

©Коллектив авторов

## ОЦЕНКА УРОВНЯ МЕТАБОЛИТОВ В ФЕКАЛИЯХ ПАЦИЕНТОВ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Е.С. Жгун\*, Ю.В. Кислун, Т.Н. Калачнюк, В.А. Веселовский, А.С. Урбан,  
П.О. Тихонова, А.В. Павленко, Г.Н. Ильченко, Е.Н. Ильина

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины,  
119435, Москва, Малая Пироговская, 1а; \*эл. почта: al.androva@gmail.com

Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относят язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК), характеризуются хроническим рецидивирующим воспалением слизистой кишечника неизвестной этиологии и приводят к существенному снижению качества жизни и к смерти пациентов. ВЗК ассоциированы с подавлением нормальной кишечной микрофлоры, в том числе с уменьшением количества бактерий — производителей короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), обладающих противовоспалительными и защитными свойствами. Среди различных способов коррекции микрофлоры кишечника особое внимание исследователей привлекает трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ), введение в организм пациента микробиоты, полученной от здорового донора. В результате ТФМ, как правило, наблюдается положительный терапевтический эффект, сопровождающийся восстановлением нормальной микрофлоры кишечника пациента. Существенным недостатком метода является отсутствие стандартизации. Метаболиты, продуцируемые кишечной микрофлорой, в частности КЖК, позволяют достаточно объективно оценить функциональное состояние микробиоты кишечника и, следовательно, успешность процедуры ТФМ. Методами газовой хроматографии и спектроскопии ядерно-магнитного резонанса были проанализированы концентрации и молярные соотношения КЖК из фекалий 60 здоровых доноров. Эти метаболиты показали хорошее соответствие как при сравнении двух методов между собой, так и при сопоставлении с литературными данными. Анализ КЖК в фекалиях больных ЯК (19 пациентов) и БК (17 пациентов) выявил общее снижение концентраций КЖК в исследуемых группах по сравнению с контрольными образцами с существенными колебаниями значений внутри исследуемой группы. На ограниченной выборке пациентов с ВЗК (6 пациентов с ЯК и 5 пациентов с БК) определены концентрации КЖК до и в течение 30 дней наблюдения после проведения ТФМ. В выбранном временном диапазоне ТФМ оказывает эффект на уровни КЖК. Несмотря на то, что в течение 30 дней профиль КЖК, характерный для здоровых доноров, не восстанавливается полностью, тенденция к его достижению однозначно прослеживается для обоих заболеваний.

**Ключевые слова:** трансплантация фекальной микробиоты; воспалительные заболевания кишечника; короткоцепочечные жирные кислоты

**DOI:** 10.18097/PBMC20206603233

### ВВЕДЕНИЕ

Сегодня, благодаря совокупности знаний, накопленных в области молекулярной медицины и биологии, микробиота кишечника человека рассматривается как самостоятельный орган, развивающийся по своим законам [1]. Микробиота кишечника человека принимает участие в процессе пищеварения, обеспечивает неспецифическую защиту от патогенных микроорганизмов посредством усиления барьерной функции кишечного эпителия, а также способствует развитию и модуляции врожденного иммунитета [2]. Кроме этого, кишечные микроорганизмы являются продуцентами короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), преимущественно ацетата, пропионата, бутирата [3, 4], вторичных желчных кислот [5], витаминов группы В [6], обладающих “оздоравливающим” действием на организм хозяина. Развитие технологий высокопроизводительного секвенирования произвело революцию в изучение микробиоты кишечника человека и позволило максимально полно описать её состав в норме и патологии [7]. Показано, что микробиота кишечника существенно трансформируется под влиянием экзогенных и

эндогенных факторов, приобретая характерный профиль при различных патологических процессах [8]. Многие заболевания, такие как воспалительные заболевания кишечника (ВЗК), к которым относятся болезнь Крона (БК) [9] и язвенный колит (ЯК) [10], инфекция, вызванная патогенной формой бактерии *Clostridium difficile* [13, 14], метаболический синдром [11, 12] ассоциированы с угнетением и замещением нормальной микрофлоры кишечника или обеднением её состава. При этих состояниях зачастую существенно сокращается разнообразие бактерий — производителей КЖК, которые обладают противовоспалительными и защитными свойствами.

Очевидно, что при ВЗК происходят адаптивные изменения микробиоты, усугубляющие в ряде случаев тяжесть клинической картины. Существует множество способов коррекции микробиоты кишечника человека, среди которых наибольший интерес представляет трансплантация фекальной микробиоты (ТФМ) [16]. Процедура ТФМ заключается во введении с помощью эндоскопа, колоноскопа или перорально (в кишечнорастворимых капсулах) в организм пациента микробиоты, полученной от здорового донора. С 2013 года ТФМ официально одобрена Управлением по контролю пищевых продуктов и лекарственных

препаратов США (Food & Drug Administration) для лечения и предупреждения рецидивов кишечной инфекции, вызванной ванкомицин-устойчивой формой бактерии *Clostridium difficile* [17, 18]. Сегодня ТФМ приобретает всё большую популярность для терапии ЯК [19] и БК [20], синдрома раздражённого кишечника [21], а также в составе комплексной терапии в качестве экспериментальной методики при нейродегенеративных расстройствах, таких как аутизм [22] или болезнь Паркинсона [23, 24]. На данный момент у мирового научного сообщества не сформировалось четкого понимания механизмов, обуславливающих высокую терапевтическую эффективность ТФМ. Терапевтический эффект связывают с заселением микробов, производящих вторичные желчные кислоты [25] и КЖК [26]. Другим возможным эффектом колонизации является внутривидовая конкуренция, например, вытеснение патогенного штамма комменсальным [27]. Микрофлора также может предотвратить колонизацию *C. difficile* по иммуно-опосредованному механизму, не исключается влияние бактериофагов. Существенным недостатком ТФМ является отсутствие стандартизации: схемы и способы введения материала остаются на усмотрение медицинского персонала.

Анализ спектра метаболитов, продуцируемых кишечной микрофлорой, может дать объективную оценку функционального состояния микробиоты кишечника и, следовательно, успешности проведённой ТФМ. Особый интерес представляют мажорные КЖК — ацетат (C2), пропионат (C3) и бутират (C4), которые производятся бактериями кишечника из углеводов, преимущественно из неперевариваемых крахмалов и пищевых волокон [28]. Они эффективно поглощаются слизистой оболочкой кишечника и оказывают оздоравливающее действие на организм, являясь источником энергии для колоноцитов, обладая протекторным действием при развитии колоректального рака (в случае бутирата), контролируя наступление сытости и снижая уровень холестерина (в случае пропионата) [29]. Они, также, влияя на физиологию хозяина как сигнальные молекулы, участвуют в регуляции экспрессии генов [29, 30] и развитии иммунного ответа и подавлении воспаления [31]. Их молярное соотношение в толстой кишке и фекалиях здоровых добровольцев постоянно и составляет в среднем 60:20:20 [32].

В данной работе мы оптимизировали условия подготовки образцов фекалий и последующего газохроматографического анализа для количественной оценки КЖК [33]. Предложенная методика была отработана на образцах фекалий здоровых добровольцев и в дальнейшем использована для оценки уровней КЖК у пациентов с ВЗК, в том числе в динамике на фоне проведения ТФМ. Параллельно был разработан протокол оценки уровня метаболитов фекалий с использованием спектроскопии ядерного магнитного резонанса. Оба подхода продемонстрировали хорошую сходимость результатов. Эксперименты показали существенный дисбаланс уровней КЖК в фекалиях

пациентов по сравнению с контрольной группой. Показано, что ТФМ оказывает эффект на уровни КЖК (0-30 дней наблюдения), однако не восстанавливает профиля КЖК здорового донора в течение выбранного периода времени.

## МЕТОДИКА

### *Формирование выборки доноров и пациентов, сбор образцов кала*

К участию в исследовании были привлечены 60 здоровых добровольцев и 36 пациентов с подтвержденным на основании клинического и эндоскопического обследований диагнозом ВЗК (17 пациентов с БК и 19 пациентов с ЯК), проходящих лечение в отделении гастроэнтерологии Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины (ФНКЦ ФХМ).

Контрольную группу составили образцы фекалий, отобранные в период с 2016 по 2018 годы от группы здоровых добровольцев (n=60; 32 (53,4%) мужчин, 28 (46,6%) женщин, возраст 19-65 лет, средний возраст 31,8, средний ИМТ 23,8), включённых в проект “Создание биобанка фекальных образцов здоровых доноров ФНКЦ ФХМ”, одобренный Локальной этической комиссией ФНКЦ ФХМ от 06.09.2016. Критериями включения здоровых добровольцев в исследование были выбраны возраст 18-65 лет и индекс массы тела в пределах нормы. Критериями исключения из исследования были повышенный индекс массы тела, наличие в анамнезе заболеваний ЖКТ (включая ВЗК и онкологические заболевания), известных инфекционных заболеваний, прием антибиотиков в течение последних 3 месяцев до вступления в исследование, беременность или кормление грудью. Всем участникам проведена оценка состояния здоровья на основании анкетирования, анализа пищевых предпочтений и информации о ранее перенесенных заболеваниях, а также клинико-лабораторного обследования.

В экспериментальную группу вошли фекалии от 36 пациентов с ВЗК (17 пациентов с БК, 12 (70%) мужчин, 5 (30%) женщин, возраст 19-58 лет, средний возраст 38,5 и 19 пациентов с ЯК, 16 (84%) мужчин, 3 (16%) женщин, возраст 18-69 лет, средний возраст 37,7), включённых в проект “Метод трансплантации фекальной микробиоты в терапии заболеваний человека”, одобренный Локальной этической комиссией ФНКЦ ФХМ от 11.07.2016. Группы для исследования формировали после подтверждения диагноза на основании клинического и эндоскопического обследований.

Дополнительную экспериментальную группу составили образцы фекалий (n=11), отобранные от ограниченной выборки пациентов с ВЗК в течение 30 дней после проведения им ТФМ согласно протоколу, описанному ранее [34] (6 пациентов с ЯК, 4 (67%) мужчин, 2 (33%) женщин, возраст 20-50 лет, средний возраст 30,8 и 5 пациентов с БК, 3 (60%) мужчин, 2 (40%) женщин, возраст 41-58 лет, средний возраст 49).

От всех участников исследования были получены образцы фекалий, собранные после естественной дефекации. От пациентов, прошедших терапию ТФМ, были собраны образцы фекалий в следующих временных точках: точка 1 — до ТФМ, точка 2 — первый кал после ТФМ, точка 3 — через 1 неделю, точка 4 — 2 недели, точка 5 — 1 месяц. Общее число собранных образцов кала составило 38.

До начала анализа все образцы хранили в контейнерах при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### *Количественное определение КЖК*

##### **Газохроматографический анализ.**

Для количественного определения КЖК использовали разработанный ранее газохроматографический метод [33], модифицированный для нужд исследования. В качестве стандартов использовали уксусную, пропионовую, масляную, изо-масляную, валериановую, изо-валериановую, капроновую кислоты с содержанием более 99% (“Sigma-Aldrich”, США), а также диоксан (“Химмед”, Россия) в качестве внутреннего стандарта.

Стандартные растворы кислот готовили в деионизированной воде (18,2 Мом/см при  $25^{\circ}\text{C}$ ) до получения рабочих концентраций 1,0 мг/мл, 500 мкг/мл, 100 мкг/мл, 10,0 мкг/мл, 1,0 мкг/мл, 100 нг/мл.

Газохроматографическое определение КЖК проводили на газовом хроматографе Кристалл 5000.2 (“Хроматэк”, Россия) с пламенно-ионизационным детектором (ДИП) и капиллярной хроматографической колонкой поперечноспунной неподвижной жидкой фазы Карбовакс (длина — 30 м, внутренний диаметр — 0,32 мм, толщина плёнки — 1,0 мкм). Температурный режим колонки изменялся по следующей схеме:  $80^{\circ}\text{C}$  в течение 2 мин, далее — линейный градиент  $80-220^{\circ}\text{C}$  со скоростью  $20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ . Общее время анализа составляло 30 мин. Газ-носитель — азот, давление на входе в колонку — 70 кПа. Расходы водорода и воздуха — 15 мл/мин и 150 мл/мин соответственно. Ввод пробы (1 мкл) с делением потока 1:5. Газ-носитель — азот.

Пробоподготовку образцов кала осуществляли следующим образом. К навеске исследуемого образца (0,15–0,40 г) добавляли деионизированную воду, подкисленную соляной кислотой (вода:соляная кислота 6 М 9:1) в соотношении 1:10 и оставляли на орбитальном шейкере на 2 ч, центрифугировали в течение 5 мин при 16000 g. К 500 мкл надосадочной жидкости добавляли 450 мкл ацетонитрила и 50 мкг диоксана, встряхивали в течение 1 мин. Для проведения газохроматографического анализа использовали 1 мкл смеси.

Идентификацию хроматографических пиков проводили путём сравнения с абсолютными временами удерживания стандартов. Количественное определение проводили автоматическим интегрированием хроматограмм с помощью специального программного обеспечения Хроматэк Аналитик (“Хроматэк”).

**Ядерный магнитный резонанс.** Пробоподготовку образцов кала осуществляли

следующим образом. К точной навеске (0,1–0,5 г) исследуемого образца добавляли 0,15 М фосфатный буфер, pH 7,4, до объёмного соотношения образец (мг) : буфер (мкл) 1: 3 шарики оксида циркония и оставляли на орбитальном шейкере на 30 мин, центрифугировали при 16000 g в течение 15 мин при  $4^{\circ}\text{C}$ . Далее образцы подвергали ультрафильтрации на предварительно промытых картриджах Amicon-0,5-3 kDa (“Merck Millipore”, США) для очистки от остаточных высокомолекулярных соединений. 540 мкл фильтрата смешивали с 60 мкл  $10\times$  фосфатного буфера 1,5 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,0, 0,1%  $\text{NaN}_3$ , 10 мМ Имидазол, 10 мМ 3-триметилсилил (2,2,3,3- $\text{d}_4$ ) пропионата натрия (TSP) в  $\text{D}_2\text{O}$  (99,9% D). 600 мкл смеси отбирали в 5 мм ампулы (“Bruker”, Германия).

Спектры были измерены на спектрометре ЯМР Bruker Avance III HD (“Bruker”) с рабочей частотой на ядрах  $^1\text{H}$  500 МГц, оборудованном холодным датчиком Prodigy (“Bruker”). Для калибровки шкалы химических сдвигов использован сигнал TSP на 0 м.д. Для получения спектров была использована импульсная программа poesyrgld (“Bruker”) со следующими параметрами: число точек данных — 64k; число сканов без выборки данных — 16; число накоплений — 512; спектральная ширина — 16,67 м.д. (8333 Гц); время выборки данных — 3,9 с; релаксационная задержка между сканами — 1,0 с; температура  $25^{\circ}\text{C}$ .

Каждый спектр ЯМР  $^1\text{H}$  был обработан вручную. С помощью пакета TopSpin (“Bruker”) были проведены корректировка фазы, начальная корректировка базовой линии и уширение линии на 0,5 Гц. Далее с помощью пакета Chenomx 8 (“ChenomX Inc.”, Канада) была проведена дополнительная коррекция базовой линии сплайном Уиттакера. Идентификацию и количественное измерение метаболитов осуществляли по встроенной библиотеке Chenomx с использованием TSP как внутреннего стандарта, вручную.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### *Количественное определение содержания КЖК в образцах кала*

Из всего разнообразия бактериальных метаболитов, представленных в кале, мы сконцентрировали своё внимание на КЖК (ацетате, пропионате, бутирате и валерате), вклад которых в формирование здоровья человека исследован наиболее полно [31, 35]. Тем не менее, несмотря на длительное изучение, роль каждого из них в норме и патологии остаётся дискуссионной. Например, бутират — основной продукт деградации пищевых волокон, до недавнего времени считался исключительно “полезным”, поскольку является источником энергии для колоноцитов и оказывает иммуномодулирующее действие на здоровье кишечника [36]. Однако недавние исследования показали, что он же препятствует пролиферации стволовых клеток и клеток-предшественников в кишечных криптах, а также замедляет процесс восстановления

повреждённой слизистой оболочки [37]. Оказалось, что дифференцированные колоноциты метаболизируют бутират, препятствуя его проникновению в пролиферирующие эпителиальные стволовые клетки и клетки-предшественники внутри кишечной крипты [37].

Весь массив собранных образцов был проанализирован двумя независимыми методами — газовой хроматографией (ГХ) и спектроскопией ЯМР  $^1\text{H}$ . Определение концентраций и молярных соотношений КЖК методом ГХ является “золотым стандартом” и используется в клинко-диагностической практике с 1952 года [38]. Принцип ГХ основан на газе-носителе, который служит в качестве подвижной фазы, где образцы соединений разделяются путём дифференциального взаимодействия с неподвижной фазой колонки. Для успешного определения КЖК предварительная обработка образцов фекалий имеет решающее значение. Зачастую физической обработки (филтрация, центрифугирование, разбавление) или подкисления среды оказывается недостаточно, и требуется химическая экстракция или модификация [39].

Появившаяся в конце 70-х годов спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$  благодаря своей надёжности и воспроизводимости результатов рассматривается сейчас как наиболее подходящая альтернативная платформа для исследования метаболитов биологических жидкостей и тканей. Изначально спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$  использовалась для изучения только изолированных белков, но со временем область применения была расширена до тканей и биологических жидкостей. Первый спектр ЯМР  $^1\text{H}$  мочи был получен в 1970-х годах [40], вслед за которым последовали систематические исследования по метаболомному профилированию с использованием спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  для диагностики пациентов с различными патологиями [41].

Большинство ЯМР  $^1\text{H}$  исследований сфокусировано на анализе мочи, сыворотки крови или плазмы [41], работ в области анализа метаболома фекалий до сих пор относительно немного [42, 43].

Использование спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  в качестве рутинного метода метаболомного анализа всё ещё осложняется его относительно низкой чувствительностью по сравнению с масс-спектрометрическими методами анализа, но, во многом, компенсируется простотой пробоподготовки [43]. В случае исследования биологических жидкостей требования к пробоподготовке для анализа методом ЯМР  $^1\text{H}$

минимальны и обычно ограничиваются контролем pH и ионной силы препарата исследуемого образца. В этой связи спектроскопия ЯМР  $^1\text{H}$  представляется адекватным методом анализа высокопредставленных КЖК в экстракте фекалий.

Нельзя не заметить, что многочисленные плюсы и минусы существуют для каждой платформы, поэтому для получения максимальной информации по метаболомному профилированию предпочтительно использовать комбинацию нескольких методов.

В нашей работе мы параллельно использовали ГХ-анализ и спектроскопию ЯМР  $^1\text{H}$ . Методом ГХ проанализирован весь массив собранных образцов фекалий (здоровых добровольцев и пациентов с ВЗК, в том числе прошедших терапию методом ТФМ); методом спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$  образцы из контрольной группы здоровых добровольцев и группы пациентов с ВЗК, прошедших лечение методом ТФМ (рис. 1).

Мы адаптировали разработанный ранее [33] протокол экстракции под конкретные лабораторные условия, увеличив финальную концентрацию соляной кислоты с 0,01 М до 0,06 М. На наш взгляд, увеличение кислотности среды позволило нам улучшить разделение пиков.

В образцах фекалий здоровых добровольцев концентрации и молярные соотношения КЖК, рассчитанные по результатам анализа, были стабильны от образца к образцу и показали хорошее соответствие как при сравнении двух методов между собой, так и при сравнении с литературными данными [32] (табл. 1).

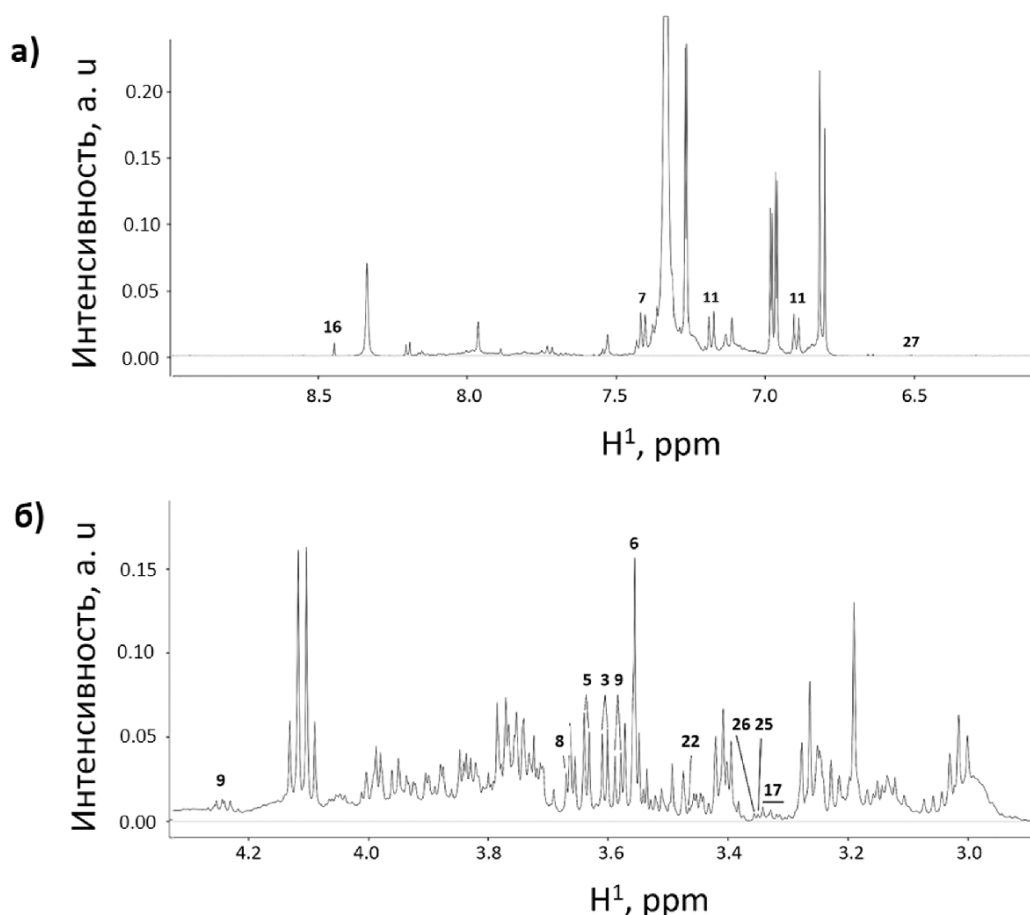
Анализ КЖК в фекалиях больных ЯК (19 пациентов) и БК (17 пациентов) выявил общее снижение концентраций КЖК в исследуемых группах по сравнению с контрольными образцами, как продемонстрировано в ранее проведённых исследованиях [44, 45].

Молярные соотношения КЖК также характеризовались существенными отклонениями от значений нормы с ярко выраженными колебаниями значений внутри выборки (табл. 2). Метаболические профили ЯК и БК также имели различия. В случае ЯК наблюдали более резкое снижение уровня бутирата и повышение уровня пропионата по сравнению с БК (рис. 2). Образцы пациентов с ЯК также характеризовались более выраженной неоднородностью значений по сравнению с БК, что может служить косвенным подтверждением различной природы возникновения двух исследуемых патологий.

Таблица 1. Уровень мажорных КЖК в фекалиях здоровых добровольцев

Метаболит	Усреднённые литературные данные [32]	Наши данные			
	%*	% (ГХ)	% (ЯМР $^1\text{H}$ )	мкмоль/г** (ГХ)	мкмоль/г (ЯМР $^1\text{H}$ )
Ацетат	60	64±4,9	65±4,2	57,33±19,37	5,3±3,4
Пропионат	20	19±3,7	19±3,9	17,29±7,79	1,6±1,2
Бутират	20	17±3,3	16±2,9	14,66±7,07	1,23±1,0

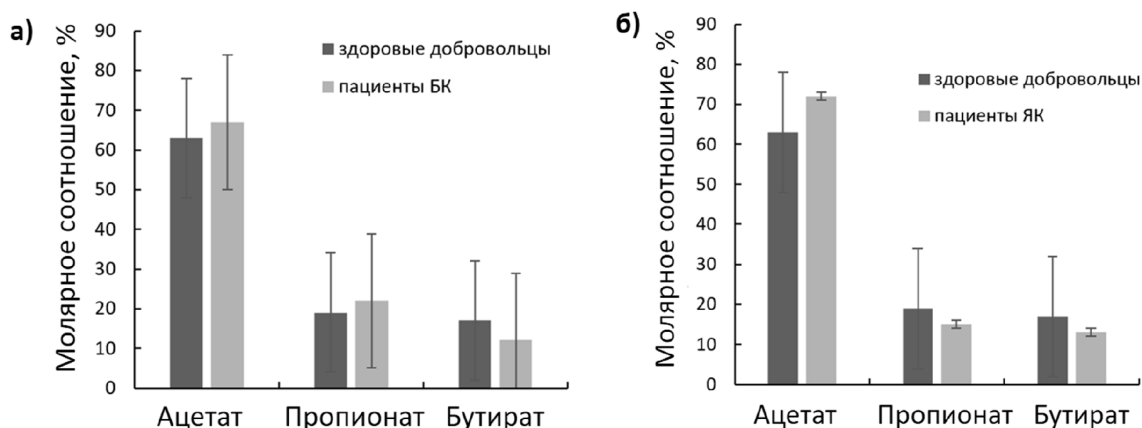
Примечание. Здесь и в таблице 2: \* – % показывает процентное соотношение молярных концентраций КЖК в фекалиях; \*\* – количественные данные представлены в мкмоль/г влажного вещества.



**Рисунок 1.** Типичный спектр ЯМР <sup>1</sup>H образца фекалий пациента. Основные идентифицированные метаболиты: 1 – лейцин; 2 – аланин; 3 – валин; 4 – лизин; 5 – глицерин; 6 – глицин; 7 – фенилаланин; 8 – изолейцин; 9 – треонин; 10 – ацетат; 11 – тирозин; 12 – аспарат; 13 – глутамат; 14 – метионин; 15 – сукцинат; 16 – формиат; 17 – пролин; 18 – урацил; 19 – пропионат; 20 – бутират; 21 – изобутират; 22 – 3-гидроксифенилацетат; 23 – диметиламин; 24 – валерат; 25 – метанол; 26 – теофиллин; 27 – фумарат; 28 – изовалерат; 29 – триметиламин. а) Область ЯМР спектра в диапазоне 8,5-6,5 ppm H<sup>1</sup>; б) Область ЯМР спектра в диапазоне 4,2 - 3,0 ppm H<sup>1</sup>.

**Таблица 2.** Уровень мажорных КЖК в фекалиях пациентов с ВЗК

Метаболит	Норма		Болезнь Крона		Язвенный колит	
	%* (ГХ)	мкмоль /г** (ГХ)	%	мкмоль /г (ГХ)	%	мкмоль /г (ГХ)
Ацетат	64±4,9	57,35±19,37	66,8±6,4	54,25±17	71,74±7,13	48,32±20,12
Пропионат	19±3,7	17,35±7,79	20,9±5,1	19,07±8,4	15,43±5	11,67±7,5
Бутират	17±3,3	14,74±7,07	12,3±4,4	11,7±7,7	12,83±4,75	8,76±4,75



**Рисунок 2.** Метаболические профили пациентов с ВЗК. а) язвенный колит, 17 пациентов; б) болезнь Крона, 19 пациентов.

Наблюдаемое нами изменение уровней КЖК, в частности, существенное снижение уровня бутирата, согласуется с ранее опубликованными данными, которые указывают на прямую взаимосвязь с истощением микрофлоры бактериями-производителями бутиратов, такими как *F. prausnitzii* и *R. hominis* при ВЗК [44]. Эти сдвиги в метаболомном составе прямо отражают характерный для ВЗК профиль дисбиоза и могут служить дополнительной мерой оценки активности и тяжести заболевания.

Наибольший интерес представляют данные, полученные на ограниченной выборке пациентов с ВЗК (6 пациентов с ЯК и 5 пациентов с БК), в которой уровни КЖК были измерены до и в течение 30 дней после проведения ТФМ. Эксперименты показали существенный дисбаланс уровней КЖК в фекалиях пациентов по сравнению с контрольной группой. Динамика колебаний молярных соотношений КЖК, полученных методом ГХ во времени, показывает значительный дисбаланс значений как до проведения ТФМ, так и в течение 30 дней наблюдения после проведения процедуры (рис. 3).

В выбранном временном диапазоне ТФМ оказывает выраженный эффект на уровни КЖК пациентов. Несмотря на то, что в течение 30 дней профиль КЖК, характерный для здоровых доноров, у пациентов полностью не восстанавливается,

тенденция к его достижению однозначно прослеживается для обоих заболеваний.

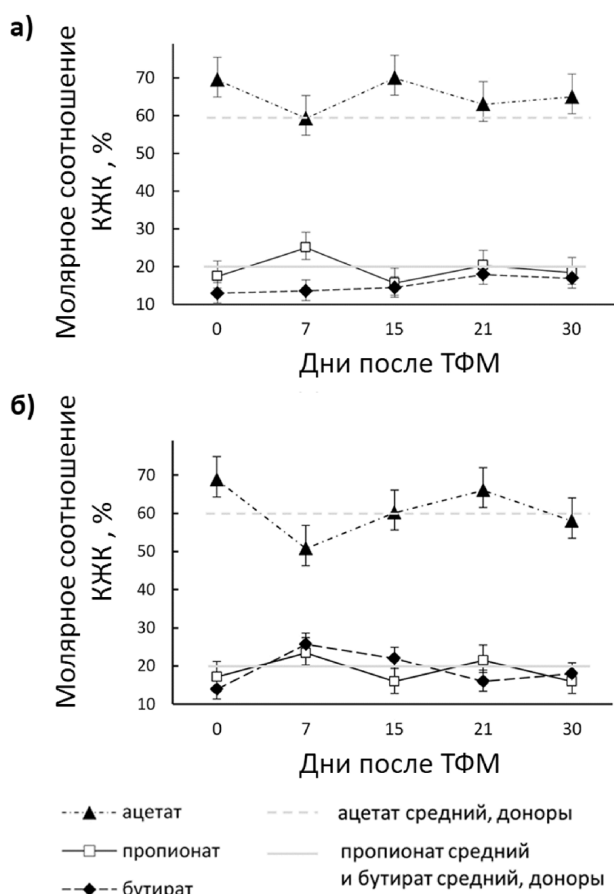
Профиль колебаний уровней КЖК может отражать адаптивные механизмы замещения микрофлоры пациента микрофлорой здорового донора и служить дополнительным показателем степени восстановления микрофлоры пациента.

В нашей работе мы расширили список исследуемых КЖК (ацетата, пропионата, бутирата) присутствующим в меньших концентрациях валератом. Интерес к этому метаболиту неслучаен: в фекалиях пациентов с ВЗК его концентрации достоверно ниже, чем у здоровых добровольцев [46]. Эксперименты, проведенные на мышиных моделях с индуцированным колитом показали, что валерат проявляет иммуномодулирующий эффект путём метаболического и эпигенетического перепрограммирования Т- и В-лимфоцитов, регулируя таким образом про- и противовоспалительный иммунный ответ. Роль валерата в регуляции иммунного ответа у пациентов с ВЗК ещё не изучена, однако уже сейчас можно предположить, что его вклад в модуляцию кишечного воспаления может иметь диагностический потенциал [35].

Анализ концентраций валерата в фекалиях здоровых добровольцев и пациентов с ВЗК также был проведен параллельно методами ГХ и спектроскопии ЯМР  $^1\text{H}$ . Средние значения, полученные методами ГХ и ЯМР  $^1\text{H}$  для группы здоровых добровольцев, хорошо согласовывались между собой и составили  $2,43 \pm 0,98$  мкмоль/г и  $3,21 \pm 2,57$  мкмоль/г влажного вещества соответственно. В случае ВЗК наблюдали существенное падение концентрации валерата в фекалиях до  $1,5 \pm 0,98$  мкмоль/г для обоих заболеваний, существенных отличий между ЯК и БК отмечено не было. Как и в случае мажорных КЖК, поведение валерата в течение 30 дней наблюдения за пациентами после ТФМ (ограниченная выборка из 6 пациентов с ЯК и 5 пациентов с БК), характеризовалось скачкообразными изменениями концентраций и не достигало значений нормы в исследуемом временном промежутке.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Кишечные метаболиты, такие как КЖК, могут рассматриваться как перспективные биомаркеры заболеваний ЖКТ и служить мерой излеченности пациента благодаря их доступности и легкости определения в образцах фекалий. Тем не менее, на настоящий момент накопленных знаний не всегда достаточно для диагностически достоверной оценки развития патологического процесса. В нашей работе мы оценили вклад КЖК в развитие кишечного воспаления и его терапии методом трансплантации фекальной микробиоты. Результаты показали, что ТФМ оказывает эффект на уровни КЖК, однако не восстанавливает профиля КЖК, характерного для здорового донора, в течение выбранного периода времени. Для получения диагностически достоверных данных требуется больший период наблюдения над большими экспериментальными группами.



**Рисунок 3.** Динамика колебаний молярных соотношений КЖК пациентов с ВЗК в течение 30 дней после проведения ТФМ (среднее значение). Данные получены методом ГХ. а) болезнь Крона, 5 пациентов; б) язвенный колит, 6 пациентов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследование было одобрено локальной этической комиссией ФГБУ ФНКЦ ФХМ России (проекты “Создание биобанка фекальных образцов здоровых доноров ФНКЦ ФХМ ФМБА России”, выписка из протокола №1 от 06.09.2016 и “Метод трансплантации фекальной микробиоты в терапии заболеваний человека”, выписка из протокола №1 от 11.07.2016). От всех участников исследования было получено информированное добровольное согласие.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

- O'Hara A.M., Shanahan F. (2006) EMBO Reports, **7**, 688-693.
- Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. (2012) Science, **336**(6086), 1268-1273.
- Primec M., Micetic-Turk D., Langerholc T. (2017) Anal. Biochem., **54**, 9-21.
- Louis P., Flint H.J. (2009) FEMS Microbiol. Lett., **294**, 1-8.
- Gerard P. (2014) Pathogens, **3**(1), 14-24.
- Fang H., Kang J., Zhang D. (2017) Microb. Cell Fact, **16**, 15. DOI: 10.1186/s12934-017-0631-y
- Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.-M. et al. (2011) Nature, **473**(7346), 174-180.
- Wang B., Yao M., Lv L., Ling Z., Li L. (2017) Engineering **3**(1), 71-82.
- Manichanh C., Rigottier-Gois L., Bonnaud E., Gloux K., Pelletier E., Frangeul L., Nalin R., Jarrin C., Chardon P., Marteau P., Roca J., Dore J. (2006) Gut, **55**, 205-211.
- Lepage P., Haesler R., Spehlmann M.E., Rehman A., Zvirbliene A., Begun A., Ott S., Kupcinskas L., Dore J., Raedler A., Schreiber S. (2011) Gastroenterology, **141**, 227-236.
- Gianchecchi E., Fierabracci A. (2017) Immunol. Res., **65**, 242-256.
- de Groot P.F., Frissen M.N., de Clercq N.C., Nieuwdorp M. (2017) Gut Microbes, **8**(3), 253-267.
- Borody T.J., Khoruts A. (2012) Nature Rev. Gastroenterol. Hepatol., **9**, 88-96.
- Milani C., Ticinesi A., Gerritsen J., Nounvenne A., Lugli G.A., Mancabelli L., Turroni F., Duranti S., Mangifesta M., Viappiani A., Ferrario C., Maggio M., Lauretani F., de Vos W., van Sinderen D., Meschi T., Ventura M. (2016) SciRep, **6**, 25945. DOI: 10.1038/srep25945
- Manichanh C., Borruel N., Casellas F., Guarner F. (2012) Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol., **9**, 599-608.
- Kim K.O., Gluck M. (2019) Clin. Endosc., **52**, 137-143.
- GUIDANCE DOCUMENT Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat *Clostridium difficile* Infection Not Responsive to Standard Therapies, 2013, www.fda.gov
- Smith M., Kassam Z., Edelstein C., Burgess J., Alm E. (2014) Nat. Biotechnol., **32**, 867. DOI:10.1038/nbt.3006.
- Rossen N.G., Fuentes S., van der Spek M.J., Tijssen J., Hartman J.H.A., Duflou A., Lowenberg M., van den Brink G.R., Mathus-Vliegen E.M.H., de Vos W.M., Zoetendal E.G., D'Haens G.R., Ponsioen C.Y. (2015) Gastroenterology, **149**(1), 110-118.
- Suskind D.L., Brittnacher M.J., Wahbeh G., Shaffer M.L., Hayden H.S., Qin X., Singh N., Damman C.J., Hager K.R., Nielson H., Miller S.I. (2015) Inflamm. Bowel Dis., **21**(3), 556-563.
- Borody T.J., Brandt L.J., Paramsothy S. (2014) Curr. Opin. Gastroenterol., **30**, 97-105.
- Kang D.-W., Adams J.B., Gregory A.C., Borody T., Chittick L., Fasano A., Khoruts A., Geis E., Maldonado J., McDonough-Means S., Pollard E.L., Roux S., Sadowsky M.J., Schwarzbach Lipson K., Sullivan M.B., Caporaso G.J., Krajmalnik-Brown R. (2017) Microbiome, **5**, 10. DOI: 10.1186/s40168-016-0225-7.
- Evrensel A., Ceylan M.E. (2011) Clin. Psychopharmacol. Neurosci., **14**(3), 231-237.
- Ananthaswamy A. (2011) New Sci., **209**, 8-9.
- Buffie C.G., Bucci V., Stein R.R., McKenney P.T., Ling L., Gobourne A., No D., Liu H., Kinnebrew M., Viale A., Littmann E., van den Brink M.R.M., Jenq R.R., Taur Y., Sander C., Cross J., Toussaint N.C., Xavier J.B., Pamer E.G. (2015) Nature, **517**(7533), 205-208.
- Kump P., Wurm P., Gröchenig H.P., Wenzl H., Petritsch W., Halwachs B., Wagner M., Stadlbauer V., Eherer A., Hoffmann K.M., Deutschmann A., Reicht G., Reiter L., Slawitsch P., Gorkiewicz G., Högenauer C. (2018) Aliment Pharmacol. Ther., **47**(1), 67-77.
- Gerding D.N., Meyer T., Lee C., Cohen S.H., Murthy U.K., Poirier A., van Schooneveld T.C., Pardi D.S., Ramos A., Barron M.A., Chen H., Villano S. (2015) JAMA, **313**(17), 1719-1727.
- Wong J.M.W., de Souza R., Kendall C.W.C., Emam A., Jenkins D.J.A. (2006) Clin. Gastroenterol., **40**, 235-243.
- Morrison D.J., Preston T. (2016) Gut Microbes, **7**, 189-200.
- Koh A., de Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Bäckhed F. (2016) Cell, **165**, 1332-1345.
- Louis P., Hold G.L., Flint H.J. (2014) Nat. Rev. Microbiol., **12**, 661-672.
- Cummings J.H., Pomare E.W., Branch W.J., Naylor C.P., Macfarlane G.T. (1987) Gut, **28**(10), 1221-1227.
- Holscher H.D., Faust K.L., Czerkies L.A., Litov R., Ziegler E.E., Lessin H., Hatch T., Sun S., Tappenden K.A. (2012) J. Parenteral Enteral Nutr., **36**(1 Suppl), 95S-105S.
- Щербakov П.Л., Белова Н.Д., Генерозов Э.В., Жгун Е.С., Иванова О.И., Ильина Е.Н., Калачнюк Т.Н., Павленко А.В., Подгорский В.В., Манолов А.И., Маторин Р.И., Олехнович Е.И., Щербак М.Ю. (2019) Доктор.Ру., **3**(158), 40-46. [Scherbakov P.L., Belova N.D., Genozov E.V., Zhgun E.S., Ivanova O.I., Ilyina E.N., Kalachnyuk T.N., Pavlenko A.V., Podgorskiy V.V., Manolov A.I., Matorin R.I., Olekhovich E.I., Scherbakova M.Yu. (2019) Doctor.Ru., **3**(158), 40-46].
- Luu M., Pautz S., Kohl V., Singh R., Romero R., Lucas S., Hofmann J., Raifer H., Vachharajani N., Carrascosa L.C., Lamp B., Nist A., Stiewe T., Shaul Y., Adhikary T., Zaiss M.M., Lauth M., Steinhoff U., Visekruna A. (2019) Nat. Commun., **10**(760), 1-11.
- Donohoe D.R., Garge N., Zhang X., Sun W., O'Connell T.M., Bunger M.K., Bultman S.J. (2011) Cell Metab., **13**(5), 517-526.
- Gerard E., Kaiko G.E., Ryu S.H., Koues O.I., Collins P.L., Solnica-Krezel L., Pearce E.J., Pearce E.L., Olt E.M., Stappenbeck T.S. (2016) Cell, **165**(7), 1708-1720.
- James A.T., Martin A.J.P. (1952) Biochem. J., **50**, 679-690.
- Primec M., Micetic-Turk D., Langerholc T. (2017) Anal. Biochem., **526**, 9-21.
- Lackner H., Doering G., Carre K. (1974) Forensic Sci., **4**(3), 219-231.

41. Beckonert O., Keun H.C., Ebbels T.M.D., Bundy J., Holmes E., Lindon J.C., Nicholson J.K. (2007) *Nature Protocols*, **2**, 2692-2703.
42. Bjerrum J.T., Wang Y., Hao F., Coskun M., Ludwig C., Gunther U., Nielsen O.H. (2015) *Metabolomics*, **11**, 122-133.
43. Deda O., Gikalan H.G., Wilson D., Theodoridis G.A. (2015) *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **113**, 137-150.
44. Lloyd-Price J., Arze C., Ananthakrishnan A.N., Schirmer M., Avila-Pacheco J., Poon T.W., Andrews E., Ajami N.J., Bonham K.S., Brislawn C.J. et al. (2019) *Nature*, **569**, 655-662.
45. Nusbaum D.J., Sun F., Ren J., Zhu Z., Ramsy N., Pervolarakis N., Kunde S., England W., Gao B., Fiehn O., Michail S., Whiteson K. (2018) *FEMS Microbiology Ecology*, **94**(9), 1-10.
46. de Preter V., Machiels K., Joossens M., Arijis I., Matthys C., Vermeire S., Rutgeerts P., Verbeke K. (2015) *Gut*, **64**(3), 447-458.

Поступила в редакцию: 03. 02. 2020.  
После доработки: 05. 04. 2020.  
Принята к печати: 13. 04. 2020.

## EVALUATION OF METABOLITES LEVELS IN FECES OF PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASES

**E.S. Zhgun\*, Y.V. Kislun, T.N. Kalachniuk, V.A. Veselovsky, A.S. Urban,  
P.O. Tikhonova, A.V. Pavlenko, G.N. Ilchenko, E.N. Ilina**

Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,  
1a Malaya Pirogovskaya, Moscow, 119435 Russia; \*e-mail: al.androva@gmail.com

Inflammatory bowel diseases (IBD), which include ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), are chronic intestinal inflammatory disorders with an unknown etiology. They are characterized by chronic recurrent inflammation of the intestinal mucosa and lead to a significant decrease in the quality of life and death of patients. IBD are associated with suppression of normal intestinal microflora, including a decrease in bacteria, producers of short chain fatty acids (SCFAs), exhibiting anti-inflammatory and protective properties. Among the various methods of intestinal microflora correction, fecal microbiota transplantation (FMT), which engrafts the fecal microbiota from a healthy donor into a patient recipient, is of a particular interest. As a result, a positive therapeutic effect is observed, accompanied by the restoration of the normal intestinal microflora of the patient. A significant drawback of the method is the lack of standardization. Metabolites produced by intestinal microflora, namely SCFAs, allow objective assessment of the functional state of the intestinal microbiota and, consequently, the success of the FMT procedure. Using gas chromatography and nuclear magnetic resonance spectroscopy techniques, we have analyzed concentrations and molar ratios of SCFAs in fecal samples of 60 healthy donors. Results were in good accord when comparing two methods as well as with published data. Analysis of SCFAs in feces of patients with UC (19 patients) and CD (17 patients) revealed a general decrease in the concentration of fatty acids in the experimental groups with significant fluctuations in the values in experimental groups compared to control group of healthy donors. On the limited group of IBD patients (6 patients with UC and 5 patients with CD) concentration of SCFAs before and within 30 days of observation after FMT was determined. It was shown that FMT had a significant impact on the SCFAs levels within 1 month term; tendency to reach characteristics of healthy donors is unambiguously traced for both diseases.

**Key words:** fecal microbiota transplantation; inflammatory bowel diseases; short-chain fatty acids

Received: 03.02.2020, revised: 05.04.2020, accepted: 13.04.2020.