или хозяином) и его естественной микрофлорой.

Нарушение состояния эубиоза может происходить под влиянием окружающей среды, стресса, бесконтрольного применения антимикробных препаратов, химиотерапии, нерационального питания. Также изменение количественного состава микроорганизмов толстого кишечника происходит вследствие воспалительных процессов органов пищеварения, например, таких как гастрит, панкреатит, холецистит и другие. Увлечение нетрадиционными способами очищения организма, потребление препаратов для похудения со слабительным действием – все это причины дисбиотических нарушений [43, 49].

Такое состояние утраты нормальных функций микрофлоры, называются дисбактериозом или дисбиозом. Термин «дисбактериоз» был предложен в 1916 году А. Nissle, который под этим явлением понимал только уменьшение количества высеваемой из фекалий кишечной палочки. В настоящее время под дисбактериозом понимают нарушения качественного и количественного состава симбиотической микрофлоры, связанные, по формулировке А.Ф.Билибина, с «

проявлением срыва адаптации, нарушением защитных и компенсаторных приспособлений организма», что является пусковым механизмом для расстройств обменных процессов, развития аллергических реакций, возникновения различных соматических заболеваний.

Наиболее часто дисбактериоз развивается в детском и старческом возрасте. Основные причины – неустойчивость ферментативной и иммунной систем к расширяющейся пищевой нагрузке в детском возрасте и угнетение их в старческом [21, 49].

При дисбактериозе изменяются количественные и качественные показатели бактерий нормофлоры. В результате таких изменений равновесия нарушается колонизационная резистентность, вследствие чего происходит накопление условно-патогенных видов бактерий, которое в свою очередь ведет к нарушению метаболических и морфокинетических (трофических) процессов в организме человека. Происходит активация процессов перекисного окисления липидов, угнетение антиоксидантной защиты, снижение детоксицирующей функции печени, нарушение обменных процессов, синтеза жирных кислот, витаминов, ферментов, медиаторов, органических кислот и т.д. При этом микроорганизмы, размножившиеся в неограниченном количестве, начинают продуцировать токсических продукты метаболизма - индол, скатол, аммиак, сероводород [39, 59].

По общепринятой классификации выделяют четыре степени развития дисбактериоза. Для первой степени характерно сокращение численного показателя лактобактерий, бифидобактерий (до  $10^7$ - $10^8$  КОЕ/г) и других представителей здоровой микрофлоры. Анаэробы преобладают над аэробами. Как правило, на данной стадии клинических проявлений не обнаруживают.

Вторая степень начинается с активного размножения патогенной микрофлоры (кишечной палочки, стафилококка и грибов рода *Candida*). Количество аэробов равно количеству анаэробов. Наблюдается выраженный дефицит бифидобактерий и снижение кислотообразующей активности лактобактерий. Появление начальных симптомов заболевания. Определяется при повышении концентрации условнопатогенных микроорганизмов в концентрации не выше  $10^3$ - $10^4$  КОЕ/г, снижении полезных бактерий до  $10^5$ - $10^6$  КОЕ/г, уменьшение кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью до  $10^6$  КОЕ/г.

При третьей степени в составе микрофлоры в больших количествах (до  $10^4$  КОЕ/г) обнаруживаются патогенные и условно-патогенные бактерии (золотистый стафилококк, протей (до десятков миллионов в ассоциациях), гемолитический энтерококк), нарушается процесс переваривания пищи, секреция ферментов и моторика желудочно-кишечного тракта. Возникают воспалительные процессы. Аэробы преобладают над анаэробами. Бифидо- и лактобактерии на критически низком уровне, менее  $10^5$  КОЕ/г.

К завершающей четвертой степени дисбактериоза относят появление острой инфекции. Данная степень встречается довольно редко. Такое состояние может спровоцировать, например, длительный прием антибиотиков, рентгеновское облучение органов брюшной полости, при онкологических заболеваниях или химиотерапевтическом лечении. В подобных случаях может развиться тяжелая степень дисбиоза с отсутствием бифидобактерий. Происходит быстрое размножение патогенных микроорганизмов (более  $10^8$  КОЕ/г). В кишечнике обнаруживаются протей и синегнойная палочка. Это приводит к процессам брожения и гниения. Следствием чего становится интоксикация организма. При попадании опасных токсинов и вредных веществ в кровь, развиваются воспалительные процессы внутренних органов. Организм претерпевает сильное истощение, возникает авитаминоз и анемия. Бифидо- и лактобактерии отсутствуют [43, 49].

Все эти изменения в составе и функциях нормальной микрофлоры сопровождаются нарушениями для организма хозяина: развитием инфекций, диарей, запоров, синдрома мальабсорбции, гастритов, колитов, язвенной болезни, злокачественных новообразований, аллергий, мочекаменной болезни, гипо- и гиперхолестеринемии, гипо- и гипертензии, кариеса, артрита, поражений печени и др.

### **1.3 Современные аспекты создания метабитиков и их применение в медицине**

Эволюционно сложившийся симбиоз микрофлоры кишечника находится в состоянии равновесия (эубиоза) с клетками человеческого организма и часто подвержен разнообразным нарушениям под воздействием неблагоприятных факторов. Нарушение равновесия, или дисбиоз, приводит к снижению концентрации полезных



бактерий в толстом кишечнике человека. Для восполнения дефицита назначают пробиотики. Пробиотики – это препараты, состоящие из живых микроорганизмов, которые заселяют кишечник человека и приносят ему пользу. Ожившие в кишечнике бактерии продуцируют основные метаболиты – жирные кислоты, которые угнетают условно-патогенную микрофлору, приводя микробиоценоз в норму.

В настоящее время к пробиотикам относятся следующие микроорганизмы: лактобактерии (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. jonsonii*), бифидобактерии (*B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*), непатогенные разновидности *Escherichia Coli* и другие, которые входят в состав таких известных препаратов как:

1) Бифидумбактерин – лиофильно взвешенная взвесь живых бифидобактерий (*B. bifidum* 791). В одной дозе содержится не менее 100 млн. живых микробных клеток;

2) Лактобактерин – препарат, состоящий из лиофилизированных живых лактобактерий (*L. acidophilus*), активно подавляющих жизнедеятельность дизентерийных энтеропатогенных палочек, патогенных стафилококков и протей. Одна доза препарата содержит не менее 1 млрд. живых микробных клеток лактобацилл;

3) Ацилакт – это трехкомпонентный препарат *L. Acidophilus* - NK1, 100аш и K3Ш24. В одной дозе препарата содержится не менее 100 млн. живых микробных тел., проявляющих наиболее высокий уровень активности в отношении шигелл, сальмонелл, протей и других;

4) Аципол (Россия) – лиофилизированная масса живых микробных клеток *L. acidophilus* NK1, NK2, NK5. Одна доза препарата содержит не менее 100 млн. живых клеток лактобацилл [21].

Однако, на сегодняшний день одним из перспективных направлений является создание нового класса препаратов – метабиотиков. Метабиотики – препараты нового поколения, которые создают условия для нормального функционирования кишечной микробиоты в организме хозяина. Более точное определение было сформулировано профессором Б. А. Шендеровым: «Метабиотики являются структурными компонентами пробиотических микроорганизмов и/или их метаболитов, и/или сигнальных молекул с определенной (известной) химической структурой, которые способны оптимизировать специфичные для организма хозяина физиологические функции, регуляторные, метаболические

и/или поведенческие реакции, связанные с деятельностью индигенной микробиоты организма хозяина» [34].

Многочисленные исследования показывают, что большое число соединений обладает способностью стимулировать рост и активность симбионтной микрофлоры. Основными представителями этой группы препаратов являются: олиго- и полисахариды натурального происхождения (например, пищевые волокна злаковых, овощей, фруктов (в частности инулин), трав (псиллиум); дисахариды искусственного происхождения (лактозула); парааминобензойная кислота; лизоцим; кальция пантотенат [29].

В последние годы отдельно выделяется группа метабиотиков, содержащих продукты метаболизма или структурные компоненты пробиотических микроорганизмов. Метабиотики многие ученые относят к средствам нового поколения управления микрофлорой толстой кишки. Они имеют перспективу для коррекции многообразных функциональных нарушений органов и систем, возникающих вследствие дисбиоза. Активные метаболиты обладают комплексом положительных эффектов: антибактериальные свойства позволяют бороться с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, не влияя при этом на полезную микрофлору кишечника; благодаря ферментной активности гидролитических энзимов улучшается пищеварение; усиливается иммунная защита организма [8, 25].

Терапевтический эффект метабиотиков обусловлен сочетанием нескольких основных действий: способностью обеспечивать необходимые для нормального взаимодействия эпителия и микрофлоры условия гомеостаза в контактной зоне, а также прямым влиянием на физиологические функции и биохимические реакции макроорганизма, воздействуя на активность клеток и биопленок. При этом стимулируется собственная микрофлора организма. Такая терапия адекватно физиологична, поскольку осуществляет регулирующее влияние на симбионтные отношения хозяина и его микрофлоры и теоретически способна сводить к минимуму возможность побочных эффектов проводимого лечения [5, 29].

Проблемы, возникающие при применении пробиотиков положили начало для создания нового класса – метабиотиков. К самым распространенным ограничениям пробиотиков относят: выживаемость при попадании в желудочно-кишечный тракт и бионесовместимость. При попадании пробиотиков в тонкий кишечник – среду с ферментами и желчными кислотами многие штаммы микроорганизмов погибают и не доходят до

толстого кишечника. При этом не помогают никакие кислотоустойчивые капсулы. По данным А. Bezkorovainy (2001), лишь от 20 % до 40 % селективных штаммов выживает в желудке [38].

Для отдельно взятого организма нормой является свое соотношение микроорганизмов или аутоштаммов. Нарушение равновесия легко может привести к состоянию дисбиоза с последующими проблемами со здоровьем. Пробиотики изготавливают на основе «универсальных» производственных штаммов и именно поэтому все пробиотические клетки, которые доходят до толстой кишки могут вступать в антагонистические взаимоотношения с аутоштаммами организма-хозяина [9].

Имеются наблюдения, что молочнокислые бактерии, включая бифидобактерии, могут быть ответственны за аллергические и аутоиммунные патологии. Могут увеличивать агрегацию тромбоцитов, усиливая клинические проявления гемолитического уремического синдрома, некоторые из них могут быть источником токсических биогенных аминов.

Применение метабиотиков позволяет создать управляемый микробиоценоз кишечника, поскольку метаболические, сигнальные, транспортные и другие функции представителей индигенной микробиоты имеют большее значение, чем количественное содержание в биотопе микроорганизмов тех или иных видов [34]. Как класс метабиотики выделены в практических рекомендациях Всемирной гастроэнтерологической организации, в определениях Экспертного комитета ФАО и ВОЗ еще в 2008 году.

Среди наиболее известных, клинически используемых в России и мире метабиотиков, следует назвать Хилак-Форте, Бактистатин, Хелинорм, Актофлор С, Дайго (Daigo), Закофальк и некоторые другие.

Одним из первых представителей группы метабиотиков стал Хилак форте (Ratiopharm GmbH, Германия). В препарате содержится пастеризованный концентрат продуктов обмена сахаролитической (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* и *Enterococcus faecalis*) и протеолитической (*Escherichia coli*) микрофлоры, содержащий короткоцепочечные жирные кислоты (рисунок 20).



Рисунок 20 – Метабиотик Хилак-Форте

Короткоцепочечные жирные кислоты, содержащиеся в Хилак форте, способствуют восстановлению поврежденной микрофлоры кишечника, стимулируют регенерацию эпителия кишечника [8, 29].

Л. Н. Мазанкова и соавт. в контролируемом сравнительном исследовании двух средств, одним из которых был Хилак форте, у детей с острой кишечной инфекцией выявили, что Хилак форте вызывал более быстрое и стойкое купирование основных симптомов (интоксикации, обезвоживания, кишечного и абдоминального синдромов). После 7-дневного курса Хилак форте состав микрофлоры ЖКТ не изменился, общее содержание летучих жирных кислот и их соотношение нормализовались. Результаты этого исследования позволяют рекомендовать Хилак форте для лечения легких и среднетяжелых форм остро кишечной инфекции у детей [22].

Еще одним представителем последнего класса препаратов является препарат Бактистатин. В его состав входят активные метаболиты *B. subtilis* (пробиотическая составляющая), цеолит (энтеросорбент), гидролизат соевой муки (пребиотическая составляющая). Активные метаболиты *B. subtilis* – лизоцим, бактериоцины, каталазы, ферменты, аминокислоты, полипептиды и др. составляющие Бактистатина обеспечивает коррекцию дисбиотических изменений микрофлоры ЖКТ за счет подавления условно-патогенных микроорганизмов и стимуляции функциональной активности нормальной микрофлоры кишечника. В.В. Павленко и соавт. проводили исследования эффективности данного метаболита в комплексной терапии 30 больных ЯК различной тяжести. По результатам исследования было выявлено, что на фоне приема метаболита отмечалось повышение концентрации

короткоцепочечных жирных кислот, и была заметна тенденция к формированию их нормального профиля [27].

Актофлор-С – это метабиотик (метаболический пробиотик) нового поколения, который стимулирует восстановление индивидуальной микрофлоры и устраняет проявления дисбактериоза. В состав данного метабиотика входят L-глутаминовая кислота, янтарная кислота и незаменимые аминокислоты L-метионин и L-лизин, которые являются наиболее активными стимуляторами роста пробиотического штамма *E. coli* M-17. А также ацетат натрия, который в сочетании с муравьиной и молочной кислотами ингибирует избыточный рост условно-патогенных микрофлоры (рисунок 21).



Рисунок 21 – Метабиотик Актофлор-С.

Метабиотики могут приниматься не только для лечения, но и для поддержания собственной микрофлоры кишечника. Они продаются в аптечных сетях в виде биологически активных добавок, однако перед употреблением лучше проконсультироваться со специалистами [31].

## 2 Материалы и методы исследования

### 2.1 Этапы и схема исследования

Исследование состояло из трех этапов: подготовительного, экспериментального, аналитического. Этапы исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Этапы исследования микроорганизмов

1 этап подготовительный	Анализ отечественной и зарубежной литературы по выбранной тематике
2 этап экспериментальный	1) Культивирование пробиотических и клинических штаммов бифидо- и лактобактерий; 2) Получение супернатантов кишечных и пробиотических бифидо- и лактобактерий; 3) Определение концентрации жирных кислот методом газожидкостной хроматографии.
3 этап аналитический	Проведение статистической обработки материалов с использованием статистических методов анализа результатов исследования и формирование выводов.

Отбор пробиотических штаммов бактерий отечественной коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича и Всероссийской коллекции промышленных

ия представ

Отбор, выделение и идентификация клинических штаммов бифидобактерий, изолированных от 15 пациентов с различными степенями дисбиоза.

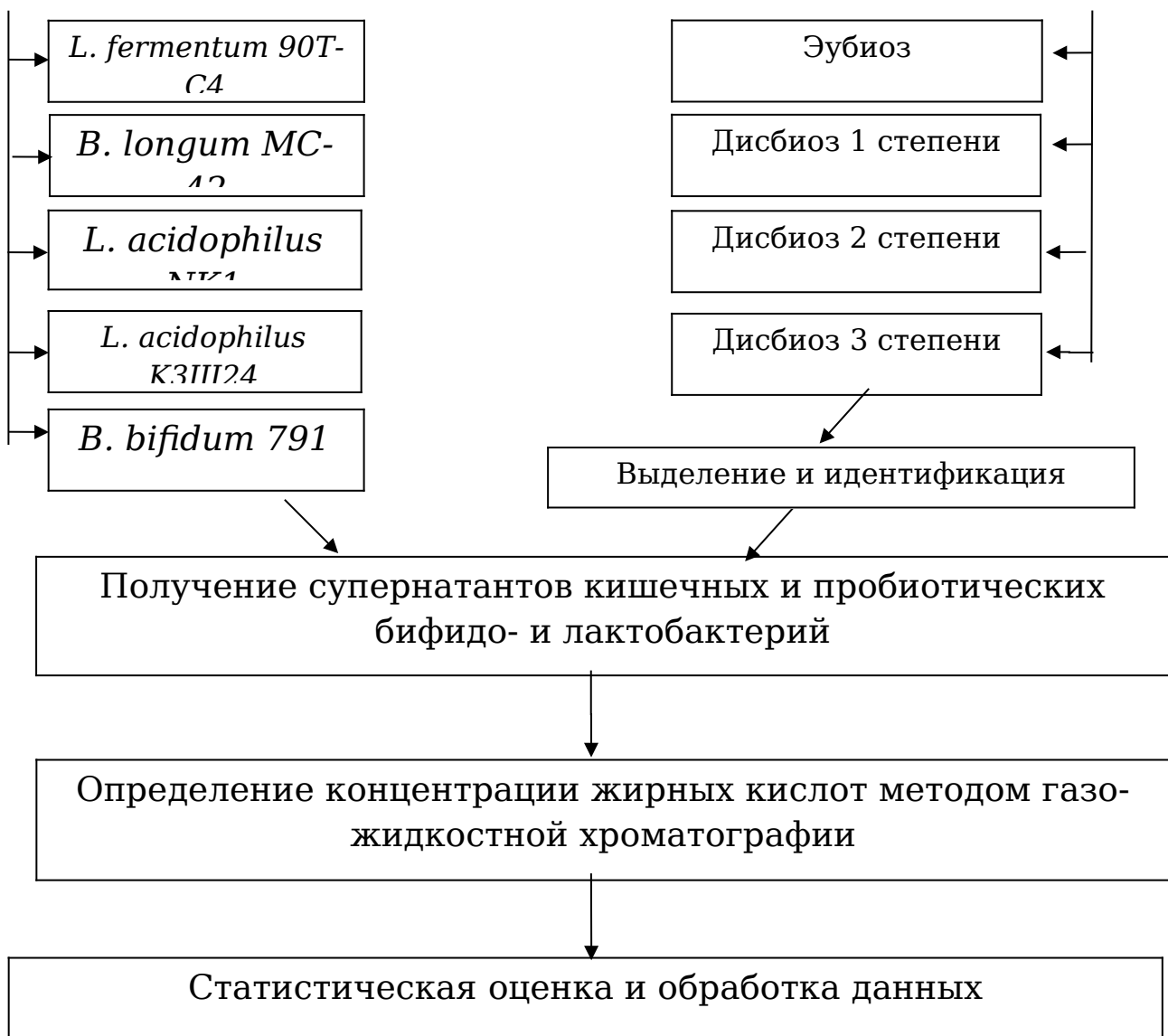


Рисунок 22 – Схема исследования

## 2.2 Характеристика микроорганизмов, используемых в экспериментальной работе

В работе были использованы эталонные штаммы бактерий отечественной коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича (*L. fermentum* 90Т-С4, *B. longum* МС-42), Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика» (*L. acidophilus* NK1, *L. acidophilus* КЗШ24, *B. bifidum* 791). Материалом для исследования клинических были метаболиты бифидобактерий, выделенные от 15 пациентов при обследовании на дисбиоз толстого кишечника. Выделение микроорганизмов проводили общепринятыми методами, идентификацию бифидобактерий осуществляли масс-спектрометрическим методом с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра «Microflex» («Bruker Daltonics», Германия).

### 2.2.1 Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки *L. fermentum* 90Т-С4

Штамм *L. fermentum* 90-ТS-4 депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов под регистрационным номером Б-7573. Штамм *L. fermentum* 90Т-С4 характеризуется следующими культурально-морфологическими и физиолого-биохимическими признаками. Культурально-морфологические признаки: Клетки представляют собой грамположительные мелкие палочки, расположенные в цепочки. На плотных питательных средах образует мелкие выпуклые колонии с ровным краем белого цвета. Факультативные анаэробы, растут в атмосфере углекислого газа и азота, а также в присутствии кислорода. Физиолого-биохимические признаки: Строгий анаэроб. Температурный диапазон роста (37±1) °С. Оптимум рН 7,2 - 7,5. Расщепляет глюкозу с образованием кислоты и газа. Разлагает лактозу, мальтозу, галактозу, слабо - маннозу и сахарозу. Сорбит, целлобиозу, раффинозу, салицин, маннит не сбраживает. Частично восстанавливает лакмусовое молоко, образует аммиак аргинина [20].

### 2.2.2 Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки *B. longum* МС-42

Штамм *B. longum* МС-42 депонирован во Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН



МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора под номером 210. Культурально-морфологические признаки: клетки – грамположительные неподвижные зернистые палочки прямые или изогнутые с утолщением или ветвлением на одном или двух концах длиной от 4,0 до 5,0 мкм, располагающиеся в виде отдельных клеток или скоплений. В анаэробных условиях на поверхности среды МРС-5 через 56 ч инкубации при температуре  $(38\pm 1)$  °С образует круглые мелкие белые колонии; в полужидких средах – печеночной среде Блаурокка. Физиолого-биохимические признаки: Строгий анаэроб. Оптимальная температура роста бифидобактерий  $(38\pm 1)$  °С, фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 56 - 72 ч. Не ферментируют арабинозу, ксилозу, инулин, сорбит, салицин. Ферментируют мальтозу, глюкозу, галактозу, лактозу, сахарозу, слабо целлюбиозу [4].

### 2.2.3 Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки *L. acidophilus* NK<sub>1</sub>

Штамм *L. acidophilus* NK<sub>1</sub> депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ № В-8957 (В центральной лаборатории ВНИМИ № 22/10). Культурально-морфологические признаки: Грамположительные прямые бесспорные палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек из 2-4 и более клеток или поодиночке. Штаммы, применяемые для изготовления препарата, могут находиться в S и R-форме. Величина клеток 18-часовой культуры в молоке составляет 10-20 мкм. Клетки равномерно окрашиваются по Граму. При выращивании на агаре с гидролизированным молоком через 48-72 ч роста штаммы образуют «локонообразные» колонии на поверхности агара и колонии в виде «паучков» в глубине агара. Диаметр колоний – 1-2 мм. При культивировании на среде МРС-5 в анаэробных или микроаэрофильных условиях через 48-72 ч штаммы образуют круглые без четких границ колонии.

Факультативные анаэробы, микроаэрофилы; растут в присутствии азота и углекислого газа в атмосфере. Физиолого-биохимические признаки: Строгие анаэробы. Оптимальная температура роста для обоих штаммов  $(38\pm 1)$  °С. Не ферментируют маннит, рамнозу, ксилозу, сорбит, арабинозу. Ферментируют без газа глюкозу, галактозу, лактозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу [20].

#### 2.2.4 Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки *L. acidophilus* K3Ш24

Штамм *L. acidophilus* 100аш депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) ФГУП ГосНИИГенетика, ВКПМ под номером В-3190, штамм *L. acidophilus* K3Ш24 под номером В-3090. Культурально-морфологические признаки: Грамположительные прямые бесспорные палочки, располагающиеся поодиночке или в виде цепочек из 2 - 4 и более клеток. Штаммы, применяемые для изготовления препарата, могут находиться в S и R-форме.

Факультативные анаэробы, микроаэрофилы растут в присутствии азота и углекислого газа в атмосфере. Размер клеток 18-часовой культуры, выращенной в молоке, составляет 10-20 мкм. Клетки равномерно метиленовой синью. При выращивании на агаре с гидролизованым молоком через 48-72 ч роста штаммы образуют «локонообразные» колонии на поверхности агара и колонии в виде «паучков» в глубине агара. Диаметр колоний - 1-2 мм. Физиолого-биохимические признаки: Строгие анаэробы. Оптимальная температура роста для обоих штаммов (38±1) °С. Не ферментируют маннит, рамнозу, ксилозу, сорбит, арабинозу. Ферментируют без газа глюкозу, галактозу, лактозу, маннозу, декстрозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, целлобиозу, салицин, экскулин, меллибиозу [20].

#### 2.2.5 Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки *B. bifidum* 791

Штамм *B. longum* 791 депонирован во Государственной коллекции микроорганизмов нормальной микрофлоры ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора под номером 80.

Культурально-морфологические признаки: грамположительные неподвижные палочки длиной от 4,0 до 5,0 мкм, которые располагаются в виде отдельных клеток или скоплений и имеют бифуркацию или утолщение на одном или обоих концах клетки. В анаэробных условиях на поверхности

среды МРС5 через 56 ч инкубации при температуре  $(38 \pm 1)$  °С образуют круглые мелкие белые колонии.

Физиолого-биохимические признаки: Строгие анаэробы. Оптимальная температура роста для обоих штаммов  $(38 \pm 1)$  °С, фаза максимального накопления микробных клеток заканчивается к 16-24 ч. Не ферментируют арабинозу, мальтозу, маннозу, ксилозу, инулин, сорбит, салицин. Ферментируют глюкозу, галактозу, лактозу, слабо целлюбиозу и сахарозу [4].

## **2.3 Выделение клинических штаммов микроорганизмов**

Материалом для исследования клинических штаммов послужили метаболиты бифидобактерий, изолированные от 15 пациентов при обследовании на дисбиоз толстого кишечника. Выделение микроорганизмов проводили общепринятыми методами, идентификацию бифидобактерий осуществляли масс-спектрометрическим методом с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра «Microflex» («Bruker Daltonics», Германия). Отбор фекалий проводили в стерильные пенициллиновые флаконы. Навеску 1 г испражнений тщательно растирали в стерильной ступке с 9 мл стерильного буферного раствора. Из основного разведения делали ряд последующих разведений с  $10^{-2}$  до  $10^{-12}$ , производили высев суспензии (0.05, 0.1, 1.0 мл) на Schaedler-агар. Все посеvy инкубировали в термостате при 37 °С. Количественное содержание бифидобактерий определяли, высевая 1 мл суспензии из разведений  $10^{-5}$ - $10^{-12}$  в полужидкую среду на питательной основе Schaedler-бульона. Общее количество аэробных микроорганизмов и их гемолизирующие свойства определяли путем посева суспензии из разведений  $10^{-5}$  и  $10^{-7}$  на 5 % кровяной агар. Через сутки инкубации производили подсчет и микроскопию окрашенных по Граму мазков из различных колоний и определяли процент гемолизирующих культур среди колоний одного вида [14].

### **2.3.1 Масспектрометрическая идентификация бифидофлоры**

Масс-спектрометрический анализ был проведен с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра «Microflex» (Bruker, Daltonics, Германия). Для получения каждого масс-спектра использовали 50 импульсов лазера с мощностью излучения, установленной на уровне минимального порогового значения, достаточного для десорбции-ионизации образца. Параметры массспектрометра оптимизировали для диапазона от 2000 до 18 000 m/z (масса на заряд). Внутреннюю калибровку указанного диапазона проводили с использованием точных значений масс известных белков бифидобактерий. От обследуемых выделено 24 штамма бифидобактерий: *Bifidobacterium longum* – 12 штамма, *Bifidobacterium bifidum* – 8 культур, *Bifidobacterium pseudolongum* – 1 штамм и *Bifidobacterium catenulatum* – 3 культуры [14].

## **2.4 Получение супернатантов пробиотических бифидо- и лактобактерий**

Штаммы пробиотических и клинических микроорганизмов предварительно культивировали на питательной среде Schaedler-агар (BBL, США) с добавлением 5 % бараньих эритроцитов. Среда имеет следующий состав (г/л): панкреатический гидролизат казеина – 30,0; экстракт пекарских дрожжей – 5,0; глюкоза – 7,5; лактоза – 2,5; цистеин – 0,5; NaCl – 2,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,5; аскорбиновая кислота – 0,5; ацетат натрия – 0,3; гидролизат рыбной муки – 50,0; твин 80 – 1,0 мл; 50 %-ный раствор лактулозы – 5,0 мл; гемин – 5 мг; агар – 15-20. Готовые среды стерилизовали в автоклаве при 0,5 атм 20 минут.

Перед посевом все питательные среды регенерировали в анаэробных условиях не менее 24 часов. Анаэробные условия создавали с помощью газогенераторных пакетов «GasPak Anaerobic System» (BBL, США) в анаэробной камере «GasPak 150» (BBL, США). Посевы инкубировали в анаэробрежиме при 37°C в течение 48 часов. Из выросших колоний производили пересев на чистые культуры с одновременной постановкой пробы на аэротолерантность. Если культура, выросшая в анаэробных условиях, давала рост и в аэробных условиях, ее рассматривали как факультативно анаэробную, а при отсутствии роста в аэробных условиях - как строго анаэробную.

Из чистых культур анаэробных микроорганизмов, с целью определения морфологии выделенных штаммов, готовили

мазки с последующей окраской их по Грамму. Предварительную идентификацию бифидобактерий производили через 48 часов с момента посева на основании микроскопии мазков.

В дальнейшем для получения супернатантов бактерий, чистые культуры вносили в жидкий питательный Schaedler-бульон (BBL, США) и культивировали при 37 °С в течение 48 ч. Среда имеет следующий состав (г/л): панкреатический гидролизат казеина – 30,0; экстракт пекарских дрожжей – 5,0; глюкоза – 7,5; лактоза – 2,5; цистеин – 0,5; NaCl – 2,5; MgSO<sub>4</sub> – 0,5; аскорбиновая кислота – 0,5; ацетат натрия – 0,3; гидролизат рыбной муки – 50,0; твин 80 – 1,0 мл; 50 %-ный раствор лактулозы – 5,0 мл; гемин – 5 мг.

Для получения экзометаболитов суточную бульонную культуру центрифугировали 10 минут при 13 000 об./мин, далее отбирали надосадок. Стерильность метаболитов бактерий проверяли путём высева их образца на 5 % кровяной агар и последующим инкубированием при 37 °С в течение 24 ч [50].

## **2.5 Определение спектра жирных кислот супернатантов пробиотических культур методом газожидкостной хроматографии**

Хроматография — это физико-химический метод разделения веществ на монокомпоненты. Разделение веществ основано на распределении элементов смесей между подвижной (элюент) и неподвижной фазами (твердое вещество или жидкость на основе инертного носителя). Название метода связано с первыми экспериментами по хроматографии, в ходе которых разработчик метода Михаил Цвет разделял ярко окрашенные растительные пигменты.

Газовая хроматография — физико-химический метод разделения веществ, основанный на распределении компонентов анализируемой смеси между двумя несмешивающимися фазами, где в качестве подвижной фазы выступает газ (газ-носитель), а в качестве неподвижной фазы – твердый сорбент или жидкость, нанесенная на инертный твердый носитель или внутренние стенки колонки.

В зависимости от типа используемой неподвижной фазы газовую хроматографию подразделяют на газоадсорбционную и газожидкостную хроматографию. В первом случае неподвижной фазой является твёрдый носитель (силикагель,

уголь, оксид алюминия), во втором — жидкость, нанесённая на поверхность инертного носителя.

Газо-жидкостная хроматография — разделение газовой смеси вследствие различной растворимости компонентов пробы в неподвижной фазе — жидкости, нанесенной на инертный носитель.

Хроматографический анализ проводится при помощи газового хроматографа (рисунок 23). Стандартный прибор хроматографического оборудования состоит из следующих узлов:

- 1) баллон с газом (элюентом);
- 2) регулятор расхода элюента (контроль расхода газа и обеспечение необходимого давления на входе в систему);
- 3) устройство ввода пробы;
- 4) хроматографическая колонка (разделение веществ);
- 5) термостат (поддержание температуры в колонке);
- 6) детектор (регистрация концентрации веществ на выходе из колонки);
- 7) электронный усилитель (усиления электрического сигнала).



Рисунок 23 – Газо-жидкостный хроматограф GC-2010 Plus, Shimadzu

Из баллона поступает газ-носитель, он же элюент, в блок носителя, где происходит дополнительная очистка газа. От исследуемой смеси отбирают пробу, которая вводится в испаритель хроматографа через резиновую мембрану. Температура испарителя как правило задается на 50 °С выше, чем температура кипения самого труднолетучего компонента в смеси. Далее происходит испарение жидкой пробы и поток газа переносит ее в колонку хроматографа. Разделение

осуществляется при температуре от 200 °С до 400 °С. Компоненты пробы, разделенные в хроматографической колонке, поступают в детекторы, где происходит регистрация и на основании полученных данных, вырисовывается хроматограмма.

Для определения концентраций короткоцепочечных жирных кислот в культуральной жидкости микроорганизмов применялся метод разделения подкисленного супернатанта пробы на газо-жидкостном хроматографе в три этапа:

- 1) пробоподготовка;
- 2) хроматографирование;
- 3) обработка результатов.

Пробоподготовка включает в себя экстракцию метаболитов из супернатанта. Для этого на первом этапе отбирается 500 мкл супернатанта в отдельную пробирку с помощью автоматической пипетки со сменными наконечниками. Затем к супернатанту добавляют 50 мкл  $H_2SO_4$  (PanReas AppliChem, Германия) и экстрагируют летучие жирные кислоты из образцов 750 мкл изобутилового спирта (Sigma-Aldrich, США). Экстракцию проводят 30 минут, перемешивая пробы каждый 10 минут. После чего отбирают 500 мкл органической фазы в отдельную пробирку. Процесс повторяют еще 2 раза [28, 26].

В работе использовали газо-жидкостный хроматограф GC-2010 Plus, Shimadzu (Япония), оборудованный пламенно-ионизационным детектором с капиллярной колонкой HP-FFAP (Agilent Technologies, США), диаметром 0,32 мм, длиной 50,0 метра.

Параметры хроматографирования:

- 1) температура испарителя 240 °С;
- 2) температурная программа для капиллярной колонки составляла:

- 0,0 мин - 70 °С;
- 10,0 мин - 160 °С;
- 5,0 мин - 180 °С;
- 25,0 мин - 240 °С;

- 3) температура детектора - 260 °С.

В качестве газа-носителя использован гелий (Air Liquide), скорость газа-носителя 21 см/сек, давление в колонке 74 кПа.

Пробу вводили газонепроницаемым шприцом «Hamilton» объемом 10 мкл. Объем вносимой пробы составлял 1 мкл. При этом шприц предварительно дважды промывали в изобутиловом спирте.

Для определения количества компонентов в пробе использовали метод абсолютной градуировки с предварительным построением градуировочного графика ряда концентраций чистых веществ жирных кислот (Sigma-Aldrich, США). Расчет концентраций в супернатантах низкомолекулярных монокарбоновых кислот: уксусной (C2), пропионовой (C3), масляной (C4), изо-масляной (iC4), валериановой (C5), капроновой (C6), изо-капроновой (iC6) кислот проводили по площадям пиков и осуществляли с помощью компьютерной программы GCsolution (Shimadzu, Япония) (рисунок 24).

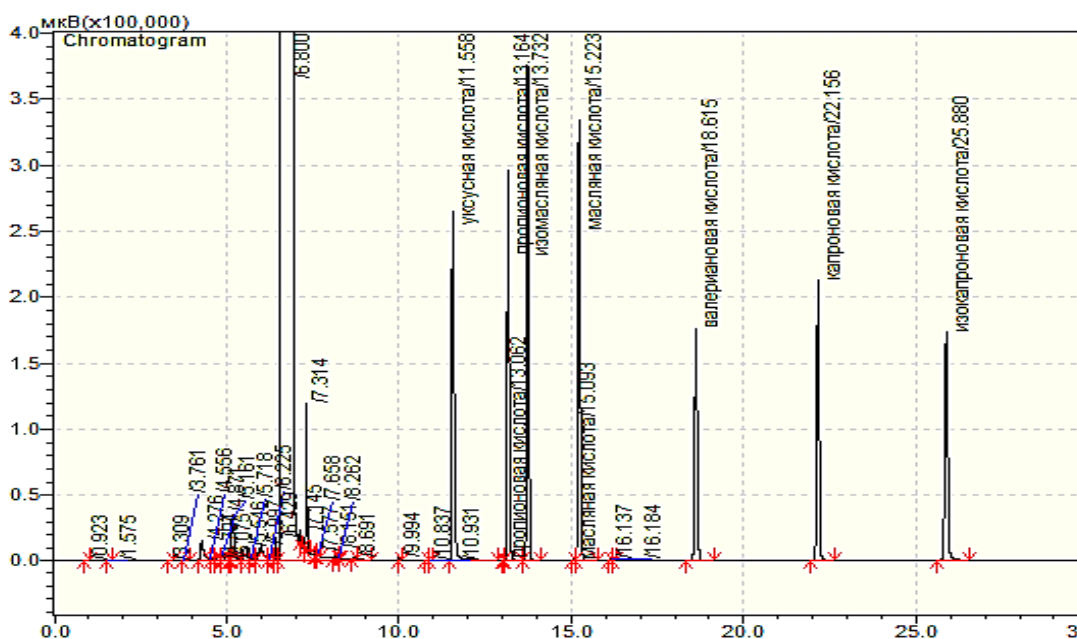


Рисунок 24 – Хроматограмма стандартов короткоцепочечных жирных кислот. Порядок выхода кислот на колонке: ацетат (11 мин 30 с), пропионат (13 мин), i-бутират (14 мин), n-бутират (15 мин), n-валериат (18 мин 30 с), i-капронат (22 мин), n-капронат (26 мин).

## 2.6 Методы математического анализа результатов

Исходя из полученные площадей при хроматографическом анализе рассчитывали концентрацию монокарбоновых кислот в программе Microsoft Exel: уксусной (C2), пропионовой (C3), масляной (C4), изомаляной (iC4), валериановой (C5), капроновой (C6), изо-капроновой (iC6) кислот. Статистическую обработку полученных данных



проводили средствами пакета Statistica 10 (StatSoft, USA) с оценкой различий между средними величинами по t-критерию Стьюдента.

### **3 Результаты собственных исследований**

Поскольку недостаточно известны функции, механизмы действия и концентрация экзометаболитов известных пробиотических микроорганизмов нами была поставлена задача исследовать спектр жирных кислот в супернатантах пробиотических штаммов бактерий отечественной коллекции ГИСК им. Л.А. Тарасевича (*L. fermentum* 90T-C4, *B. longum* MC-42) и Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика» (*L. acidophilus* NK1, *L. acidophilus* КЗШ24 (№ В-3190), *B. bifidum* 791 (№ депонента АС-1247)), а также клинических штаммов бифидобактерий, изолированных от 15 пациентов при обследовании на дисбиоз толстого кишечника.

#### **3.1 Определение концентрации жирных кислот у клинических штаммов бифидобактерий при различных состояниях биотопа толстого кишечника человека**

На первом этапе исследований, было произведено разделение на четыре группы в зависимости от степени дисбиоза: I группа - пациенты с эубиозом кишечника, II группа - с 1 степенью дисбиоза кишечника, III группа - со 2 степенью дисбиоза и IIII группа - пациенты с 3 степенью дисбиоза кишечника.

Анализ данных, полученных в результате исследования видового состава бифидобактерий, показал присутствие основных четырех штаммов *B. Longum*, *B. bifidum*, *B. catenulatum*, *B. pseudolongum*.

При этом наблюдалось различие в лидирующих позициях при различных степенях биотопа. Так, например, у исследуемой группы с эубиозом и дисбиозом кишечника 1 и 2 степени в основном доминировали виды *B. longum* и *B. Bifidum*. При 3 степени дисбиоза, когда наблюдается активное снижение полезной бифидфлоры, начали преобладать *B. Catenulatum*.

Вычислялась средняя концентрация продуцируемых капроновых кислот у людей с эубиозом и заполнялась таблица 3.

Таблица 3 – Средняя концентрация жирных кислот у пациентов с эубиозом

Эубиоз								
№	Общий уровень жирных кислот	Уксусная кислота	Пропионо-вая кислота	Изо-мас-ляная кислота	Мас-ляная кисло-та	Вале-риано-вая кисло-та	Кап-роно-вая кисло-та	Изо-кап-роно-вая кисло-та

Продолжение таблицы 3 – Средняя концентрация жирных кислот у пациентов с эубиозом

1	19,20	18,80	0,20	0,06	0,05	0,02	0,02	0,05
2	19,31	18,81	0,25	0,06	0,06	0,02	0,04	0,07
3	19,35	18,89	0,24	0,06	0,05	0,03	0,03	0,05
4	19,30	18,85	0,21	0,07	0,07	0,02	0,02	0,06
5	19,34	18,89	0,23	0,06	0,05	0,04	0,02	0,05
6	19,32	18,83	0,22	0,08	0,07	0,03	0,03	0,06
Сред-нее значение, ммоль /л	19,3± 0,021	18,85 ± 0,016	0,23± 0,007	0,06± 0,003	0,06± 0,004	0,03± 0,003	0,03± 0,003	0,06± 0,003

Из полученных данных видно, что при эубиозе присутствует достаточное количество метаболитов пробиотических микроорганизмов в микросимбиозе толстого кишечника. Общий уровень жирных кислот составляет (19,3 ± 0,021) ммоль/л, из которых (18,85 ± 0,016)

ммоль/л представлены уксусной кислотой, ( $0,23 \pm 0,007$ ) ммоль/л пропионовой, ( $0,06 \pm 0,004$ ) ммоль/л масляной, ( $0,06 \pm 0,003$ ) ммоль/л для изомаляной и изокапроновой кислот, и ( $0,03 \pm 0,003$ ) ммоль/л для валериановой и капроновой, что находится в пределах нормы для эубиотического состояния.

Результаты концентрации жирных кислот при дисбиозе 1 степени отображены в таблице 4.

Таблица 4 – Концентрация жирных кислот при дисбиозе 1 степени

1 степень дисбиоза								
№	Общий уровень жирных кислот	Уксусная кислота	Пропионовая кислота	Изомасляная кислота	Масляная кислота	Валериановая кислота	Капроновая кислота	Изокапроновая кислота
1	20,87	20,35	0,28	0,06	0,04	0,03	0,05	0,06
2	20,89	20,39	0,29	0,05	0,05	0,02	0,04	0,05
3	20,85	20,36	0,27	0,05	0,05	0,01	0,06	0,05
4	20,88	20,37	0,29	0,06	0,04	0,03	0,05	0,04
5	20,88	20,34	0,31	0,05	0,06	0,03	0,04	0,05
6	20,84	20,33	0,31	0,04	0,04	0,04	0,03	0,05
Среднее значение, ммоль/л	20,87 ± 0,007	20,36 ± 0,009	0,29 ± 0,007	0,05 ± 0,003	0,05 ± 0,003	0,03 ± 0,004	0,05 ± 0,004	0,05 ± 0,003

Из таблицы 4 видно, что при дисбиозе 1 степени произошло незначительное увеличение общего уровня жирных кислот – ( $20,87 \pm 0,007$ ) ммоль/л.

В частности, увеличилась концентрация уксусной ( $20,36 \pm 0,009$ ) ммоль/л и пропионовой ( $0,29 \pm 0,007$ ) ммоль/л жирных кислот, что показывает защитную функцию ацетата и пропионата по отношению к росту числа патогенной микрофлоры. Остальные метаболиты остались в примерно той же концентрации, что и при эубиозе.

Таблица 5 – Концентрация жирных кислот при дисбиозе 2 степени

2 степень								
№	Общий уровень	Уксусная кислота	Пропионовая кислот	Изомасляная кислот	Масляная кислот а	Валериановая кислот	Капроновая кислот	Изокапроновая кислот

	жир- ных кисло т		а	а		а	а	а
1	7,10	6,68	0,15	0,05	0,05	0,03	0,12	0,02
2	7,08	6,72	0,09	0,04	0,05	0,03	0,14	0,01
3	7,11	6,76	0,11	0,04	0,04	0,02	0,13	0,01
4	7,11	6,77	0,07	0,06	0,04	0,03	0,12	0,02
5	7,20	6,73	0,17	0,07	0,02	0,04	0,14	0,03
6	7,00	6,71	0,06	0,04	0,03	0,03	0,11	0,02
Сред- нее значе- ние, ммол ь/л	7,10± 0,025	6,73± 0,014	0,11± 0,017	0,05± 0,005	0,04± 0,005	0,03± 0,003	0,13± 0,005	0,02± 0,003

При 2 степени дисбиоза показатель общей концентрации жирных кислот резко сократился -  $(7,10 \pm 0,025)$  ммоль/л, что говорит о снижении количества полезной микрофлоры и уменьшению продукции их основных метаболитов. Наблюдается резкое снижение уксусной и пропионовой жирных кислот, а соответственно и защитной их функции.

В таблице 6 представлены данные о метаболическом состоянии при дисбиозе 3 степени.

Таблица 6 - Концентрация жирных кислот при дисбиозе 3 степени

3 степень								
№	Об- щий уро- вень жир- ных кисло т	Уксус- ная кисло- та	Про- пионо- вая кисло та	Изо- мас- ляная кис- лота	Мас- ляная кисло- та	Вале- риано- вая кисло- та	Кап- роно- вая кисло- та	Изо- капро- новая кис- лота
1	4,52	4,15	0,08	0,05	0,03	0,02	0,14	0,05

2	4,47	4,16	0,07	0,04	0,02	0,03	0,12	0,03
3	4,56	4,18	0,08	0,05	0,03	0,04	0,14	0,04
4	4,53	4,18	0,05	0,04	0,04	0,03	0,14	0,05
5	4,50	4,21	0,06	0,03	0,03	0,02	0,12	0,03
6	4,50	4,14	0,07	0,03	0,04	0,04	0,13	0,05
Сред- нее знач е- ние, ммол ь/л	4,51±	4,17±	0,07±	0,04±	0,03±	0,03±	0,13±	0,04±
	0,012	0,010	0,005	0,004	0,003	0,004	0,004	0,004

По полученным данным видно, что резкое сокращение полезной микрофлоры при дисбиозе 3 степени, хорошо видно по количественному составу жирных кислот в толстом кишечнике человека.

Из-за преобладания аэробов над анаэробами, увеличению числа патогенной микрофлоры и уменьшению полезной, наблюдается продолжение снижения концентрации метаболитов и угнетение их защитных функций.

### **3.2 Сравнительный анализ концентрации жирных кислот при различных степенях дисбиоза**

На втором этапе был проведен сравнительный анализ концентрации жирных кислот при различных степенях дисбиоза. Полученные данные позволили построить сравнительную таблицу для отслеживания изменений количественного состава той или иной жирной кислоты при эубиозе и увеличивающейся степени дисбиоза (таблица 7). В качестве контроля выступает группа с эубиозом.

Таблица 7 – Сравнительный анализ концентрации жирных кислот при различных степенях дисбиоза

Наименование показателя	Эубиоз, ммоль/л	1 степень дисбиоза, ммоль/л	2 степень дисбиоза, ммоль/л	3 степень дисбиоза, ммоль/л
-------------------------	-----------------	-----------------------------	-----------------------------	-----------------------------

Уксусная кислота, ммоль/л	18,85±0,0 16	20,36±0,009 ***	6,73±0,014* **	4,17±0,010** *
Пропионовая кислота, ммоль/л	0,23±0,00 7	0,29±0,007	0,11±0,017* *	0,07±0,005** *
Масляная кислота, ммоль/л	0,06±0,00 4	0,05±0,003*	0,04±0,005	0,03±0,003*
Изомасляная кислота, ммоль/л	0,06±0,00 3	0,05±0,003	0,05±0,005*	0,04±0,004*
Валериановая кислота, ммоль/л	0,03±0,00 3	0,03±0,004	0,03±0,003	0,03±0,004
Изокапроновая кислота, ммоль/л	0,06±0,00 3	0,05±0,003	0,02±0,003* **	0,04±0,004
Капроновая кислота, ммоль/л	0,03±0,00 3	0,05±0,004	0,13±0,005* **	0,13±0,004** *
Общий уровень жирных кислот, ммоль/л	19,3±0,02 1	20,87±0,007 ***	7,10±0,025* **	4,51±0,012** *

Примечание - \*достоверное отличие с группой контроля:  $p < 0,05$  - \*;  $p < 0,01$  - \*\*;  $p < 0,001$  - \*\*\*.

Сравнительный анализ концентраций метаболитов пробиотических микроорганизмов, выделенных из супернатантов бифидобактерий при различных состояниях биотопа толстого кишечника человека, показал достоверное снижение уксусной и пропионовой карбоновых кислот при увеличении степени дисбиоза. Концентрации масляной и изомасляной жирных кислот в метаболитах дисбиотических культур по сравнению с эубиотическими не изменялись. Это может говорить о основной роли данных кислот в обеспечении колонизационной резистентности.

При умеренных нарушениях микробиоценоза, как в 1 степени дисбиоза, не выявлено существенных различий в концентрациях метаболитов пробиотических микроорганизмов. Достоверное увеличение концентрации уксусной кислоты говорит о способности бифидобактерий за счет продукции ацетата к закислению среды и увеличению антагонистической активности по отношению к патогенным микроорганизмам.

Анализ позволил установить изменения метаболической активности бифидофлоры при дисбиозе 3 степени, которая характеризуется снижением количества нормофлоры и соответственно снижением продукции уксусной и масляной кислот, что снижает их антимикробный и антиканцерогенный эффект. Однако, при 2 и 3 степени дисбиоза, достоверно

увеличилась продукция капроновой кислоты. Такое увеличение связано с основной функцией данной карбоновой кислоты – кровоостанавливающей – в связи с возможным возникновением на данных стадиях воспалительных или язвенных процессах в просвете кишечника.

### 3.3 Определение количественного состава жирных кислот метаболитов пробиотических микроорганизмов

Исследование проводилось методом газо-жидкостной хроматографии. Были получены хроматограммы спектров жирных кислот, присутствующих в супернатанте пробиотических микроорганизмов штаммов *B. bifidum* 791, *L. fermentum* 90mc4-2, *L. fermentum* КЗш24, *B. longum* МС-42, *L. acidophilus* НК<sub>1</sub>.

На основе полученных данных, по площади были вычислены концентрации жирных кислот. Данные по штамму *B. bifidum* 791 занесены в таблицу 8.

Таблица 8 – Результаты хроматографии штамма *B. bifidum* 791

Название	Площадь	Концентрация жирных кислот, ммоль/л	Среднее значение концентрации жирных кислот, ммоль/л
Уксусная кислота	548763	14,51	14,52±0,017
	550365	14,55	
	546956	14,49	
Пропионовая кислота	20366	0,29	0,31±0,012
	22844	0,32	
	23463	0,33	
Масляная кислота	11100	0,11	0,12±0,012
	13534	0,13	
	12178	0,12	
Изомасляная кислота	5513	0,05	0,05±0,009
	6356	0,06	
	3432	0,03	
Валериановая кислота	1958	0,01	0,01±0,004
	2456	0,02	
	1022	0,006	
Капроновая кислота	3127	0,01	0,02±0,005
	4630	0,02	

	2178	0,01	
Изокапроновая кислота	28293	0,14	0,14±0,009
	26345	0,13	
	29933	0,15	

При анализе состава короткоцепочечных жирных кислот штамма *B. bifidum* 791 были выделены все 7 карбоновых кислот. В наибольшем количестве присутствует уксусная кислота 95,7 % от общего количества, содержание пропионовой, масляной и изокапроновой карбоновых кислот находится в пределах от 1 % до 2 %. Обнаружены наиболее малые концентрации изомасляной валериановой и капроновой кислот, содержание которых менее 1 %.

Хроматографические данные по исследованию супернатанта штамма *L. fermentum* 90mc4-2 представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты хроматографии штамма *L. fermentum* 90mc4-2

Название	Площадь	Концентрация жирных кислот, ммоль/л	Среднее значение концентрации жирных кислот, ммоль/л
Уксусная кислота	2033585	53,78	53,82±0,021
	2036184	53,85	
	2035766	53,84	
Пропионовая кислота	32012	0,46	0,47±0,010
	34376	0,49	
	31988	0,46	
Масляная кислота	13186	0,13	0,13±0,005
	14246	0,14	
	11997	0,12	
Изомасляная кислота	10844	0,10	0,10±0,003
	11224	0,10	
	9577	0,09	
Валериановая кислота	2331	0,01	0,01±0,003
	2867	0,02	
	1797	0,01	
Капроновая кислота	10117	0,05	0,06±0,003
	11328	0,06	
	12715	0,06	
Изокапроновая кислота	38420	0,20	0,20±0,002
	39738	0,20	
	37247	0,19	



Проведенное исследование супернатанта штамма *L. fermentum 90mc4-2* показало, что в наибольшем количестве присутствует уксусная карбоновая кислота – 98,2 %, пропионовая и изокапроновая кислоты содержатся от 0,3 % до 1 % от общего количества.

В меньшем количестве у данного штамма, менее 0,3 %, обнаружены изомасляная ( $0,10 \pm 0,003$ ) ммоль/л жирные кислоты, валериановая жирная кислота у данного штамма практически отсутствует и имеет наименьшую концентрацию – ( $0,01 \pm 0,003$ ) ммоль/л.

Результаты хроматографии штамма *L. fermentum K3ш24* представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Результаты хроматографии штамма *L. fermentum K3ш24*

Название	Площадь	Концентрация жирных кислот, ммоль/л	Среднее значение концентрации жирных кислот, ммоль/л
Уксусная кислота	1935681	51,19	51,21±0,015
	1937746	51,24	
	1936133	51,20	
Пропионовая кислота	23192	0,33	0,33±0,014
	25252	0,36	
	21543	0,31	
Масляная кислота	7721	0,08	0,09±0,006
	9042	0,10	
	7518	0,08	
Изомасляная кислота	4648	0,04	0,05±0,005
	6244	0,06	
	5303	0,05	
Валериановая кислота	0	0,00	0,00±0,000
	0	0,00	
	0	0,00	
Капроновая кислота	3541	0,02	0,02±0,003
	5069	0,03	
	2989	0,02	
Изокапроновая кислота	18919	0,096	0,10±0,004
	22141	0,113	
	20014	0,102	

Хроматографические исследования супернатанта штамма *L. fermentum K3ш24* показали, что в нем также в наибольшей

концентрации присутствует уксусная кислота 98,9 % от общего пула.

Второй по содержанию является пропионовая с содержанием более 0,5 %, остальные 5 карбоновые кислоты: изомасляная, масляная, изокапроновая, капроновая, - обнаружены в малом количестве, менее 0,2 % от общего количества. Валериановая кислота обнаружена не была.

В таблице 11 представлены хроматографические данные штамма *B. longum* MC-42.

Таблица 11 - Результаты хроматографии штамма *B. longum* MC-42

Название	Площадь	Концентрация жирных кислот, ммоль/л	Среднее значение концентрации жирных кислот, ммоль/л
Уксусная кислота	1223064	32,34	32,36±0,021
	1225154	32,40	
	1222531	32,33	
Пропионовая кислота	9122	0,13	0,15±0,009
	10456	0,15	
	11432	0,16	
Масляная кислота	6129	0,06	0,07±0,003
	7304	0,07	
	6951	0,07	
Изомасляная кислота	2512	0,02	0,03±0,006
	3898	0,04	
	3032	0,03	
Валериановая кислота	1332	0,01	0,01±0,000
	2357	0,01	
	1733	0,01	

Полученные данные при анализе состава короткоцепочечных жирных кислот супернатанта штамма *B. longum* MC-42 показали присутствие в большем количестве уксусной кислоты 99 % (32,36±0,021) ммоль/л, а также присутствие пропионовой кислоты 0,5 %, (0,15±0,009) ммоль/л от общего пула. Все остальные карбоновые кислоты, такие как масляная (0,07±0,003) ммоль/л, изомасляная (0,03±0,006) ммоль/л, валериановая (0,01±0,000) ммоль/л имеют минимальное содержание менее 0,2 %. Капроновая и изокапроновая кислоты обнаружены не были.

Заключительным исследуемым штаммом был *L. acidophilus NK<sub>1</sub>*, хроматографические данные которого представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Результаты хроматографии штамма *L. acidophilus NK<sub>1</sub>*

Название	Время удержания, с	Площадь	Концентрация жирных кислот, ммоль/л	Среднее значение концентрации и жирных кислот, ммоль/л (М)
Уксусная кислота	11,584	2436271	64,42	64,48±0,030
		2440269	64,53	
		2438672	64,49	

Продолжение таблицы 12 - Результаты хроматографии штамма *L. acidophilus NK<sub>1</sub>*

Пропионовая кислота	13,183	18581	0,26	0,27±0,007
		20381	0,29	
		18944	0,27	
Изомасляная кислота	13,751	6111	0,05	0,06±0,003
		5966	0,05	
		7004	0,06	
Масляная кислота	15,251	12816	0,13	0,14±0,004
		14217	0,14	
		13519	0,13	
Валериановая кислота	18,639	1191	0,008	0,01±0,001
		965	0,006	
		1602	0,010	
Капроновая кислота	22,196	4261	0,022	0,02±0,002
		5258	0,027	
		3901	0,019	

Полученные данные анализа супернатанта штамма *L. acidophilus NK<sub>1</sub>* показали значительное количество уксусной карбоновой кислоты (64,48±0,030) ммоль/л, что составляет 99 % от общего количества, концентрация остальных жирных кислот минимальна - менее 0,5 %. Изокапроновая кислота не обнаружена.

### 3.4 Сравнительный анализ концентраций жирных кислот в супернатантах пробиотических микроорганизмов

По результатам определения концентрации жирных кислот в различных штаммах пробиотических микроорганизмов, используемых для создания лекарственных препаратов – метабиотиков, нами был проведен сравнительный анализ количественного состава каждой карбоновой кислоты.

На рисунке 25 представлен сравнительный график концентрации уксусной кислоты в супернатантах пяти представленных штаммов микроорганизмов.

Сравнительный анализ показал, что наиболее высокая концентрация уксусной кислоты обнаружена в супернатанте штамма *L. acidophilus* NK<sub>1</sub> и составила (64,48±0,030) ммоль/л, наименьшая концентрация у штамма *B. bifidum* 791 – (14,52±0,017) ммоль/л (рисунок 25).

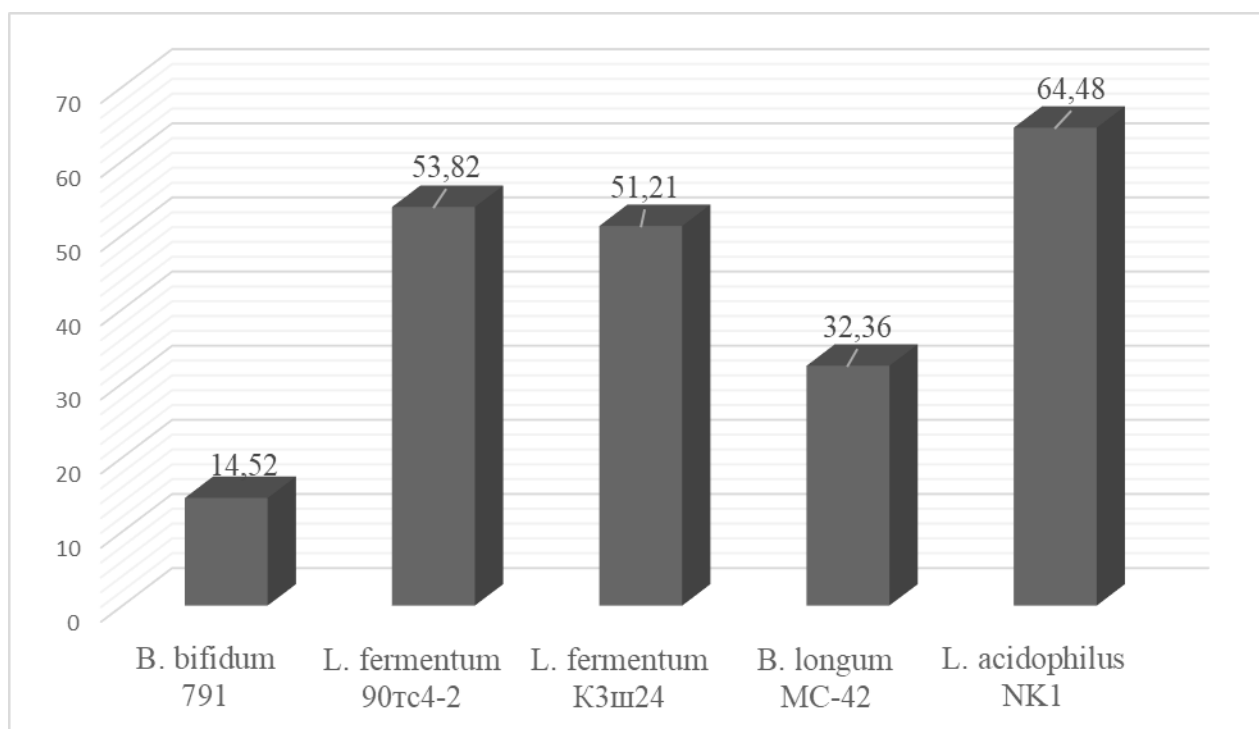


Рисунок 25 – Сравнительная характеристика концентраций уксусной кислоты в супернатантах пробиотических микроорганизмов

Сравнительный анализ пропионовой кислоты показал наибольшую концентрацию у штамма *L. fermentum* 90mc4-2 –

( $0,47 \pm 0,010$ ) ммоль/л, наименьшую у *B. longum* MC-42 – ( $0,15 \pm 0,009$ ) ммоль/л (рисунок 26).

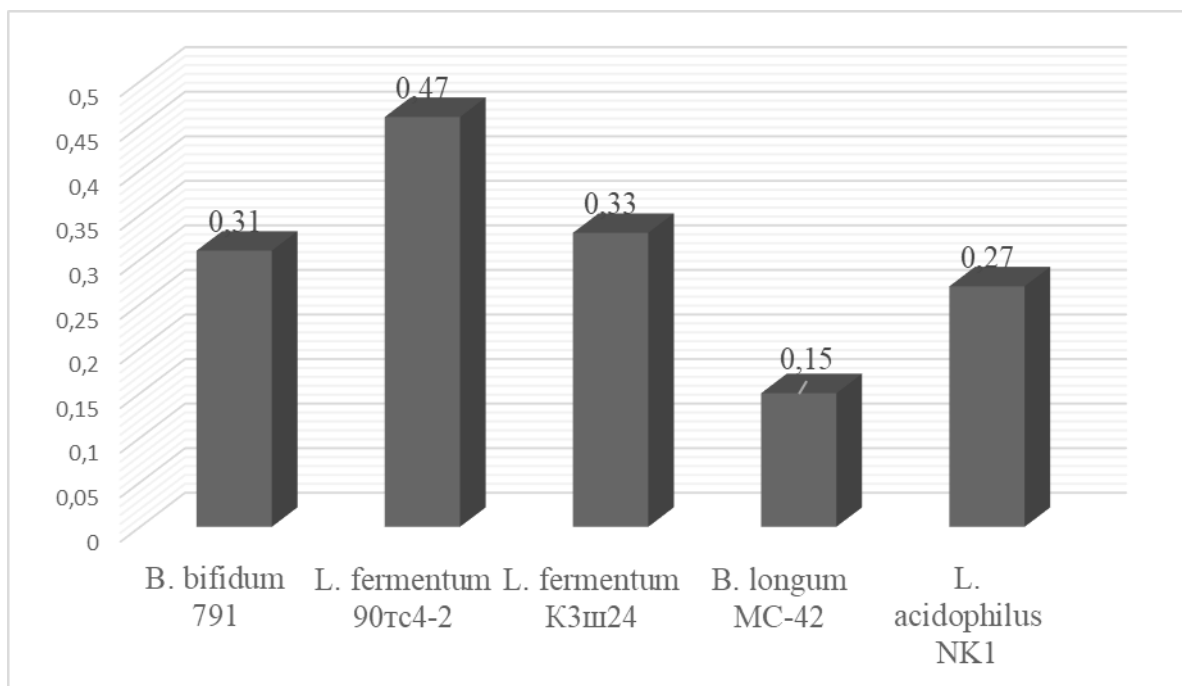


Рисунок 26 – Сравнительная характеристика концентраций пропионовой кислоты в супернатантах пробиотических микроорганизмов

Уровень изомазляной кислоты оказался низким у всех анализируемых штаммов и сильно не отличался друг от друга (рисунок 27).

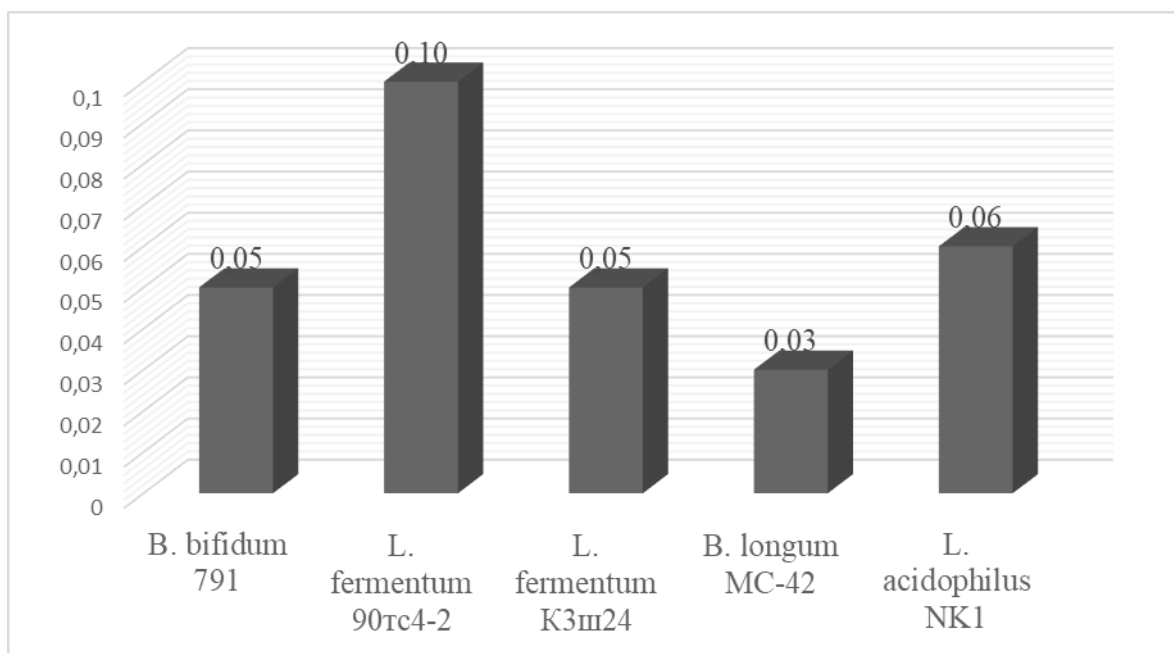


Рисунок 27 – Сравнительная характеристика концентраций изомаасляной кислоты в супернатантах пробиотических микроорганизмов

Концентрация масляной карбоновой кислоты (рисунок 28) была примерно одинакова у всех исследуемых штаммов от 0,07 до 0,14 ммоль/л, наименьшая у штаммов *B. longum* MC-42 ( $0,07 \pm 0,003$ ) ммоль/л и *L. fermentum* КЗш24 ( $0,09 \pm 0,006$ ) ммоль/л, наибольшая у штамма *L. acidophilus* NK<sub>1</sub> ( $0,14 \pm 0,004$ ) ммоль/л.

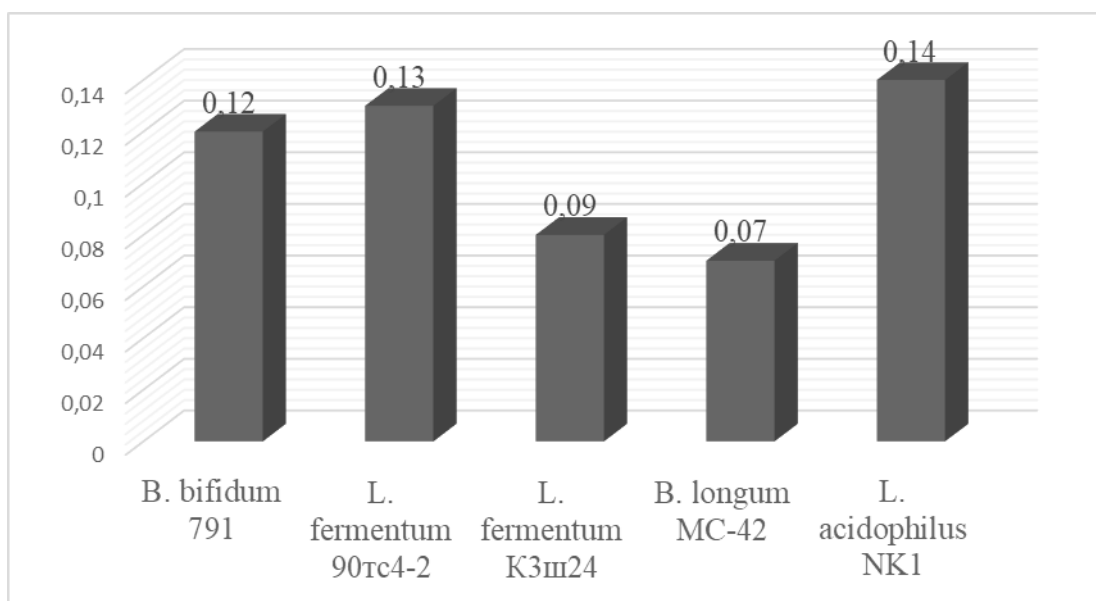


Рисунок 28 – Сравнительная характеристика концентраций масляной кислоты в супернатантах пробиотических микроорганизмов

Обнаруживаются незначительные следы валериановой жирной кислоты у всех штаммов в пределах 0,01 ммоль/л (рисунок 29).

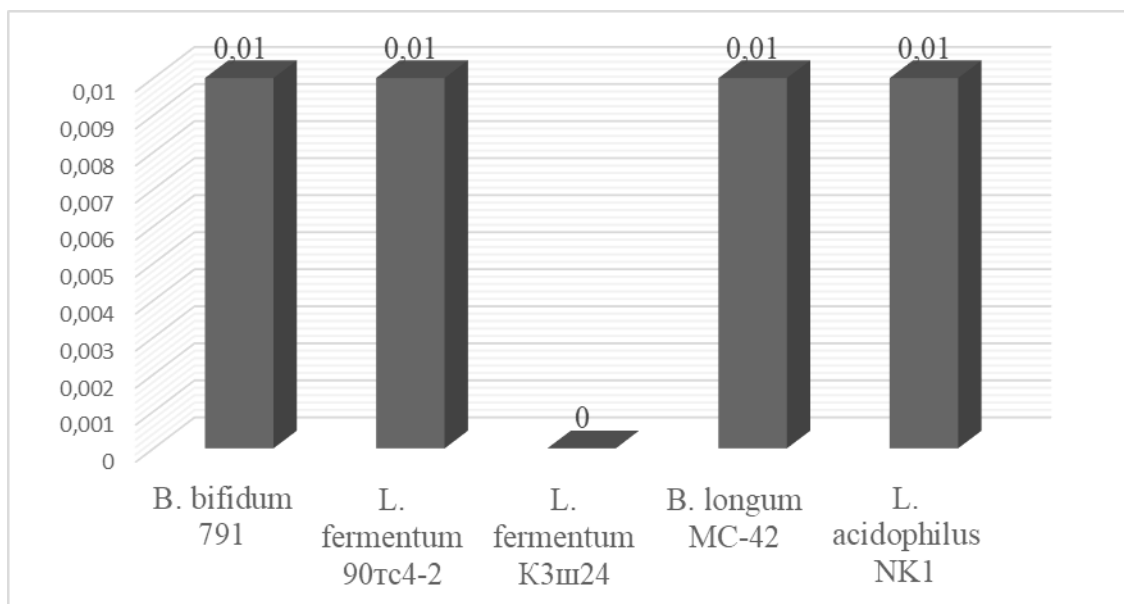


Рисунок 29 – Сравнительная характеристика концентраций валериановой кислоты в супернатантах пробиотических микроорганизмов

Концентрация капроновой кислоты (рисунок 30) наиболее высокая у штамма *L. fermentum 90тс4-2* ( $0,06 \pm 0,003$ ) ммоль/л. У остальных штаммов находится в равном соотношении 0,02 ммоль/л, у штамма *B. longum MC-42* данная карбоновая кислота не обнаружена.

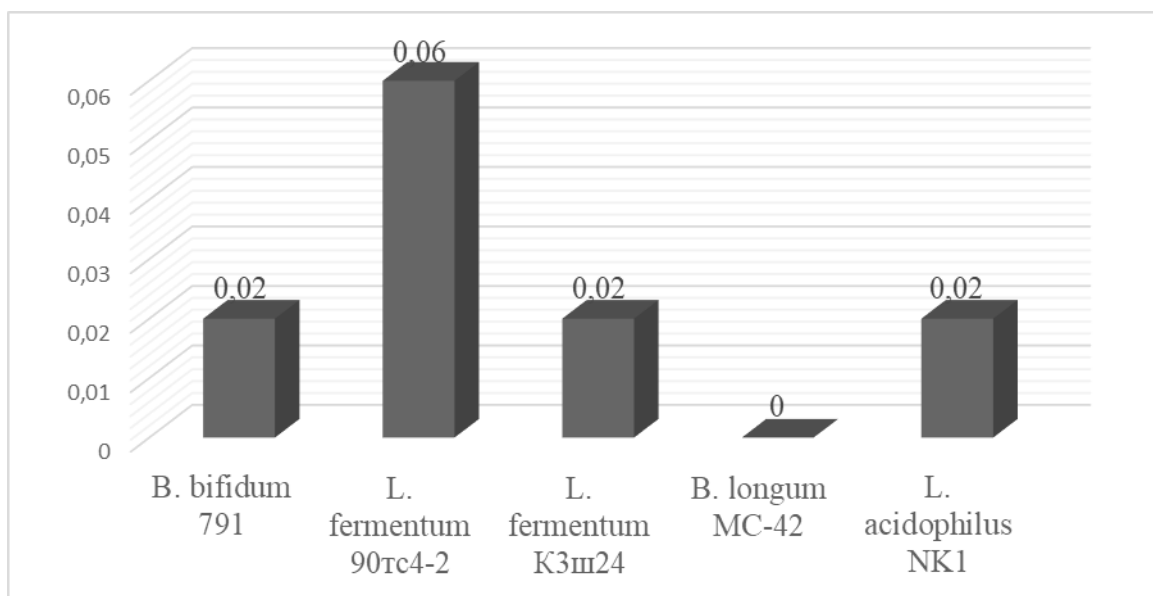


Рисунок 30 – Сравнительная характеристика концентраций капроновой кислоты в супернатантах пробиотических микроорганизмов

Наибольшая концентрация изокапроновой кислоты обнаружена у штамма *L.fermentum 90тс4-2* и составляет  $(0,20\pm0,002)$  ммоль/л, наименьшая в супернатанте штамма *L.fermentum КЗш24* -  $(0,10\pm0,004)$  ммоль/л, у штаммов *B. longum МС-42* и *L. acidophilus NK<sub>1</sub>* изокапроновая кислота не обнаружена (рисунок 31).

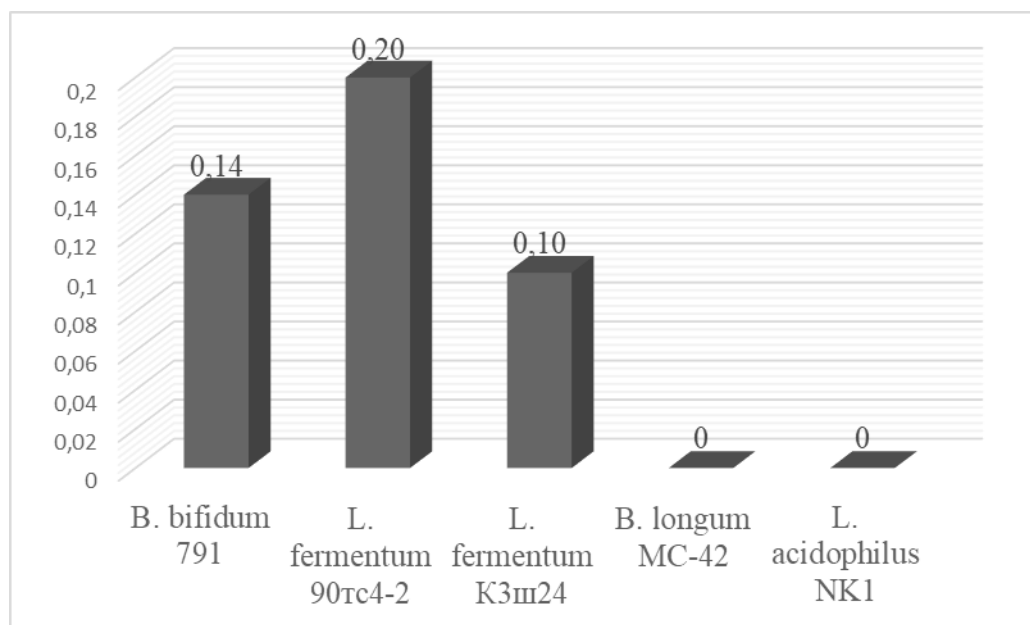


Рисунок 31 – Сравнительная характеристика концентраций изокапроновой кислоты в супернатантах пробиотических микроорганизмов

Таким образом, сравнительная оценка спектра жирных кислот метаболитов пробиотических микроорганизмов позволяет составить метаболический паспорт бифидо- и лактобактерий, используемых для производства лекарственных препаратов – метабитиков, а также позволяет расширить возможности использования метаболитов штаммов микроорганизмов для отбора более эффективных препаратов для стабилизации микробного баланса кишечной микробиоты человека.



## Заключение

Короткоцепочечные жирные кислоты представлены семью основными карбоновыми кислотами – уксусной, пропионовой, масляной, изомасляной, валериановой, капроновой и изокапроновой, – которые оказывают антагонистическую активность в отношении патогенных микроорганизмов, обеспечивая нормальное функционирование толстого кишечника человека. Из-за своих маленьких размеров они быстро всасываются в кровь, и, являясь главным источником энергии для слизистой толстой кишки, способны стимулировать пролиферацию и дифференцировку ее клеток, предохраняя от дистрофических изменений.

Чем ниже содержание летучих жирных кислот, тем глубже нарушения микробиоценоза кишечника человека. Такое резкое сокращение полезной микрофлоры и увеличение числа патогенной или условно-патогенной микробиоты приводит к снижению концентрации метаболитов и угнетению их защитных антагонистических и антиканцерогенных свойств. При таких состояниях возможно развитие воспалительных или язвенных процессов.

В работе установлено, что функциональная активность бифидобактерий толстого кишечника человека, играет важную роль в обеспечении колонизационной резистентности биотопа, напрямую связана с уровнем короткоцепочечных жирных кислот, и изменяется в зависимости от микрoэкологических нарушений при дисбиозе различной степени, что требует использование про-, сим- и метабиотиков с выраженной ацетат-продукцией для поддержания гомеостаза.

Исследуемые пробиотические микроорганизмы, характеризуются своей повышенной ацетат-продукцией, что позволяет отобрать из них наиболее перспективные для создания эффективных препаратов для стабилизации микробного баланса.

## Выводы

1 Сравнительный анализ спектра карбоновых кислот в супернатантах бифидобактерий при эубиозе и дисбиозе толстого кишечника человека показал, что метаболическая активность бифидофлоры изменяется в зависимости от микрoэкологического состояния толстого кишечника человека. У штаммов, изолированных при дисбиозе отмечается снижение уровня уксусной и пропионовой карбоновых кислот до 4,17 ммоль/л и 0,07 ммоль/л, соответственно.

2 Сравнительный анализ карбоновых кислот эталонных штаммов показал наиболее высокий уровень уксусной кислоты у штаммов *L. acidophilus* NK1 (64,48 ммоль/л), *L. fermentum* 90mc42 (53,82 ммоль/л) и *L. fermentum* K3ш24 (51,21 ммоль/л), поэтому данные штаммы можно рассматривать как перспективные культуры при создании эффективных бактериальных препаратов (про-, сим- и метабиотиков), восполняющих пул короткоцепочечных жирных кислот в просвете толстого кишечника человека.

3 Комплексная оценка спектра жирных кислот метаболитов пробиотических микроорганизмов позволяет составить метаболический паспорт бифидо- и лактобактерий, для отбора эффективных пробиотиков, а также конструирования новых современных препаратов – метабиотиков, – для стабилизации микробного баланса кишечной микробиоты человека.

## Список использованных источников

- 1 Ардатская, М.Д. Клиническое применение пищевых волокон: метод. пособие / М. Д. Ардатская. – М.: 4ТЕ Арт, 2010. – 48 с.
- 2 Ардатская, М.Д. Синдром избыточного бактериального роста: учебное пособие / М.А. Ардатская. – М.: Форте принт, 2011. – 56 с.
- 3 Березов, Т.Т. Биологическая химия: учебник / Т.Т. Березов, Б.Ф. Коровкин. – М.: Медицина, 2006. – 704 с.
- 4 Бифидосодержащие пробиотики: ОФС.1.7.1.0003.15: Общая фармакопейная статья. – М., 2015. – 12 с.
- 5 Бондаренко, В.М. Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микробиологических нарушениях / В.М. Бондаренко // Consilium Medicum. – 2005. – №7. – С. 437-443.
- 6 Василенко, Ю.К. Биологическая химия: учебное пособие / Ю.К. Василенко. – М.: МЕДпресс-информ, 2011. – 432 с.
- 7 Ворслов, Л.О. Омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты как источник долголетия / Л.О. Ворслов // Вопросы диетологии. – 2017. – №7. – С. 36-41.
- 8 Грачева, Н.М. Хилак форте в комплексном лечении больных острыми кишечными инфекциями и хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта с явлениями дисбактериоза / Н.М. Грачева, Н.И. Леонтьева, И.Т. Щербаков // Consilium Medicum. – 2004. – №1. – С. 31-34.
- 9 Дармов, И.В. Выживаемость микроорганизмов пробиотиков в условиях *in vitro*, имитирующих процесс

пищеварения у человека / И.В. Дармов, И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский // Кишечная микробиота. – 2013. – №2. – С. 4-15.

10 Ерофеев, Н. П. Клиническая физиология толстой кишки. Механизмы действия короткоцепочечных жирных кислот в норме и при патологии / Н.П. Ерофеев, В.Г. Радченко, П.В. Селиверстов. – СПб: Форте Принт, 2012. – 56 с.

11 Зайцева, Л.В. Баланс полиненасыщенных жирных кислот в питании / Л.В. Зайцева, А.П. Нечаев // Питание и здоровье. – 2014. – №11. – С. 56-59.

12 Захарова, Ю.В. Роль бифидобактерий в кишечном микробиоценозе вич-инфицированных детей: дис.доктора мед. наук: 03.02.03 : защищена 12.03.19 : утв. 13.03.20 / Ю.В. Захарова; ФГБОУ ВО КемГМУ Минздрава России. – Кемерово, 2019. – 238 с.

13 Захарова, Ю.В. Хроматографический анализ жирных кислот клеточных стенок бифидобактерий с различной гидрофобностью / Ю.В. Захарова, А.С. Сухих // Сорбционные хроматографические процессы. – 2015. – № 6. – С. 776-783.

14 Иванова, Е.В. Роль бифидофлоры в ассоциативном симбиозе кишечной микробиоты человека: дис. доктора мед. наук: 03.02.03 : защищена 31.05.18 : утв. 26.09.18 / Е.В. Иванова; Юж.-Ур. Гос. мед. ун-т. – Челябинск, 2018. – 295 с.

15 Каратеев, А.Е. Эйкозаноиды и воспаление / А.Е. Каратеев, Т.Л. Алейникова // Современная ревматология. – 2016. – №4. – С. 73-86.

16 Кириченко, К.А. Жирнокислотный состав общих липидов высших водных растений из реки ангары / К.А. Кириченко, Т.П. Побежимова, Н.А. Соколова и др. // Химия растительного сырья. – 2011. – № 2. – С. 97-102.

17 Комов, В.П. Биохимия: учеб. для вузов / В. П. Комов, В.Н. Шведов. – М.: Дрофа, 2006. – 638 с.

18 Корниенко, Е.А. Метаболическое действие микробиоты и метабиотики / Е.А. Корниенко // РМЖ. –2016. – №18. – С. 1196-1201.

19 Кукина, Т.П. «Липофильные компоненты мытников *Pedicularis striata pallas* и *Pedicularis flava pallas*» / Т.П. Кукина, И.В. Хан // Химия растительного сырья. – 2019. – № 4. – С. 113-118.

20 Лактосодержащие пробиотики: ОФС.1.7.1.0006.15: Общая фармакопейная статья. – М., 2015. – 10 с.

21 Лиминова, О.А. Лекция для врачей: Клиническая фармакология препаратов, применяемых для лечения дисбактериоза кишечника / О.А. Лиминова, Л.Э. Федотова, А.В.

Садин. – Иваново, Ивановская Государственная Медицинская Академия, 2007. – 15 с.

22 Мазанкова, Л. Н. Оценка нарушений микробиоценоза при острых кишечных инфекциях у детей и их коррекция / Л.Н. Мазанкова, Н.И. Ильина, О.А. Кондракова // Трудный пациент. – 2004. – № 9. – С. 11-16.

23 Малкоч, А.В. Кишечная микрофлора и значение пробиотиков для ее функционирования / А.В. Малкоч, С.В. Бельмер // Лечащий врач. – 2006. – № 4. – С. 60-66.

24 Медицинская микробиология, вирусология и иммунология; Учебник для студентов медицинских вузов / Под ред. А. А. Воробьева. — 2-е изд., испр. и доп.— М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2012. – 704 с.

25 Метабиотики как естественное развитие пробиотической концепции / М.Д. Ардатская [и др.] // Трудный пациент. – 2017. – № 6. – С. 35-39.

26 МУ № 4.1.2773-10. Методические указания по контролю химических факторов. Определение массовых концентраций летучих жирных кислот (уксусная, пропионовая, изомазляная, мазляная, валериановая, изокапроновая, капроновая) в биосредах (кровь) газохроматографическим методом. – М.: Роспотребнадзор, 2010.

27 Павленко, В.В. Пробиотики и воспалительные заболевания кишечника: оценка эффективности пробиотического комплекса «Бактистатин» в терапии больных язвенным колитом / В.В. Павленко, Г.А. Катаганова, С.Б. Александрова // Современные проблемы науки и образования.– 2015. – №5. – С. 75-77.

28 Пат. 2145511 Российская Федерация, МКИ В 01 D 15/08. Способ разделения смеси жирных кислот фракции с2-с7 методом газожидкостной хроматографии / Н. С. Иконников [и др.]; НИФ "УЛЬТРАСАН". - № 9106669/12; Заявл. 09.04.1999; опубл. 20.02.2000, Бюл. № 11. – 8 с.

29 Плотникова, Е.Ю. Метабиотики — комплексное решение дисбиотических проблем при различных заболеваниях / Е.Ю. Плотникова, Т.Ю. Грачева // РМЖ. – 2018. – №5. – С. 72-76.

30 Северин, Е.С. Биохимия / Е.С. Северин. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. – 784 с.

31 Селиверстов, П.В. Роль дисбиоза кишечника в развитии митохондриальной дисфункции и неалкогольной жировой болезни печени / П.В. Селиверстов, С.И. Ситкин, В.Г. Радченко // Медицинский совет. – 2018. – №6. – С. 89-95.

32 Тюренок, И.Н. Роль микрофлоры кишечника, состава пищи, gpr41- и gpr43-рецепторов к короткоцепочечным жирным кислотам в энергетическом обмене позвоночных животных / И. Н. Тюренок, Д. В. Куркин, Е. В. Волотова // Успехи физиологических наук. - 2017. - № 2. - С. 100-112.

33 Чиркин, А.А. Биохимия / А.А. Чиркин, Е.О. Даниченко. - М.: Медицинская литература, 2010. - 605 с.

34 Шендеров, Б. А. Микробная экология человека и ее роль в поддержании здоровья / Б.А. Шендеров // Метаморфозы. - 2014. - № 5. - С. 72-80.

35 Bent, S. Valerian for sleep: a systematic review and meta-analysis/ S. Bent, A. Padula, D. Moore, et al. // Am J Med. - 2006. - Vol.19, №12. - P. 1005-1012.

36 Berbert, A.A. Supplementation of fish oil and olive oil in patients with rheumatoid arthritis / A.A. Berbert, C.R. Kondo, C.L. Almendra, et al. // Nutrition. - 2005. - Vol.21, №2. - P. 131-136.

37 Besten, G. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism / G.Besten, K. Eunen, A.K. Groen, et al. // J Lipid Res. - 2013. - Vol.54, №9. - P. 2325-2340.

38 Bezkorovainy, A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut / A. Bezkorovainy // Am J Clin Nutr. - 2001. - Vol. 73, №2. - P. 399-405.

39 Blakeney, B.A. Branched Short-Chain Fatty Acid Isovaleric Acid Causes Colonic Smooth Muscle Relaxation via cAMP/PKA Pathway / Blakeney, M.S. Crowe, S. Mahavadi, et al. // Dig Dis Sci. - 2019. - Vol.64, №5. - P. 1171-1181.

40 Bondue, P. Genome of Bifidobacteria and Carbohydrate Metabolism / P. Bondue, V. Delcenserie // Korean J Food Sci Anim Resour. - 2015. - Vol. 35, № 1. - P. 1-9.

41 Costantini, L. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota / L. Costantini, R. Molinari, B. Farinon, et al. // Int J Mol Sci. - 2017. - Vol.18, №12. - P. 2645.

42 Covington, D.K. The G-protein-coupled receptor 40 family(GPR40-GPR43) and its role in nutrient sensing / D.K. Covington, C.A. Briscoe, A.J. Brown, et al. // Biochemical Society Transactions. -2006. - Vol.34, № 5. - P. 770-773.

43 DeGruttola, A.K. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models / A.K. DeGruttola, D. Low, A. Mizoguchi, et al. // Inflamm Bowel Dis. - 2016. - Vol.22, № 5. - P. 1137-1150.

44 Farina, A.C. Conjugated linoleic acid improves glucose utilization in the soleus muscle of rats fed linoleic acid-enriched

and linoleic acid-deprived diets / A.C. Farina, S. Hirabara, J. Sain, et al. // *Nutr Res.* – 2014. – Vol.34, №12. – P. 1092-1100.

45 Ghosh, S. Fish Oil Attenuates Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acid-Induced Dysbiosis and Infectious Colitis but Impairs LPS Dephosphorylation Activity Causing Sepsis / S. Ghosh, D. DeCoffe, K. Brown, et al. // *PLoS One.* – 2013. – Vol.8, №2. – P. 2-14.

46 Goncalves, N.B.  $\alpha$ -Linolenic acid prevents hepatic steatosis and improves glucose tolerance in mice fed a high-fat diet / N.B. Goncalves, R.F. Bannitz, B.R. Silva, et al. // *Clinics (Sao Paulo).* – 2018. – Vol.73, №2. – P. 332-336.

47 Granado-Serrano, A.B. Faecal bacterial and short-chain fatty acids signature in hypercholesterolemia / A.B. Granado-Serrano, M. Martín-Garí, V. Sánchez, et al. // *Sci Rep.* – 2019. – Vol.9, №1. – P. 17-72.

48 Hamer, H.M. Review article: the role of butyrate on colonic function / H.M. Hamer, D. Jonkers, K. Venema, et al. // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2008. – Vol.27, №2. – P.104-119.

49 Iebba, V. Eubiosis and dysbiosis: the two sides of the microbiota / V. Iebba, V. Totino, A. Gagliardi, et al. // *New Microbiol.* – 2016. – Vol.39, №1. – P. 1-12.

50 Jousimies-Somer, H. Wadsworth-KTL anaerobic bacteriology manual / H. Jousimies-Somer, P. Summanen, D. Citron, et al. – Washington, 2002.

51 Judkins, T.C. Probiotics, Nutrition, and the Small Intestine / T.C. Judkins, D. L. Archer, D. C. Kramer, et al. // *Current Gastroenterology Reports.* – 2020. – Vol.22, №2.

52 Lee, K.W. The role of omega-3 fatty acid in the secondary prevention of cardiovascular diseases / K.W. Lee, G. Lip // *Q.J. Med.* – 2003. – Vol.4, №5. – P. 612-619.

53 Lewkowicz, N. Naturally Occurring Nervonic Acid Ester Improves Myelin Synthesis by Human Oligodendrocytes / N. Lewkowicz, P. Piatek, M. Namiecinska, et al. // *Cells.* – 2019. – Vol.8, №8. – P. 786-803.

54 Li, M. Levels of short-chain fatty acids in enterobacteria-related metabolites in the feces of infants with cholestatic hepatopathy / M. Li, S.X. Liu, M.U. Wand, et al. // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* – 2019. – Vol.21, №7. – P. 676-679.

55 Lin, H.V. Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms / H.V. Lin, A. Frassetto, E.J. Kowalik Jr, et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol.7, №4. – P. 1-9.

56 Ma, W.W. Elaidic acid induces cell apoptosis through induction of ROS accumulation and endoplasmic reticulum stress

in SH-SY5Y cells / W.W. Ma, L. Zhao, L.H. Yuan, et al. // *Mol Med Rep.* - 2017. - Vol.16, №6. - P. 9337-9346.

57 Manzanilla, E.G. Effects of butyrate, avilamycin, and a plant extract combination on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs / E.G. Manzanilla, M. Nofrarias, M. Anguita, et al. // *J Anim Sci.* - 2006. - Vol.84, №10. - P.2743-2751.

58 McCann, J. C. Is docosahexaenoic acid, an  $\omega$ -3 longchain polyunsaturated fatty acid required for development of normal brain function? / J .C. McCann, B.N. Ames // *Am. J. Clin. Nutr.* - 2005. - Vol.82. - P. 281-295.

59 Mori, T.A. The independent effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular risk factors in humans / T.A. Mori, R.J. Woodman // *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* - 2006. - Vol.9, №2. - P. 95-104.

60 Musa-Veloso, K. Long-chain omega-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid dose-dependently reduce fasting serum triglycerides / K. Musa-Veloso, M.A. Binns, A.C. Kocenas, et al. // - 2010. - Vol.63, №3. - P. 155-167.

61 Ohmori, H. Elaidic Acid, a Trans-Fatty Acid, Enhances the Metastasis of Colorectal Cancer Cells / H. Ohmori, K. Fujii, Y. Kadochi, et al. // *Pathobiology.* -2017. - Vol.84, №3. - P. 144-151.

62 Piccinin, E. Role of Oleic Acid in the Gut-Liver Axis: From Diet to the Regulation of Its Synthesis via Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) / E. Piccinin, M. Cariello, S. De Santis, et al. // *Nutrients.* - 2019. - Vol.11, №10. - P. 111-132.

63 Pluznick, J.L. Gut microbiota in renal physiology: focus on short-chain fatty acids and their receptors / J.L. Pluznick // *Kidney Int.* -2016. - Vol.90, №6. - P. 1191-1198.

64 Rajaram, S. Health benefits of plant-derived  $\alpha$ -linolenic acid / S. Rajaram // *Am J Clin Nutr.* - 2014. - Vol.100, №1. - P. 443-448.

65 Ramsden, C.E. n-6 fatty acid-specific and mixed polyunsaturate dietary interventions have different effects on CHD risk: a meta-analysis of randomised controlled trials / C.E. Ramsden, J.R. Hibbeln, S.F. Majchrzak, et al. // *Br J Nutr.* - 2010. - Vol.104, №11. - P. 1586-1600.

66 Rayasam, G.V. Fatty acid receptors as new therapeutic targets for diabetes / G.V. Rayasam, V.K. Tulasi, J.A. Davis, et al. // *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* - 2007. - Vol.11, № 5. - P. 661-671.

67 Richard, C. Docosahexaenoic Acid / C. Richard, P.C. Calder // *Adv Nutr.* - 2016. - Vol.7, №6. - P. 1139-1141.



68 Sivaprakasam, S. Benefits of Short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis / S. Sivaprakasam, P.D. Prasad, N. Singh // Pharmacol. -2016. - Vol.164. - P. 144-151.

69 Usami, M. Gut microbiota and host metabolism in liver cirrhosis / M. Usami, M. Miyoshi, H. Yamashita // World J Gastroenterol. - 2015. - Vol. 21, № 41. - P. 11597-11608.

70 Wang, D.Q. Alpha-linolenic acid improves insulin sensitivity in obese patients / D.Q. Wang, X.L. Liu, Q.F. Rong, et al. // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. - 2013. - Vol.93, №2. - P. 132-134.

71 Wendlinger, C. Various concentrations of erucic acid in mustard oil and mustard / C. Wendlinger, S. Hammann, W. Vetter // Food Chem. - 2014. - Vol.153. - P. 393-397.

72 Wong, J.M. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids / J.M. Wong, R. de Souza, C.W. Kendall, et al // J Clin Gastroenterol. -2006. - Vol.40, №3. - P. 235-243.

73 Yasuda, S. Effect of erucic acid on the phospholipid molecular species compositions of the rat heart and liver / S. Yasuda, Y. Kitagawa, E. Sugimoto, et al. // J Biochem.- 2007. - Vol.87, №5. - P. 1511-1557.

74 Yatsunenko, T. Human gut microbiome viewed across age and geography / T. Yatsunenko, F.E. Rey, M.J. Manary, et al. // Nature. - 2012. - Vol. 486, №7402. - P. 222-227.

75 Yuille, S. Human gut bacteria as potent class I histone deacetylase inhibitors in vitro through production of butyric acid and valeric acid / S. Yuille, N. Reichardt, S. Panda, et al. // PLoS One. - 2018. - Vol.13, №7.