

О. Н. Минушкин, М. Д. Ардатская

ВОЗМОЖНОСТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИЗУЧЕНИЯ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ПРИ ПАТОЛОГИИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА НА ПРИМЕРЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ КИШЕЧНИКА И ОРГАНОВ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ

Учебно-научный центр Медицинского центра Управления делами Президента РФ, Москва

Диагностика различной патологии желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) основана на совокупности данных клинико-инструментальных исследований, среди которых главенствующую роль играют инвазивные методы. Диагноз синдрома раздраженной кишки (СРК) является диагнозом исключения [8]. Приоритетным методом диагностики и оценки эффективности проводимого лечения неспецифического язвенного колита (НЯК) является эндоскопическое исследование с морфологическим изучением биоптата, а определение и прогнозирование резистентности к лечению требует введения более трудоемких и дорогостоящих методов исследования [6]. Заболевания печени и их осложнения на ранних стадиях верифицируются при использова-

нии инвазивных методов исследования (например, биопсия печени, измерение давления в портальной системе) либо диагностируются на поздних стадиях болезни [14]. Несмотря на то что новые препараты различных фармакологических групп, используемые для лечения патологии ЖКТ, обладают высокой лекарственной активностью, их клиническая эффективность не превышает 70–75%. Это связано с чисто нозологическим подходом к назначению терапии, а не с индивидуальным подходом к выбору фармакологических средств.

Учитывая функциональную сущность резидентной микрофлоры, а также участие ее метаболитов, в частности короткоцепочечных жирных кислот (КЖК), в обеспечении локальных и системных функций макроорга-

низма, можно полагать, что изучение КЖК может быть использовано в диагностике и мониторинге патологии ЖКТ, а также в индивидуальном подборе лечения.

Существующие методы исследования метаболитов микрофлоры [14] способны дать быстрый результат. В последнее время широкое распространение получили методы хроматографического исследования: газожидкостная и ионная хроматография [11]. Однако первый метод исследования требует трудоемкой пробоподготовки с потерей 20% общего пульпа КЖК, характеризуется неудовлетворительным разделением изомеров кислот; второй — предусматривает использование дорогостоящих приборов. Первоочередной задачей в настоящее время является разработка скринингового метода оценки состояния микробиоценоза, обладающего высокой разрешающей способностью, низкой себестоимостью исследования, быстрой получения ответа и способного стать тест-контролем эффективности проводимой терапии.

Таким образом, рассмотрение поставленных выше вопросов будет проводиться исходя из следующих позиций:

1. Необходимости разработки методики газожидкостного хроматографического анализа (ГЖХ) для изучения КЖК в различных биосубстратах.

2. Необходимости изучения возможности использования определения КЖК методом ГЖХ для:

- диагностики патологии кишечника и подбора индивидуального лечения;

- диагностики и мониторинга патологии печени, ее осложнений и оценки эффективности проводимого лечения;

- диагностики и мониторинга заболеваний билиарной системы.

Была разработана методика ГЖХ для изучения КЖК в различных биосубстратах [1], которая складывается из двух этапов: процесса пробоподготовки и непосредственно ГЖХ. В качестве эталонов в работе использовав-

ны коммерческие кислоты: уксусная, пропионовая, масляная, изомасляная, валериановая, изовалериановая, капроновая, изокапроновая.

Анализ образца методом ГЖХ проводился на хроматографе с детектором ионизации в пламени с использованием кварцевой капиллярной колонки длиной 25 м, внутренним диаметром 0,3 мм, с неподвижной фазой типа FFAP. Режим работы — изотермический с температурой термостата 140°C, температурой испарителя и детектора 230°C. Газ-носитель — гелий, давление на входе в колонку 1,8 атм. Расход газа-носителя 2 мл/мин, водорода 25 мл/мин, воздуха 300 мл/мин. Время анализа 15 мин.

Процесс пробоподготовки исследуемых образцов включал: отбор образца в стерильную пробирку, его взвешивание (масса образца около 2 г), гомогенизацию в 3 мл дистilledированной воды и 2 мл внутреннего стандарта (α,α -диметилмасляной кислоты) и 2 мл 1 н. раствора соляной кислоты и центрифугирование (7000 об/мин в течение 10 мин).

Затем микрошипцием вводили пробы исследуемого образца объемом 1 мкл в испаритель хроматографа. Данный объем был установлен в результате контрольной работы. Из полученных хроматограмм содержание отдельной кислоты (в мг на 1 г образца) определяли по формуле:

$$P_{\text{П}} = P^* \cdot S_{\text{П}} \cdot K_{\text{П}} / S^* \cdot P_0,$$

где P^* — масса внутреннего стандарта в анализируемом образце, мг; $S_{\text{П}}$ — площадь пика анализируемой кислоты; S^* — площадь пика внутреннего стандарта, P_0 — масса анализируемого образца, мг; $K_{\text{П}}$ — весовые поправочные коэффициенты: K_2 (уксусная кислота) = 2,54 (\pm 0,01); K_3 (пропионовая кислота) = 1,55 (\pm 0,01); K_4 (масляная и изомасляная кислоты) = 1,19 (\pm 0,01); K_5 (валериановая и изовалериановая кислоты) = 1,08 (\pm 0,01).

Таблица 1

Абсолютное содержание КЖК C_2-C_6 (в мг/г) в фекалиях у больных исследуемых групп и у практически здоровых лиц

Группа	C_2	C_3	$isoC_4$	C_4	$isoC_5$	C_5	$isoC_6$	C_6	Сумма
Норма	5,88 \pm 1,22	1,79 \pm 0,55	0,25 \pm 0,11	1,72 \pm 0,55	0,4 \pm 0,15	0,34 \pm 0,12	0,01 \pm 0,011	0,14 \pm 0,06	10,51 \pm 2,5
СРК-3	3,48 \pm 1,12	0,95 \pm 0,13	0,196 \pm 0,11	0,84 \pm 0,12	0,34 \pm 0,11	0,17 \pm 0,11	0,019 \pm 0,01	0,001 \pm 0,001	6,183 \pm 1,12
СРК-Д	10,95 \pm 1,42	4,168 \pm 1,12	0,403 \pm 0,13	2,89 \pm 0,63	0,69 \pm 0,11	0,69 \pm 0,20	0,033 \pm 0,01	0,052 \pm 0,02	19,87 \pm 3,61
НЯК, форма:									
дисталь- левосто- ронняя	5,38 \pm 1,14	2,32 \pm 0,79	0,29 \pm 0,11	2,39 \pm 0,61	0,56 \pm 0,12	0,36 \pm 0,11	0,01 \pm 0,011	0,11 \pm 0,03	11,43 \pm 1,5
тоталь- ная	4,95 \pm 1,25	1,74 \pm 0,65	0,15 \pm 0,09	2,31 \pm 0,55	0,35 \pm 0,11	0,29 \pm 0,12	0,06 \pm 0,02	0,17 \pm 0,04	10,03 \pm 2,1
НЯК, степень ак- тивности:									
I	6,19 \pm 1,25	2,28 \pm 0,61	0,14 \pm 0,09	2,49 \pm 0,25	0,19 \pm 0,26	0,29 \pm 0,11	0,003 \pm 0,002	0,19 \pm 0,05	11,79 \pm 1,5
II	4,45 \pm 1,15	2,28 \pm 0,58	0,18 \pm 0,12	2,51 \pm 0,23	0,48 \pm 0,17	0,23 \pm 0,11	0,002 \pm 0,001	0,08 \pm 0,03	10,21 \pm 1,7
III (эн- доско- пиче- ская)	6,29 \pm 1,31	2,47 \pm 0,55	0,41 \pm 0,15	3,14 \pm 0,34	0,72 \pm 0,23	0,49 \pm 0,15	0,052 \pm 0,015	0,14 \pm 0,05	13,72 \pm 2,1
XГ	7,27 \pm 1,92	2,72 \pm 0,18	0,37 \pm 0,07	3,31 \pm 0,11	0,71 \pm 0,1	0,55 \pm 0,05	0,012 \pm 0,01	0,25 \pm 0,004	15,19 \pm 1,78
ЦП	6,304 \pm 1,17	3,031 \pm 0,91	0,310 \pm 0,09	2,57 \pm 0,61	0,42 \pm 0,14	0,538 \pm 0,13	0,033 \pm 0,01	0,04 \pm 0,001	13,23 \pm 2,32
ЖКБ	7,309 \pm 1,02	3,104 \pm 0,65	0,336 \pm 0,08	2,601 \pm 0,3	0,61 \pm 0,09	0,509 \pm 0,14	0,003 \pm 0,01	0,012 \pm 0,01	14,48 \pm 1,8

Примечание. Здесь и в табл. 2 $\bar{X} \pm m$ для $p < 0,05$.

Продолжение статьи см. на с. 31.

Таблица 2

Абсолютное содержание C_2-C_6 (в мг/г) в сыворотке крови у больных исследуемых групп и у практически здоровых лиц

Группа	C_2	C_3	$isoC_4$	C_4	$isoC_5$	C_5	$isoC_6$	C_6	Сумма
Норма	$0,164 \pm 0,01$	$0,013 \pm 0,004$	$0,002 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,002$	$0,004 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,001$	$0,195 \pm 0,02$
ХГ	$0,285 \pm 0,011$	$0,017 \pm 0,004$	$0,003 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,002$	$0,006 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	$0,32 \pm 0,08$
ЦП	$0,235 \pm 0,011$	$0,019 \pm 0,003$	$0,007 \pm 0,002$	$0,009 \pm 0,002$	$0,007 \pm 0,002$	$0,003 \pm 0,002$	$0,002 \pm 0,001$	$0,002 \pm 0,001$	$0,29 \pm 0,08$
ЖКБ	$0,192 \pm 0,018$	$0,012 \pm 0,003$	$0,004 \pm 0,001$	$0,007 \pm 0,001$	$0,005 \pm 0,001$	$0,003 \pm 0,002$	$0,004 \pm 0,003$	$0,004 \pm 0,002$	$0,221 \pm 0,012$

Достоверность методики подтверждена в контрольных опытах на модельных смесях кислот. Ошибка не превышала 2–4%. Чувствительность методики $96 \pm 2\%$. Воспроизводимость результатов $98 \pm 2\%$. Определение КЖК методом ГЖХ обладает более высокой воспроизводимостью результатов по сравнению с бактериологическим исследованием ($\chi^2 = 6,56$ для $p < 0,05$, DF = 4 и $\chi^2 = 3,74$ для $p < 0,05$, DF = 4 соответственно).

В дальнейшем методика была модифицирована и легла в основу патента № 2145511 "Способ разделения смеси жирных кислот фракции C_2-C_7 методом газожидкостной хроматографии" от 20.02.00 [9].

Для оценки возможностей данного методического подхода — изучения КЖК методом ГЖХ и составления соответствующей базы данных было обследовано 350 больных с различной патологией кишечника и печени, из них 95 больных с различными вариантами синдрома раздраженного кишечника (СРК с преобладанием запоров — СРК-3 и с преобладанием диареи — СРК-Д, согласно Римским критериям II, 1999), 85 больных с НЯК различной протяженности, активности воспаления (по S. C. Truelove, 1981) и степени тяжести; 58 больных с хроническим гепатитом (ХГ) (вирусной В и С, алиментарной, смешанной этиологии), 85 больных с хроническим гепатитом различной этиологии в стадии цирроза печени (ЦП), 30 больных с желчно-каменной болезнью (ЖКБ). Контрольную группу составили 60 практически здоровых лиц.

Все больные были обследованы по полной программе, включающей современные клинико-лабораторные и инструментальные методы исследования.

Методом ГЖХ были исследованы КЖК (C_2 — уксусная, C_3 — пропионовая, iC_4 — изомасляная, C_4 — масляная, iC_5 — изовалериановая, C_5 — валериановая, iC_6 — изокапроновая и C_6 — капроновая кислоты) в кале и сыворотке крови.

Результаты исследования абсолютного содержания КЖК в кале и сыворотке крови у больных исследуемых групп представлены в табл. 1 и 2. Однако по результатам работы мы выявили, что достоверными параметрами нозологической принадлежности, оценки эффективности проводимой терапии и ее индивидуального подбора являются и расчетные показатели:

— профили кислот C_2-C_4 (отношение доли каждой отдельной кислоты к суммарному содержанию уксусной, пропионовой и масляной кислот);

— анаэробные индексы — АИ (отношение суммы пропионовой и масляной кислот к уксусной кислоте);

— отношение отдельных и суммарного количества изокислот к кислотам с неразветвленной цепью ($\Sigma iC_n / \Sigma C_n$, iC_4/C_4 , iC_5/C_5);

— суммарное относительное содержание $\Sigma(C_3 + isoC_4 + \dots + C_6)$, кислот с длиной углеродной цепи более 4 атомов ($\Sigma(isoC_4 + C_4 + \dots + C_6)$, изокислот $\Sigma(isoC_n)$).

По результатам работ [2, 4, 5], посвященных изучению состава и спектра КЖК в кале у больных с патологией кишечника, нами были выявлены опорные диагностические критерии. Установлено (для $p < 0,05$), что:

— в норме профиль кислот с числом углеродных атомов C_2-C_4 составляет: доля уксусной кислоты

$0,634 \pm 0,004$ ед., доля пропионовой кислоты $0,189 \pm 0,003$ ед. и доля масляной кислоты $0,176 \pm 0,003$ ед. при значениях АИ $-0,576 \pm 0,012$ ед.; отношения изомеров кислот к кислотам составляют: $EiCn/Cn$ $0,430 \pm 0,04$ ед., iC_4/C_4 $0,197 \pm 0,03$ ед., iC_5/C_5 $1,471 \pm 0,13$ ед. (рис. 1);

— при СРК-Д в профиле кислот C_2-C_4 отмечается равнодолевое повышение доли пропионовой кислоты ($0,249 \pm 0,003$ ед.) и доли масляной кислоты ($0,183 \pm 0,003$ ед.) при снижении доли уксусной ($0,568 \pm 0,01$ ед.), что отражается на отклонении АИ в резко отрицательную область до $-0,757 \pm 0,009$ ед.;

— при СРК-З в профиле кислот C_2-C_4 отмечается повышение доли уксусной кислоты ($0,689 \pm 0,002$ ед.) при снижении доли пропионовой ($0,169 \pm 0,002$ ед.) и масляной кислоты ($0,153 \pm 0,002$ ед.), что отражается на отклонении АИ в слабоотрицательную область до $-0,469 \pm 0,002$ ед.;

— отношения содержания отдельных изомеров кислот к кислотам ($\Sigma iC_n/C_n$, iC_4/C_4 , iC_5/C_5) при СРК-З имеют повышенные значения по сравнению с нормой ($EiCn/Cn = 0,719 \pm 0,01$ ед., $iC_4/C_4 = 0,337 \pm 0,03$ ед., $iC_5/C_5 = 2,83 \pm 1,02$ ед.); противоположное изменение данных параметров констатировано при СРК-Д ($EiCn/Cn = 0,299 \pm 0,01$ ед., $iC_4/C_4 = 0,135 \pm 0,03$ ед., $iC_5/C_5 = 0,871 \pm 0,12$ ед.);

— рассчитанные молярные соотношения суммы свободных КЖК и их солей $[\Sigma(R^-H^+)/\Sigma(R^-Na^+)]$ в норме составляют 2:1, при СРК-З — 1:1, при СРК-Д — 1:1, т. е. в норме на 2 молекулы свободных КЖК приходится 1 молекула натриевой соли КЖК, при СРК-З и СРК-Д — на 1 молекулу свободных КЖК — 1 молекула соли КЖК ($p < 0,05$ при сравнении с нормой).

Состав КЖК при НЯК отличается от такового у здоровых лиц и у больных СРК:

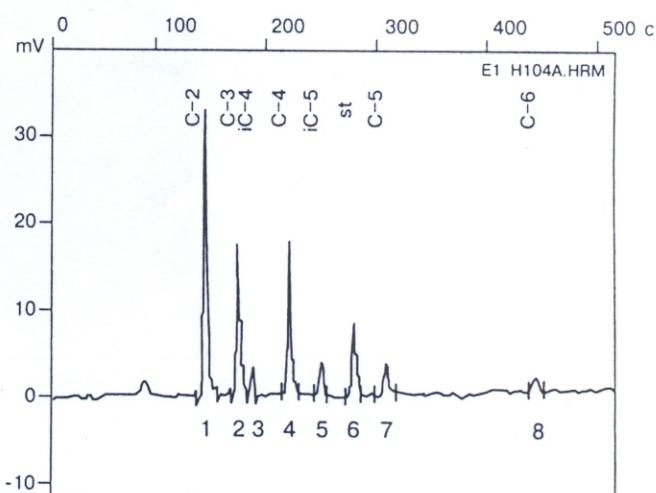


Рис. 1. Хроматограмма разделения КЖК в кале.

Пациент А., 30 лет. Практически здоров. Нормальное содержание КЖК в кале.

- при дистальном поражении в профиле C_2-C_4 повышены доли пропионовой ($0,218 \pm 0,005$ ед.) и масляной кислот ($0,217 \pm 0,002$ ед.);
- при левостороннем поражении в профиле C_2-C_4 повышены доли масляной ($0,239 \pm 0,003$ ед.) и пропионовой кислот ($0,197 \pm 0,004$ ед.);
- при тотальном поражении в профиле C_2-C_4 увеличена доля пропионовой кислоты ($0,242 \pm 0,004$ ед.) при меньшем увеличении масляной кислоты ($0,232 \pm 0,006$ ед.) на фоне снижения доли уксусной кислоты ($0,523 \pm 0,002$ ед.);
- эти изменения отражаются в резком отклонении значений АИ в более отрицательную область по мере распространения НЯК: от $-0,820 \pm 0,012$ ед. при дистальном поражении, $-0,847 \pm 0,012$ ед. при левостороннем поражении и до $-0,958 \pm 0,012$ при тотальном поражении;

— при I степени активности профиль масляной кислоты $0,220 \pm 0,003$ ед., отношение изокислот к кислотам с неразветвленной цепью $EiCn/Cn$ $0,174 \pm 0,01$ ед., iC_4/C_4 $0,093 \pm 0,03$ ед., iC_5/C_5 $0,975 \pm 0,15$ ед.;

— при II степени активности профиль масляной кислоты $0,228 \pm 0,003$ ед., отношение изокислот к кислотам с неразветвленной цепью $EiCn/Cn$ $0,441 \pm 0,019$ ед., iC_4/C_4 $0,139 \pm 0,03$ ед., iC_5/C_5 $2,972 \pm 0,19$ ед.;

— при III степени активности профиль масляной кислоты $0,255 \pm 0,006$ ед., отношение изокислот к кислотам с неразветвленной цепью $EiCn/Cn$ $0,485 \pm 0,021$ ед., iC_4/C_4 $0,15 \pm 0,02$ ед., iC_5/C_5 $4,443 \pm 1,53$ ед.

Данные критерии принимаются в качестве исходных для оценки эффективности проводимой терапии. Изменение показателей в процессе лечения в сторону нормальных величин свидетельствует об эффективности проводимого лечения. Ретроспективный анализ уровня КЖК на фоне положительного ответа на проводимую терапию позволяет обосновать индивидуальный выбор фармакологического средства для повышения эффективности лекарственного воздействия. Установлено, что у больных с СРК-Д:

— энтеросан¹ оказывает более выраженное положительное действие с исходно разнодолевым увеличением пропионовой (в большей степени) и масляной кислот (в меньшей степени) ($0,340 \pm 0,010$ и $0,201 \pm 0,01$ ед. соответственно), с резким отклонением значений АИ в сторону отрицательных значений ($-1,179 \pm 0,015$ ед.) и исходно сниженных значениях индексов отношения изокислот к кислотам ($EiCn/Cn$ $0,060 \pm 0,08$ ед., iC_4/C_4 $0,028 \pm 0,09$ ед., iC_5/C_5 $0,304 \pm 0,24$ ед.);

— энтерол² оказывал более выраженное положительное действие с исходно равнодолевым увеличением пропионовой и масляной кислот ($0,249 \pm 0,006$ и $0,258 \pm 0,005$ ед. соответственно), с нерезким отклонением значений АИ в сторону отрицательных значений ($-1,029 \pm 0,014$ ед.) при незначительно сниженных значениях индексов отношения изокислот к кислотам ($EiCn/Cn$ $0,425 \pm 0,02$ ед., iC_4/C_4 $0,181 \pm 0,01$ ед., iC_5/C_5 $1,158 \pm 0,28$ ед.).

У больных СРК-З перистил³ оказывает более выраженное положительное действие с исходно нерезким повышением уксусной кислоты ($0,652 \pm 0,003$ ед.) и

равнодолевым нерезким снижением пропионовой и масляной кислот ($0,179 \pm 0,005$ и $0,169 \pm 0,002$ ед. соответственно), с незначительным отклонением АИ в сторону слабоотрицательных значений ($-0,558 \pm 0,01$ ед.) и при значительно повышенных значениях индексов отношения изокислот к кислотам ($EiCn/Cn$ $1,087 \pm 0,03$ ед., iC_4/C_4 $0,465 \pm 0,03$ ед., iC_5/C_5 $3,438 \pm 1,21$ ед.).

У больных НЯК:

— лечение препаратами 5-АСК наиболее эффективно при исходном увеличении пропионовой и масляной кислот ($0,211 \pm 0,002$ и $0,236 \pm 0,003$ ед. соответственно) и исходно сниженном отношении изокислот к кислотам ($EiCn/Cn$ $0,414 \pm 0,003$ ед., iC_4/C_4 $0,135 \pm 0,002$ ед.);

— проведение комплексной терапии 5-АСК и глюкокортикоидными гормонами наиболее оправдано при увеличении долей пропионовой и масляной кислот ($0,268 \pm 0,003$ и $0,312 \pm 0,004$ ед. соответственно), при снижении отношения суммы изокислот к кислотам и изомасляной к масляной кислоте ($EiCn/Cn$ $0,122 \pm 0,006$ ед., iC_4/C_4 $0,039 \pm 0,003$ ед. соответственно) и повышенном соотношении изовалериановой и валериановой кислот ($iC_5/C_5 = 9,219 \pm 0,004$ ед.);

— комбинированная терапия препаратами 5-АСК с метронидазолом⁴ наиболее целесообразна при исходном повышении в основном масляной кислоты ($0,312 \pm 0,004$ ед.) и повышенных значениях индексов отношения изокислот к кислотам ($EiCn/Cn$ $0,781 \pm 0,004$ ед., iC_4/C_4 $0,378 \pm 0,004$ ед., iC_5/C_5 $2,101 \pm 0,003$ ед.);

— комбинированная терапия препаратами 5-АСК с энтеросаном наиболее целесообразна при исходном повышении в основном пропионовой кислоты ($0,251 \pm 0,003$ ед.), при резко сниженных значениях отношения изокислот к кислотам ($EiCn/Cn$ $0,169 \pm 0,003$ ед., iC_4/C_4 $0,074 \pm 0,003$ ед., iC_5/C_5 $0,981 \pm 0,003$ ед.).

Вышеизложенные изменения качественного состава КЖК можно рассматривать, с одной стороны, исходя из патогенеза заболевания, а с другой — с позиций симбиоза макроорганизма и микрофлоры. Как известно, КЖК образуются в результате сбраживания моносахаридов сахаролитическими микроорганизмами. В частности, уксусная кислота продуцируется в большей степени аэробным звеном микрофлоры, пропионовая и масляная кислоты — анаэробным звеном. Изомеры кислот образуются в результате деградации экзогенных белков и полипептидов слизи различными микроорганизмами, обладающими протеолитической активностью. В своих предыдущих работах [2, 4, 5] мы подробно описывали нарушения метаболической активности анаэробно-аэробных популяций, проявляющиеся изменениями состава КЖК, где рассматривали, с одной стороны, влияние имеющейся патологии, с другой — изменение состава микрофлоры в зависимости от среды экосистемы, характера моторики кишечника при различных вариантах СРК и НЯК. Последнее подтверждается при изучении состава изомеров кислот, изменения которых можно связать как с отмечаемыми при кишечных заболеваниях ухудшениями вязкостных характеристик слизи, изменением ее количества в кишеч-

¹Энтеросан — природная смесь высушенной гомогенной массы покровной пластины мускульного желудка птицы, состоящей из застывшего секрета простых желез и покровного эпителия; оказывает бактериостатическое действие на грамположительные микроорганизмы (уменьшает процессы гниения и брожения), адсорбирующее и антитоксическое действие на enteropatогенные бактерии.

²Энтерол — лиофилизированные *Saccharomyces boulardii* 250 мг. Противодиарейный препарат биологического происхождения с противомикробным действием.

³Перистил — цизаприд 5, 10 мг. Препарат, повышающий тонус и моторику желудочно-кишечного тракта благодаря увеличению высвобождения ацетилхолина в стенке кишки на уровне мезентериального сплетения. В настоящее время считается, что перистил является агонистом серотониновых 5-HT₄-рецепторов.

⁴Метронидазол — противопротозойное средство, проявляет также активность в отношении анаэробных микроорганизмов (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*).

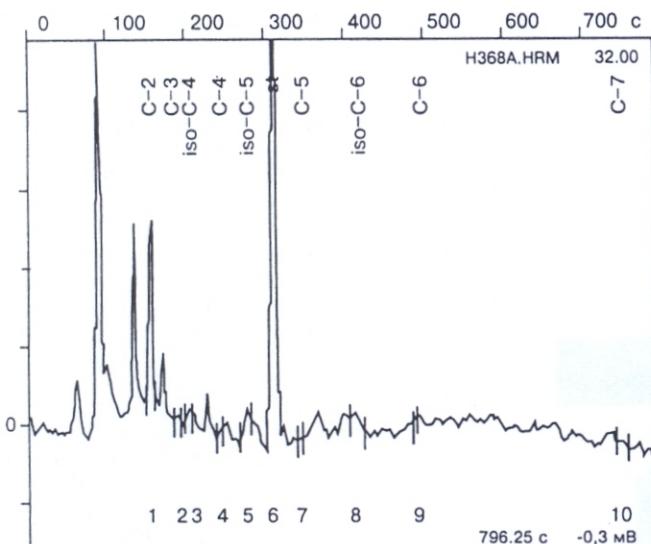


Рис. 2. Хроматограмма разделения КЖК в сыворотке крови.
Пациент И., 35 лет. Практически здоров. Нормальное содержание КЖК в сыворотке крови.

ном содержимом и муцинообразования, так и с качественным составом микроорганизмов. При СРК-З отмечается усиление метаболической активности аэробной микрофлоры, которая, как известно, обладает наибольшей протеолитической активностью (кишечные палочки, фекальные стрептококки, некоторые бациллы рассматриваются как сильнейшие протеолитики). При СРК-Д и НЯК активно метаболизируют некоторые виды анаэробов. Однако при СРК-Д наиболее активны бактероиды: *fragilis*, *ruminocola*, *melaninogenicus*, при НЯК — клостридиальная флора. И только оценка трех составных частей, а именно вклада основного заболевания, изменения метаболической активности самой микрофлоры и механизма действия фармакологического препарата, позволяет приблизиться к индивидуальному подбору лечения больных с патологией кишечника, предложенному нами выше.

Необходимо отметить, что при использовании того или иного фармакологического препарата необходимо учитывать его прямое действие на состояние внутрипросветной среды в толстой кишке, а также опосредованные воздействия, приводящие к нормализации качественного состава микроорганизмов. Так, в наших исследованиях по оценке клинической эффективности препаратов при СРК были использованы препараты, относящиеся к группе пробиотиков (энтеросан, энтерол), а также к группе прокинетиков (перистил). Первые являются препаратами, непосредственно воздействующими на микрофлору. Перистил такой способностью не обладает. Однако устранение моторно-эвакуаторных расстройств кишечника, по нашему мнению, приводит к изменению внутриполостного окислительно-восстановительного потенциала и естественной де-контаминации условно-патогенной микрофлоры. Нормализация среды обитания приводит к активизации метаболизма и увеличению численности облигатной микрофлоры, что в свою очередь влияет на преэпителиальный и эпителиальный барьер защиты кишечной стенки с изменением чувствительности рецепторного аппарата кишечника. Как свидетельствуют полученные нами результаты, данный подход позволяет оптимизировать схемы лечения для предотвращения полипрагмазии и достижения адекватного терапевтического эффекта.

Методом ГЖХ были исследованы КЖК в сыворотке крови у больных с патологией печени и в норме [3,

11] (см. табл. 2). При этом получены следующие данные:

А. В норме доля уксусной кислоты составила $0,902 \pm 0,007$ ед., доля пропионовой кислоты $-0,071 \pm 0,004$ ед. и масляной кислоты $-0,027 \pm 0,003$ ед., относительное содержание высших кислот ($C_3 +$ изо $C_4 + \dots + C_6$) $0,158 \pm 0,006$ ед., сумма кислот с длиной углеродной цепи более 4 атомов (изо $C_4 + C_4 + \dots + C_6$) $0,091 \pm 0,041$ ед., сумма изокислот (Σ изоСn) $0,040 \pm 0,007$ ед. (рис. 2).

Б. У лиц с патологией печени исследование КЖК может быть использовано:

— для оценки детоксицирующей функции печени, при этом для ХГ характерно повышение доли уксусной кислоты до $0,9345 \pm 0,007$ ед. при снижении доли пропионовой до $0,055 \pm 0,004$ ед. и масляной кислоты до $0,011 \pm 0,003$ ед., для ЦП — снижение доли уксусной кислоты до $0,889 \pm 0,008$ ед. при увеличении доли пропионовой до $0,076 \pm 0,004$ ед. и масляной кислоты до $0,035 \pm 0,003$ ед.;

— при портосистемном шунтировании у больных с ЦП, для которого характерно повышение значений суммарного относительного содержания ($C_3 +$ изо $C_4 + \dots + C_6$) до $0,201 \pm 0,009$ ед., суммы кислот с длиной углеродной цепи более 4 атомов (изо $C_4 + C_4 + \dots + C_6$) до $0,125 \pm 0,009$ ед., суммы изокислот (Σ изоСn) до $0,075 \pm 0,008$ ед.;

— для диагностики печеночной энцефалопатии (ПЭ), при которой значения относительного содержания высших кислот ($C_3 +$ изо $C_4 + \dots + C_6$), суммы кислот с длиной углеродной цепи более 4 атомов (изо $C_4 + C_4 + \dots + C_6$), суммы изокислот (Σ изоСn) в сыворотке крови у больных с ЦП коррелируют ($R^2 = 0,88$) со стадией ПЭ; происходит пропорциональное увеличение значений абсолютного (и относительного) суммарного содержания ($C_3 +$ изо $C_4 + \dots + C_6$) в сыворотке крови от $0,041 \pm 0,002$ ($0,182 \pm 0,002$) при субклинической стадии ПЭ до $0,098 \pm 0,005$ ($0,282 \pm 0,004$) при IV стадии ПЭ; суммы кислот с длиной углеродной цепи более 4 атомов (изо $C_4 + C_4 + \dots + C_6$) от $0,030 \pm 0,002$ ($0,141 \pm 0,002$) при субклинической стадии ПЭ до $0,059 \pm 0,002$ ($0,172 \pm 0,004$) при IV стадии ПЭ, суммы изокислот (Σ изоСn) от $0,011 \pm 0,001$ ($0,055 \pm 0,001$) при субклинической стадии ПЭ до $0,038 \pm 0,003$ ($0,111 \pm 0,003$) при IV стадии ПЭ;

— в оценке эффективности проводимой терапии по поводу ПЭ. Изменение данных показателей в процессе лечения в сторону нормализации исходных величин свидетельствует об эффективности проводимого лечения.

Нам представляется, что полученные данные свидетельствуют о вкладе абсорбированных КЖК в биохимические процессы макроорганизма. Как известно, пропионовая кислота является одним из промежуточных субстратов окисления жирных кислот, а масляная кислота вовлекается в биосинтез жирных кислот и холестерина. Пропионовая кислота также служит субстратом для образования в печени пропионил-КоА и/или метилмалонил-КоА, выполняющих регуляторные функции в углеводном и липидном обмене организма хозяина. Уксусная кислота, являясь субстратом для образования ацетил-КоА, вовлекается в цикл Кребса, обеспечивающий энергетические потребности клетки. Полученные данные и биохимические процессы, обсуждавшиеся выше, позволяют приблизиться к более тонкому пониманию изменения функциональной состоятельности печени.

Наиболее распространенная на сегодня патогенетическая модель ПЭ — "гипотеза глии". Печеночно-клеточная недостаточность и/или портосистемное шунтирование приводят к развитию аминокислотного дисба-

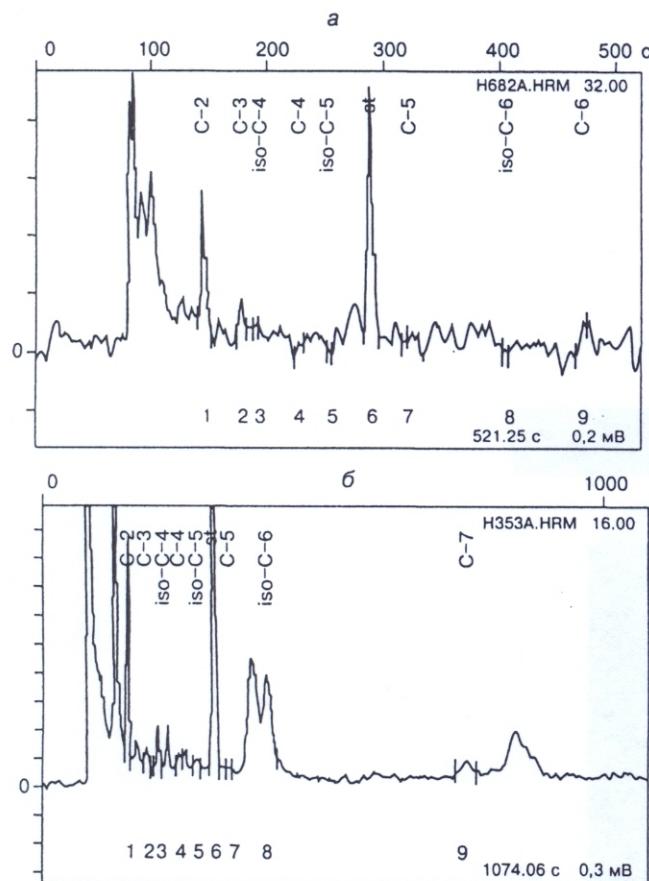


Рис. 3. Хроматограмма разделения КЖК в сыворотке крови.

Больная Г., 44 лет. Хронический гепатит в стадии цирроза печени алкогольной этиологии, класс С по Чайлдс-Пью. Динамическое наблюдение: а — III стадия печеночной энцефалопатии, б — IV стадия печеночной энцефалопатии.

ланса и увеличению содержания в крови эндогенных нейротоксинов, что вызывает отек и функциональные нарушения астроглии в связи с повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), изменением активности ионных каналов, нарушением процессов нейротрансмиссии и обеспечения нейронов энергией АТФ, что клинически проявляется симптомами ПЭ. Данные, приведенные выше, позволяют использовать КЖК в диагностике и в мониторинге ПЭ. Динамическое исследование КЖК в сыворотке периферической крови у больного в терминальной стадии ЦП с развитием комы и посмертное исследование церебральной жидкости (представлено на рис. 3, а, б) позволяет констатировать снижение исходно повышенных концентраций КЖК (ПЭ III и IV стадии) в сыворотке периферической крови и установление высоких концентраций этих метаболитов в церебральной жидкости (рис. 4, а).

Для понимания патогенетического влияния КЖК на развитие ПЭ мы провели исследования их содержания в церебральной жидкости у группы больных, умерших от другой патологии (сердечно-сосудистой и неврологической). При этом содержание КЖК в этой группе больных было достоверно ниже ($p < 0,05$) по сравнению с таковым в группе больных с ЦП (рис. 4, б). Можно предполагать двойной механизм патогенетического действия КЖК: во-первых, они в результате шунтового сброса непосредственно увеличивают токсическую нагрузку на поврежденные гепатоциты, которые в свою очередь не в состоянии метаболизировать КЖК, что увеличивает их содержание в центральном кровотоке, и, во-вторых, КЖК, преодолевая ГЭБ, могут либо оказывать прямое повреждающее действие на астроци-

ты, либо путем дестабилизации мембран астроглии потенцировать действие других токсических молекул: амиака, меркаптанов, γ -аминомасляной кислоты и других молекул, обладающих в основном большой молекулярной массой, что подтверждает гипотезу ряда авторов.

Таким образом, изучение КЖК в сыворотке крови больных с патологией печени позволяет оценить детоксицирующую функцию печени, портосистемное шунтирование у больных с ЦП, определить стадию ПЭ и оценить эффективность проводимой терапии.

Рассмотрение данного вопроса будет неполным без изучения КЖК в месте их непосредственного синтеза, в кишечном содержимом (см. табл. 1), у больных с патологией печени [10, 11, 13]. Нами установлено следующее:

- средняя суммарная концентрация КЖК в кале у больных с заболеваниями печени значительно (в 1,2–1,7 раза) повышена по сравнению с нормой; значения концентраций отдельных и суммарных КЖК в группах варьируют в широких пределах; наборы частот КЖК (профили), особенно C_2 – C_4 , в кале свидетельствуют о снижении доли уксусной кислоты и о повышении долей пропионовой и масляной кислот у больных с заболеваниями печени как у больных с ХГ, так и у больных с ЦП. Результаты изучения содержания высших кислот ($C_3 + \text{изо}C_4 + \dots + C_6$), суммы кислот с длиной углеродной цепи более 4 атомов ($\text{изо}C_4 + C_4 + \dots + C_6$) и изокислот в кале у больных с патологией печени свидетельствуют о тенденции к увеличению абсолютных и

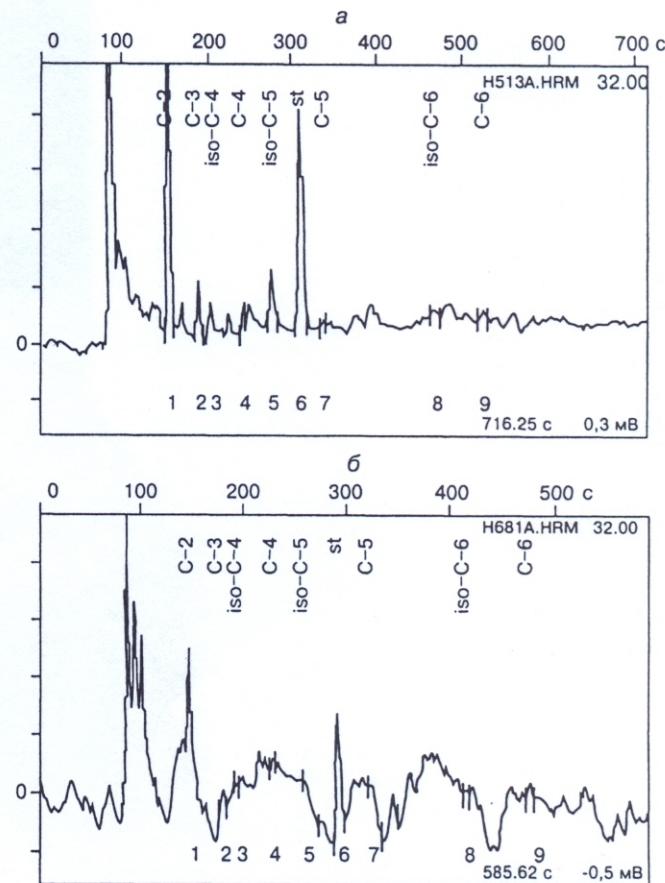


Рис. 4. Хроматограмма разделения КЖК в церебральной жидкости (посмертное исследование).

а — больной А., 56 лет. Хронический гепатит в стадии цирроза печени алкогольной этиологии, класс С по Чайлдс-Пью. Печеночная энцефалопатия IV стадии; б — больной Н., 58 лет. Острое нарушение мозгового кровообращения.

относительных концентраций вышеуказанных кислот по сравнению с нормой.

Таким образом, отсутствие достоверного изменения количественного и качественного содержания КЖК в кале подтверждает, что изменения в сыворотке крови у больных с ХГ и ЦП не могут быть связаны с увеличением продукции данных кислот микрофлорой кишечника, а в основном зависят от патологического процесса в печени. Несмотря на это, в подходе к лечению ПЭ необходимо учитывать два возможных механизма воздействия фармакологического средства: непосредственно на состояние печеночной клетки и на функциональное состояние микробной флоры. Нами проведены исследования [10, 11, 13] по оценке эффективности препаратов различных фармацевтических групп, в частности гепатосана, состоящего из лиофилизованных гепатоцитов свиньи и относящегося к группе гепатопротекторов, и дюфалака-лактулозы, невсасывающегося и неперевариваемого в тонкой кишке синтетического дисахарида, являющегося источником энергии для кишечных бактерий. Результаты работы позволили установить *in vivo* механизмы, обеспечивающие эффективность данных препаратов в лечении больных ЦП с ПЭ. Анализ изучения КЖК позволяет выделить в действии гепатосана 2 фазы: на уровне толстой кишки он дает адсорбирующий эффект, задерживая всасывание метаболитов микрофлоры толстой кишки (1-я фаза), что проявляется в увеличении абсолютного содержания КЖК и резком увеличении абсолютного и относительного содержания КЖК с числом атомов углерода в цепи более 3 и изомеров КЖК; в последующем гепатоциты разрушаются и продукты их деградации (в основном факторы роста) всасываются и действуют уже в качестве протекторов на уровне клеток печени человека (2-я фаза действия препарата), о чем свидетельствует улучшение детоксицирующей функции печени, выражющееся в формировании нормального профиля уксусной, пропионовой и масляной кислот, снижении абсолютного и относительного содержания кислот с числом углеродных атомов более 3 и изомеров КЖК в сыворотке крови. Характер изменений уровня и качественного состава КЖК в сыворотке крови больных с ЦП, у которых в комплексной терапии был использован дюфалак, был аналогичен, но за счет возрастания абсолютного и долевого участия уксусной и пропионовой кислот в кале при снижении уровня других кислот, что свидетельствует об усилении метаболической активности сахаролитических популяций бактерий.

Таким образом, у больных с патологией печени, по аналогии с полученными результатами исследования КЖК у больных с заболеваниями кишечника, необходимо принимать во внимание три основных компонента: основную патологию (ее активность и стадию), изменения метаболической активности микрофлоры и механизма действия фармакологического препарата и место его приложения (так как мы имеем дело с двумя составляющими).

Изучение КЖК может иметь определенное значение и при патологии желчевыводящей системы, так как в процессе камнеобразования участвуют желчные кислоты, а их обмен зависит от состава кишечной микрофлоры [12]. Мы установили, что у больных с ЖКБ (см. табл. 1 и 2) средняя суммарная концентрация КЖК в кале значительно повышена по сравнению с нормой за счет увеличения всех КЖК; абсолютное содержание КЖК в сыворотке крови незначительно повышено; значения концентраций отдельных и суммарных КЖК в группе варьируют в широких пределах, однако (для $p < 0,05$) имеются характерные особенности, которые необходимо учитывать в совокупности:

— в кале в профиле C_2-C_4 кислот отмечается снижение доли уксусной кислоты до $0,561 \pm 0,002$ ед. при

повышении доли пропионовой до $0,239 \pm 0,006$ ед. и масляной кислоты до $0,199 \pm 0,002$ ед.; значения АИ смещаются в область отрицательных значений до $-0,781 \pm 0,002$;

— в сыворотке крови в профиле КЖК, особенно в относительном содержании C_2-C_4 , происходит снижение доли пропионовой кислоты до $0,056 \pm 0,004$ ед. и увеличение доли масляной кислоты до $0,033 \pm 0,002$ ед. ($p < 0,05$ по сравнению с показателями при патологии печени).

Мы остановились на опорных критериях, отличающих спектр КЖК при ЖКБ. Если оценить вклад двух компонентов — состояния активности микрофлоры, с одной стороны, желчеобразования и желчевыделения, с другой стороны, можно констатировать, что изменения КЖК в кале у больных ЖКБ отражают значительное повышение количества и активности анаэробной микрофлоры, выражющееся в увеличении профилей пропионовой и масляной кислот и практически не измененном по сравнению с нормой отношении изокислот к кислотам с неразветвленной цепью. Поскольку известно, что 7-альфа-дегидроксилирование первичных желчных кислот осуществляется анаэробами, полученные нами данные свидетельствуют о повышении функциональной активности отдельных анаэробных родов микрофлоры кишечника у больных ЖКБ.

Однако считать основным компонентом камнеобразования только изменение микрофлоры неправомерно без учета нарушений обменных процессов со стороны желчеобразования и желчевыделения. Из литературы известно, что перенасыщение желчи холестерином с образованием коллоидально-нестабильной желчи является необходимым фактором камнеобразования. Наши данные подтверждают данную теорию, так как коэффициент корреляции снижения доли пропионовой кислоты в сыворотке крови и повышения уровня холестерина составляет $r = 0,75$, а коэффициент корреляции доли масляной кислоты с гиперлипидемией $r = 0,78$ свидетельствует о возможности использования данного методического подхода в диагностике отдельных форм ЖКБ.

Таким образом, совокупность опорных критериев на основании изучения КЖК в различных биосубстратах может быть использована не только для диагностики (УЗИ является более надежным диагностическим методом выявления конкрементов), сколько для проведения лечения на ранних этапах формирования камней, а также для формирования групп риска и профилактики камнеобразования при наблюдении больных с хроническим некалькулезным холециститом с исходно измененным профилем КЖК в сыворотке крови, близким к профилю ЖКБ.

Рассматривая перспективу использования метода, следует иметь в виду, что в работах последнего времени по изучению резистентных к лечению форм асцита установлен высокий процент их инфицированности [7]. Учитывая последнее, мы хотели обсудить использование изучения КЖК для диагностики стерильного асцита и бактериального асцита-перитонита при ЦП исходя из возможности заселения микрофлорой стерильных в норме полостей. Представленные хроматограммы на рис. 5, а, б демонстрируют результаты определения КЖК в асцитическом содержимом больных, страдающих ЦП. В первом случае представлено стерильное содержимое, о чем свидетельствуют уровни КЖК, сопоставимые с концентрациями КЖК в сыворотке крови ($0,36$ и $0,27$ мг/г соответственно). На второй хроматограмме определяется резко повышенное содержание КЖК в асцитической жидкости ($4,5$ мг/г), сопоставимое с концентрациями КЖК в кишечном содержимом,

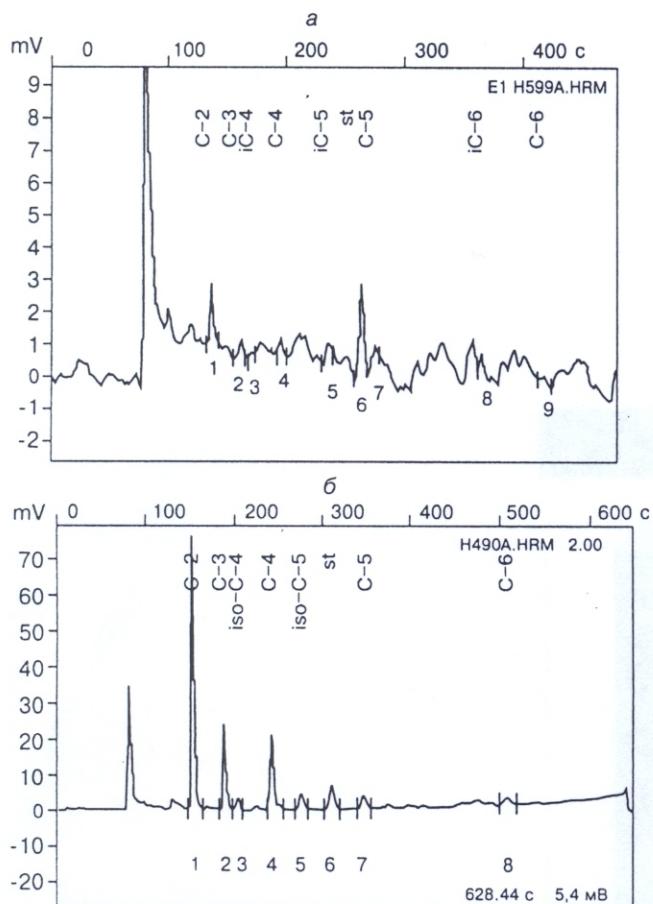


Рис. 5. Хроматограмма разделения КЖК в асцитической жидкости.

а – больная С., 43 лет. Хронический гепатит алиментарной этиологии в стадии цирроза печени. Асептический асцит; *б* – больная П., 40 лет. Хронический гепатит смешанной этиологии (вирусной и алкогольной) в стадии цирроза печени. Бактериальный асцит-перитонит.

что свидетельствует о наличии бактериального асцита-перитонита. Результаты микробиологического исследования подтвердили правильность трактовки наблюдавшегося изменения уровня КЖК: в первом случае рост микрофлоры не обнаружен, во втором случае выявлены микроорганизмы родов *Bacteroides* spp., *Clostridium*.

В настоящее время данных для обсуждения зависимости рефрактерности асцита от уровня КЖК в асцитическом содержимом недостаточно, однако мы продолжаем исследования по данному вопросу.

Таким образом, предложенный новый методический подход к изучению метаболитов микрофлоры толстой кишки в различных биосубстратах с использованием метода ГЖХ относится к простым, чувствительным, дешевым, неинвазивным методам исследования, дающим возможность получения результата в режиме реального времени. Его можно отнести к скрининговым методам диагностики и мониторинга патологии кишечника, печени и желчевыводящей системы. Изучение КЖК в

различных биологических субстратах в настоящее время позволяет оценить эффективность проводимой терапии. Мы полагаем, что в дальнейшем при накоплении данных по использованию различных групп фармакологических средств предложенный подход позволит обосновать индивидуальный выбор препарата для лечения пациентов с патологией ЖКТ. По нашему мнению, область применения данного диагностического подхода не исчерпана и не ограничивается гастроэнтерологической дисциплиной. Представляются перспективными исследования низкомолекулярных метаболитов индигенной микрофлоры в других областях клинической медицины, изучающих непосредственно заселенные биотопы человеческого организма: ротовую полость, бронхиальный и урогенитальный тракт, кожные покровы и др. Это позволит учитывать дистанционные воздействия метаболитов, а также оценить последствия заселения микрофлорой нерезидентных для данных видов биотопов и стерильных полостей. В итоге в нашем арсенале будет метод, позволяющий уточнить диагностику и подобрать индивидуальную схему лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ардатская М. Д., Прихно Н. И. // Материалы конференции молодых ученых и специалистов медицинского центра УДП РФ, посвящ. 30-летию УНЦ. — М., 1998. — С. 28–29.
2. Ардатская М. Д. // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. — 2000. — Т. 9, № 3. — С. 36–41.
3. Ардатская М. Д., Минушкин О. Н., Прихно Н. И., Дубинин А. В. // Там же. — № 5. — С. 63–70.
4. Ардатская М. Д., Арутюнян Э. Э., Минушкин О. Н. // Там же. — 2001. — Т. 12, № 6. — С. 65–70.
5. Арутюнян Э. Э., Ардатская М. Д., Минушкин О. Н. // Кремлев. медицина. — 2002. — № 1. — С. 21–25.
6. Белоусова Е. А. Резистентные формы воспалительных заболеваний кишечника: клиническая характеристика и возможности прогнозирования: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — М., 1998.
7. Буеверов А. О. // Рус. мед. журн. — 1998. — Т. 6, № 19. — С. 1264–1270.
8. Златкина А. Р. // Моторика толстой кишки. Патофизиологические и терапевтические аспекты: Материалы Международного симпозиума. — М., 1997. — С. 15–19.
9. Иконников Н. С., Ардатская М. Д., Дубинин А. В. и др. Способ разделения смеси жирных кислот фракции C_2 – C_7 методом газожидкостной хроматографии. — Пат. № 2145511 от 2000 г. РФ.
10. Минушкин О. Н., Ардатская М. Д., Елизарова Н. А. // Клин. фармакол. и тер. — 2001. — № 10(5). — С. 9–12.
11. Минушкин О. Н., Ардатская М. Д., Иконников Н. С. // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. — 2001. — Т. 12, № 4. — С. 33–38.
12. Минушкин О. Н., Прихно Н. И., Ардатская М. Д. и др. // Клин. мед. — 2001. — № 4. — С. 37–40.
13. Минушкин О. Н., Ардатская М. Д., Елизарова Н. А. // Кремлев. мед. — 2002. — № 1. — С. 34–38.
14. Шерлок Ш. Заболевания печени и желчных путей. — М., 1999. — С. 100–119.