



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

Определение уровня короткоцепочечных жирных кислот в препарате Рекицен-РД (производства ЗАО «Ягодное» г. Киров)

Короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), образуемые симбиотическими бактериями нормальной микрофлоры кишечника в процессе их ферментативной активности, имеют важное значение для организма хозяина. Позитивные эффекты КЖК 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 глюконогена	Пропионовая кислота и ее производные (пропинаты)
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.

В связи с указанным, интерес представили исследования по определению состава короткоцепочечных жирных кислот в различных сериях препарата Рекицен-РД.

Материалы и методы.

В работе были использованы 3 серии препарата Рекицен-РД.

Определение содержания 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 1500С, температурой испарителя и детектора 2300С. 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 изоСп), отдельно изоC5/C5 в содержании C2- C6.

Результаты.

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 С2-С4. 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 $E_{iC_n} = 0,059 \pm 0,015$ 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.

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

Названия КЖК и их количество (в мг/г)	Серия 1	Серия 2	Серия 3
С2 (уксусная)	0,930	0,943	0,965
С3 (пропионовая)	0,129	0,157	0,162
iС4 (изомасляная)	0,037	0,013	0,032
С4 (масляная)	0,111	0,058	0,061
iС5(изовалериановая)	0,044	0,084	0,042
С5 (валериановая)	0,058	0,020	0,028
iС6(изокапроновая)	0,011	0,024	0,015
С6 (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

Обсуждение.

Выявлено, 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. Добавление ацетата к смеси метаболитов-ингибиторов приводило 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.

Аналогичным образом было показано, что другой типичный экзометаболит *E.coli*, формиат, регулирует синтез 10 из 37 индуцировавшихся ацетатом белков. Имеются сведения об аналогичном регуляторном действии 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 С2-С6 КЖК. 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 ($\sum iCn$, $iC5/C5$) в норме имеют значения $EiCn = 0,059 \pm 0,015$ ед, $iC5/C5 = 1,471 \pm 0,20$ ед. Рассчитанные молярные соотношения суммы свободных КЖК и их солей ($\sum(R-N^+)$): $\sum(R-Na^+)$ в норме составляют 2:1.

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

Заключение.

Препарат Рекицен-РД в своем составе содержит набор различных короткоцепочечных жирных кислот, играющих несомненную роль в его позитивном влиянии на состояние микробиоценоза кишечника.

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 микробиологических нарушениях. *Consilium Medicum*, 2005, 7: 437-443.
3. Вахитов Т.Я., Петров ЛН, Бондаренко В.М Концепция пробиотического препарата, содержащего оригинальные микробные метаболиты. *Журн. микробио.* 2005,5: 108-114.
4. Вахитов Т.Я., Петров ЛН, Бондаренко В.М, Воробьев А.А. Перспективы создания пробиотических препаратов на основе «чувства кворума» у бактерий. *Журн.микробиол.*2006,3: 105-113.
5. Воробьев А.А., Бондаренко н.м, Лыкова Е.А. и др. Микробиологические нарушения при клинической патологии и их коррекция пробиотиками. *Вест РАМН*, 2004,2:13-17.
6. Грачева Н.М., Бондаренко В.М Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника. *Инфекц. болезни.* 2004, 2(2):53-58.
7. Петров Л.Н., БондаренкоВ.М., Вахитов Т.Я.; Воробьев А.А. QS-системы у бактерий и перспективы создания новых метаболитных пробиотических препаратов. *Вестн. РАМН*, 2006, 1:38-45.
8. Gantois I., Ducatelle R., Pasmans P. et al. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Envir. Microbiol.* 2006, 72(1): 946-949.
9. Wolfe 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.