



Государственное учреждение
Научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии имени почетного академика Н.Ф.Гамалеи
(ГУ НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи РАМН)

123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Тел: 193-30-01

Факс: 193-61-83

№ _____
На № _____ от _____

<http://www.gamaleya.ru>

E-mail: main@gamaleya.ru

1570.g23@g23.relcom.ru

ОТЧЕТ

По теме НИР

- Создание композиции препарата-симбиотика на основе Рекицена-РД, содержащего набор короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) с различными штаммами лактобацилл.

Исследование проведено на базе лаборатории генетики вирулентности бактерий НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи РАМН (Москва).

Цель НИР - изучение состава короткоцепочечных жирных кислот в трех сериях препарата Рекицен- РД и их сорбционной способности в отношении различных штаммов лактобацилл и сроков выживания про биотических клеток в составе препарата-симбиотика.

Введение

При установлении диагноза основного заболевания, ассоциированного с дисбактериозом кишечника действие врача направлено на терапию заболевания и устранение факторов, вызывавших нарушение нормальной микрофлоры [1,3,6,7].

Предпочтительно применение про биотических препаратов, которые принято подразделять на 3 основные группы: пробиотики, пребиотики и синбиотики [3,7].

Пробиотики - это 'живые микроорганизмы и вещества микробного происхождения, оказывающие при естественном способе введения определенное воздействие на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма хозяина через функции его нормальной микрофлоры.

Пребиотики - это препараты немикробного происхождения, способные оказывать позитивный эффект на организм хозяина через селективную стимуляцию роста или усиления метаболической активности нормальной микрофлоры кишечника. В эту группу входят препараты, относящиеся к различным фармакотерапевтическим группам, но обладающие общим свойством - стимулировать рост и развитие нормальной микрофлоры кишечника.

Синбиотики - это препараты, полученные в результате рациональной комбинации пробиотиков и пребиотиков. Как правило, это биологически активные добавки, обогащенные одним или несколькими штаммами представителей родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*, в т.ч.

включающие фруктоолигосахариды из топинамбура и комплекс из бифидобактерий и лактобацилл, содержащие набор различных видов бифидобактерий (*B.bifidum*, *B.longum*, *B.adolescentis*), характерных определенному возрасту пациента, а также набор витаминов, микроэлементов и антиоксидантов; Ламинолакт, содержащий энтерококки, аминокислоты, пектины и морскую капусту.

Препарат Рекицен- РД позиционирован как БАД, состоящий из ферментированных нерастворимых и растворимых пищевых волокон, полученных из пшеничных отрубей по оригинальной технологии, витаминов группы В и др., йода и минеральных веществ. Препарат применяется перорально, нормализуя микроэкологию желудочно-кишечного тракта, поскольку нормальная микрофлора является важным фактором общего гомеостаза организма, обеспечивающего устойчивость к инфекции извне.

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), образуемые симбиотическими бактериями нормальной микрофлоры кишечника в процессе их ферментативной активности, имеют важное значение для организма хозяина, позитивные эффекты которых представлены в таблице 1.

Таблица 1. Эффекты короткоцепочечных жирных кислот

ЭФФЕКТ	МЕТАБОЛИТЫ, ОТВЕТСТВЕННЫЕ ЗА ЭФФЕКТ
Образование нейромедиаторов: гистамина, серотонина, GABA, 5-аминовалериановой кислоты, β-аланина	Пропионовая, масляная и валериановая кислоты
Антимикробный эффект, подавление адгезии к эпителию, поставка субстратов глюкогенеза	Пропионовая кислота и ее производные (пропионаты)
Активация фагоцитоза макрофагами, полиморфно-ядерными лейкоцитами и др. фагоцитирующими клетками	Муравьиная кислота и ее производные (формиаты), оксид азота
Регулировка моторной активности кишечника	Уксусная кислота и ее производные (ацетаты), пропионовая кислота, масляная кислота и ее производные (бутираты), оксид азота
Усиление местного иммунитета, поставка субстратов липогенеза	Уксусная кислота и ее производные (ацетаты)
Регуляция пролиферации и дифференцировки эпителиоцитов, нейтрализация пищевых проканцерогенов	Масляная кислота и ее производные (бутираты)
Энергообеспечение эпителиоцитов слизистой, участие в ионном обмене	Масляная кислота и ее производные (бутираты)

Следует отметить, что образование представителями нормофлоры кишечника производных масляной кислоты влияет на инактивацию пищевых проканцерогенов, таких

как нитрозамины, которые обычно образуются в результате метаболической активности бактерий - комменсалов у людей, употребляющих богатую белком пищу. В то время как связывание микробными метаболитами азота имеет значение для профилактики печеночной энцефалопатии, связывание фосфатов ведет к снижению риска хронической почечной недостаточности, а гидролиз оксалатов важен для защиты от образования почечных камней [1,2].

В связи с указанным интерес представили исследования по определению состава короткоцепочечных жирных кислот в различных сериях препарата Рекицен-РД с последующей загрузкой их суспензиями 5 штаммов лактобацилл.

Материалы и методы.

В работе были использованы 3 серии препарата Рекицен-РД. Определение содержания короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в образце препарата осуществляли следующим образом: пробу препарата 0,1 мл помещают в пробирку с коническим дном, приливают 2 мл дистиллированной воды и 1 мл стандартного раствора, перемешивают путем встряхивания в течение 10 минут, добавляют 0,5 мл 1 N HCl для определения связанных кислот, центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 мин. Для определения свободных кислот добавление HCl не требуется.

Использовали метод газожидкостной хроматографии, для чего микрошприцем вводили пробу надосадочной жидкости, полученной после центрифугирования исследуемого образца, около 1 мкл в испаритель хроматографа с детектором ионизации в пламени, снабженном кварцевой капиллярной колонкой длиной 36 м с внутренним диаметром 0,32 мм с неподвижной фазой FFAP (free fatty acids phase) в виде пленки толщиной 0,33 мкм. Режим работы хроматографа: изотермический с температурой термостата 150°C, температурой испарителя и детектора 230°C. Газ-носитель - азот, с давлением на входе в колонку 1,8 атм. Расход газа-носителя 2,0 мл/мин, воздуха 300 мл/мин. Соотношение потоков газа - носителя на сброс и в колонку 50:1. Время хроматографирования около 8 мин.

Определение абсолютного содержания индивидуальных кислот в смеси осуществляли путем расчета площадей хроматографических пиков методом «треугольника» с последующей компьютерной обработкой хроматограмм. Вычисляли относительное содержание (т.е. отношение концентрации данной кислоты к общей суммарной концентрации всех КЖК) уксусной, пропионовой, масляной кислот в суммарном содержании C₂-C₄, значения окислительно-восстановительного потенциала среды, выраженного значениями Анаэробного Индекса (АИ - отношение суммы концентраций (С) восстановленных кислот к менее восстановленным кислотам: [(пропионовая+масляная)/уксусная], относительного суммарного содержания изокилот (\sum изоС_n), отдельно изоС₅/С₅ в содержании С₂-С₆.

В качестве культур использовали 5 штаммов бактерий рода *Lactobacillus*: *L. plantarum*

8PA-3, *L.fermentum* 90-4C, *L.rhamnosum* GG, *L.plantarum* 206 и *L.casei* 33.

Результаты

1. Определение в 3-х сериях препарата Рекицен-РД спектра и уровня короткоцепочечных жирных кислот.

Перед проведением опытов было сочтено целесообразным привести показатели содержания короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) в супернатантах фекалий здорового человека в норме. Различными исследователями показано, что показатели относительного содержания в норме уксусной кислоты находятся в пределах 0,634 ($\pm 0,014$), пропионовой - 0,189 ($\pm 0,011$) и масляной кислот - 0,176 ($\pm 0,011$) в суммарном относительном содержании C₂-C₄. Значения Анаэробного индекса (АИ), характеризующего окислительно-восстановительный потенциал просветной среды толстой кишки, находятся в области отрицательных значений -0,576 ($\pm 0,012$). Отношения содержания отдельных изомеров кислот к кислотам ($\sum iC_n, iC_5 / C_5$) в норме имеют значения $EiC_n = 0,059 \pm 0,015$ ед, $iC_5 / C_5 = 1,471 \pm 0,20$ ед. Рассчитанные молярные соотношения суммы свободных КЖК и их солей ($\sum(R-H^+): \sum(R^- Na^+)$) в норме составляют 2:1.

Данные количественного содержания КЖК в различных сериях препарата Рекицен-РД представлены в таблице 2.

Известно, что по характеру индивидуального действия различных соединений на рост симбиотических бактерий их можно условно подразделить на 3 группы: (1) стимуляторы роста - ацетат, сукцинат, глутамат, метионин, лизин; (2) ингибиторы роста - аланин, аспартат, гистидин, формиат, цистеин и (3) нейтральные соединения. В отношении ацетата показано, что при низких и средних концентрациях он стимулирует рост культуры, а при высоких подавляет его. Интересно, что добавление ацетата к смеси метаболитов-ингибиторов приводит к изменению знака самого эффекта - замене ингибирующего действия на слабое стимулирующее. Свойства ацетата позволили предположить, что он является плотностно-зависимым фактором, влияющим на смену фаз развития культуры.

Далее методами геномики и протеомики было показано, что его добавление в среду культивирования *E.coli* приводит к повышению экспрессии по крайней мере 37 белков и понижению уровня экспрессии 60 других протеинов. Повышали экспрессию транспортные белки, переносчики аминокислот и пептидов, ферменты метаболизма, стрессовые белки, белки стационарной фазы. В результате этой глобальной энзиматической перестройки выживаемость бактерий в экстремальных условиях повышалась в 150-400 раз.

Таблица 2. Количественное содержание КЖК в различных сериях препарата Рекицен-РД

Название КЖК и их количество (в мг/г)	Серия 1	Серия 2	Серия 3
C2 (уксусная)	0,930	0,943	0,965
C3 (пропионовая)	0,129	0,157	0,162
iC4 (изомасляная)	0,037	0,013	0,032
C4 (масляная)	0,111	0,058	0,061
iC5 (изовалериановая)	0,044	0,084	0,042
C5 (валериановая)	0,058	0,020	0,028
iC6 (изокапроновая)	0,011	0,024	0,015
C6 (капроновая)	0,045	0,028	0,044
Общий уровень КЖК	1.365	1.303	1.349
Анаэробный Индекс (АИ)	0,054	0,046	0,051

Аналогичным образом было показано, что другой типичный экзометаболит *E.coli*, формиат, регулирует синтез 10 из 37 индуцировавшихся ацетатом белков. Имеются сведения об аналогичном регуляторном действию рН и пропионата и синергетическом действии рН и ряда короткоцепочечных жирных кислот. Эти результаты объясняют механизмы индивидуального действия и взаимовлияния экзометаболитов. Первое из них, по-видимому, связано с непосредственным или опосредованным влиянием метаболитов на экспрессию генов, а второе с тем, что при одновременном присутствии двух и более соединений экспрессируются преимущественно те белки, которые не подвержены разнонаправленной регуляции со стороны этих соединений. Хроматографический анализ препарата Рекицен- РД показал наличие в его составе комплекса короткоцепочечных жирных кислот, уровень которых приближается к показателям их содержания в толстой кишке. Так содержание ацетата в норме находится в пределах 0,634 ($\pm 0,014$), пропионовой - 0,189 ($\pm 0,011$) и масляной кислот - 0,176 ($\pm 0,011$) в суммарном относительном содержании C₂-C₆ короткоцепочечных жирных кислот. Значения Анаэробного индекса (АИ), характеризующего окислительно-восстановительный потенциал содержимого толстой кишки, находятся в области отрицательных значений ($-0,576 \pm 0,012$). Отношения содержания отдельных изомеров кислот к кислотам ($\sum iC_n, iC_5 / C_5$) в норме имеют значения $EiC_n = 0,059 \pm 0,015$ ед, $iC_5 / C_5 = 1,471 \pm 0,20$ ед. Рассчитанные молярные соотношения суммы свободных КЖК и их солей ($\sum(R-H^+): \sum(R-Na^+)$) в норме составляют 2:1.

Препарат Рекицен РД имеет показатели АИ, равные 0,046-0,051-0,054, что среднем составляет $(+0,503 \pm 0,016)$. Можно полагать, что одним из механизмов нормализующего воздействия Рекицена- РД на микробиоценоз кишечника является наличия высокого уровня ацетата, который по данным молекулярно-генетических исследований способен индуцировать активность не менее 100 генов симбиотических бактерий различных таксономических групп; (Wolfe, 2005), в то время как бутират наоборот, снижает регуляцию генов геномных «остро вою» патогенности, в частности, SPI -1, у *Salmonella enterica* (Gantois et al., 2006) [9-10].

2. Изучение сорбционной способности препарата Рекицен- РД в отношении штаммов лактобацилл,

Методика сорбции. Бактерии 5 штаммов: *L. plantarum* 8PA-3, *L.fermentum* 90-4С, *L.rhamnosum* GG, *L.plantarum* 206 и *L.casei* 33.

Использовали 10% (в конечном объеме) суспензию Рекицена- РД на основе 0,9% физиологического раствора хлорида натрия (NaCl). В опытные образцы с начальным объемом 4,5 мл вносили 0,5 мл бактериальной взвеси с концентрацией микробных клеток 10^9 /мл, перемешивали и ставили на инкубацию при 37⁰С на 30 минут. После инкубации пробирки откручивали при 3 тыс. об/мин в течение 1-2 минут. Осадок набирали бактериологической петлей, наносили на предметное стекло, распределяя суспензию по поверхности стекла, мазок высушивали, фиксировали над пламенем горелки, окрашивали по Граму и микроскопировали.

Установлено, что бактериальные клетки разных штаммов, в том числе *L. plantarum* 8PA-3, *L.fermentum* 90-4С, *L.rhamnosum* GG, *L.plantarum* 206 и *L.casei* 33 по разному сорбируются на волокнах препарата. Наибольшей активностью характеризуется штамм *L.plantarum* 206, выделенный в лаборатории генетики вирулентности бактерий ранее и сохраненный в музее живых культур. Внесение бактериальных клеток в количестве 10^9 /мл в 1 мл 10% суспензии Рекицена- РД на основе стандартного раствора сахарозы (криопротектора) с последующим лиофильным высушиванием и хранением в условиях рефрижератора позволило констатировать сохранность жизнеспособности бактериальных клеток практически в мало измененном титре (10^8 /мл) в течение года.

Заключение.

- 1. Препарат Рекицен- РД с своем составе содержит набор различных короткоцепочечных жирных кислот, играющих несомненную роль в его позитивном влияние на состояние микробиоценоза кишечника.
- 2. Из 5 культур лактобацилл селекционирован штамм *L.plantarum* 206, бактерии которого сохраняются практически в исходном популяционном титре (снижение менее чем на порядок логарифма) в препаратах Рекицена Д в течение года хранения в лиофильно высушенном состоянии.
- Полученные данные открывают перспективы создания нового препарата-синбиотика

на основе оригинального охраноспособного штамма *L.plantarum* 206 и препарата Рекицен-РД.

• Литература

- 1.Бондаренко В.М, Грачева НМ Дисбиотические состояния и лечебные мероприятия при них. Вестн. РАМН, 2005, 12:24-29.
- 2.Бондаренко В.М Метаболитные пробиотики: механизмы терапевтического эффекта при микрoэкологических нарушениях. Consilium Medicum, 2005, 7: 437-443.
- 3.Бондаренко В.М, Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией. Журн. микробиол.2004,1 :84-92.
- 4.Вахитов ТЯ, Петров Л.Н, Бондаренко В.М Концепция про биотического препарата, содержащего оригинальные микробные метаболиты. Журн. микробиол. 2005, 5: 108-114.
- 5.Вахитов ТЯ, Петров Л.Н, Бондаренко В.М, Воробьев А.А. Перспективы создания пробиотических препаратов на основе «чувства кворума» у бактерий. Журн. микробиол. 2006, 3: 105-113.
- 6.Воробьев А.А., Бондаренко В.М, Лыкова Е.А. и др. Микрoэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция пробиотиками. Вестн. Р АМН, 2004,2: 13-17.
- 7.Грачева НМ, Бондаренко ВМ Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника. Инфекц. болезни. 2004, 2(2):53-58.
- 8.Петров Л.Н, Бондаренко В.М, Вахитов Т.Я, Воробьев А.А. QS-системы у бактерий и перспективы создания новых метаболитных про биотических препаратов. Вестн. РАМН,2006,1:38-45.
- 9.Gantois T, Ducatelle R., Pasmans F. et al. Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression. Appl. Envir. Microbiol. 2006, 72(1): 946-949.
- 10.Woife A.J. The acetate switch. Microbiol. Molecular Biology Rev.2005, 69(1):12-50.

Руководитель НИР, зав. лаб.генетики вирулентности бактерии

НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи РАМН, д.м.н., профессор



Бондаренко В.М.