



РОЛЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТАБОЛИТОВ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ, ДИАГНОСТИКЕ И ПРОФИЛАКТИКЕ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА

Ардатская М. Д.
ФГБУ ДПО «Центральная государственная медицинская академия» УПД Президента РФ

THE ROLE OF LOW MOLECULAR WEIGHT METABOLITES OF THE INTESTINAL MICROBIOTA IN THE PATHOGENESIS, DIAGNOSIS AND PREVENTION OF COLORECTAL CANCER

Ardatskaya M. D.
Central state medical Academy

Ардатская Мария Дмитриевна — д.м.н., профессор, профессор кафедры гастроэнтерологии

Ардатская
Мария Дмитриевна
Ardatskaya Mariya D.
ma@uni-med.ru

Резюме

Цель исследования: изучить содержание короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) у больных раком толстой кишки (РТК) в слизистой оболочке толстой кишки (СОТК) и кале методом ГЖХ-анализа: оценить их значение.

Материалы и методы: Исследования выполнены у 52 пациентов, оперированных по поводу рака толстой кишки. Больные были в возрасте от 61 до 81 года, 32 женщины и 20 мужчин. В 14-ти случаях опухоль локализовалась в слепой и восходящем отделе ободочной кишки, 6-ти — в нисходящей, в 26-ти — в сигмовидной кишке, в 6-ти — в ректосигмоидном отделе. В связи с этим в 14-ти случаях выполнена правосторонняя гемиколэктомия, в 14-ти левосторонняя гемиколэктомия, в 16-ти резекция сигмы, в 8-ми — передняя резекция прямой кишки. При гистологическом исследовании выявлялась аденокарцинома толстой кишки различной степени дифференцировки (высокодифференцированная-25, умеренно-20, низко-7). Распределение больных по распространенности опухолевого процесса было следующим: I –2, IIA –4, IIIA –36, IIIB –10. Методом ГЖХ-анализа определено содержание КЦЖК в СОТК и кале.

Результаты: Абсолютное содержание КЦЖК в СОТК у группы больных с РТК имеет тенденцию к снижению по сравнению с группой контроля. Суммарная абсолютная концентрация КЦЖК при локализации опухоли в правых отделах выше, по сравнению с концентрацией КЦЖК при левосторонней локализации ($0,420 \pm 0,110$ мг/г и $0,350 \pm 0,001$ мг/г соответственно). При изучении профилей в образцах опухоли и кале при левосторонней локализации достоверно повышен уровень пропионовой и масляной кислот (до $0,159 \pm 0,001$ ед и $0,105 \pm 0,002$ ед соответственно, при норме $0,134 \pm 0,001$ ед и $0,087 \pm 0,004$ ед соответственно в СОТК; до $0,241 \pm 0,001$ ед и $0,221 \pm 0,002$ ед соответственно, при норме $0,189 \pm 0,001$ ед и $0,176 \pm 0,004$ ед соответственно в кале), при правосторонней — изолированно уровень масляной кислоты (до $0,093 \pm 0,011$ ед, при норме до $0,067 \pm 0,01$ ед в СОТК; до $0,281 \pm 0,002$ ед, при норме до $0,176 \pm 0,004$ ед в кале). У больных РТК с увеличением стадии опухолевого процесса отмечается нарастание уровня масляной кислоты (с $0,099 \pm 0,021$ ед при T 1–3, до $0,110 \pm 0,030$ ед при T4 в СОТК, с $0,201 \pm 0,002$ ед при T 1–3, до $0,220 \pm 0,002$ ед при T4 в кале) и повышение показателей соотношения изокилот к кислотам в СОТК и кале (с $1,929 \pm 0,010$ ед при T 1–3, до с $2,217 \pm 0,019$ ед при T4 в СОТК, с $2,432 \pm 0,120$ ед при T 1–3, до $4,327 \pm 0,110$ ед при T4 в кале). При снижении степени дифференцировки опухоли (высоко-, умеренно-, низкодифференцированная) в СОТК отмечается повышение доли пропионовой (с $0,152 \pm 0,010$ ед, $0,209 \pm 0,01$ ед, $0,224 \pm 0,010$ ед соответственно) и, в основном, масляной кислот (с $0,085 \pm 0,010$ ед., $0,120 \pm 0,010$ ед., $0,168 \pm 0,010$ ед. соответственно). При этом соотношения изокилот к кислотам не отличаются между собой.

Заключение: у больных РТК выявляются специфические изменения КЦЖК в СОТК в зависимости от локализации, степени дифференцировки и глубины прорастания опухолью кишечной стенки сопоставимые с изменениями в кале. Изменения КЦЖК в кале могут использоваться в качестве неинвазивного теста, позволяющего косвенно судить о наличии опухолевого процесса, его локализации и степени прорастания стенки кишки опухолью. Применение

препаратов, содержащих предшественники масляной кислоты (псиллиум) или непосредственно саму масляную кислоту, является перспективным направлением канцеропревенции КРР.

Ключевые слова: микрофлора, низкомолекулярные метаболиты кишечной микробиоты, короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК), рак толстой кишки, масляная кислота (бутират), псиллиум, бутират+инулин

Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология 2017; 139 (3): 15–21

Summary

The purpose of the study is to examine the content of short chain fatty acids (SCFA) in patients with colon cancer (CC) in the mucosa of the colon (CM) and feces by GLC-analysis: to assess their significance.

Material and methods: the Study was performed in 52 patients operated on for colon cancer. Patients ranged in age from 61 to 81 years, 32 women and 20 men. In 14 cases the tumor was localized in the blind and ascending Department of the colon, 6 — in descending, 26- in the sigmoid colon, in 6 — in rectosigmoid part. In this regard, in 14 cases, the right hemicolectomy, 14 left hemicolectomy, 16 resection of the Sigma, 8 — anterior resection of the rectum. Histological examination revealed colon adenocarcinoma varying degrees of differentiation (high difference-25, moderate — -20, low of -7). Distribution of patients according to prevalence of tumor process was as follows: -2 I, IIA -4, —36 IIIA, IIIB -10. By GLC analysis to determine the content SCFA in CM and feces.

Results: the Absolute contents SCFA in CM, the group of patients with CC tends to decrease compared to the control group. The total absolute concentration SCFA when the tumor in the right departments is higher in comparison with the concentration of SCFA when left-sided localization (0,420±0,110 mg/g and of 0.350±0.001 mg/g, respectively). In the study profiles in samples of tumor and feces when left localization of the significantly elevated level of propionic and butyric acids (up to 0,159±0,001 ed and 0,105±0,002 units, respectively, at a rate of 0,134±0,001 ed and 0,087±0,004 units, respectively, in CM; to 0,241±0,001 0,221 and u of±0.002 units, respectively, at a rate 0,189±0,001 ed and 0,176±0,004 units, respectively, in the feces), when right — level of isolated oil acid (0,093±0,011 u, at a rate of up to 0,067±0,01 IU per CM; to 0.281±0,002 units, at a rate of up to 0,176±0,004 ed feces). Among CC patients with increasing tumor stage marks an increase in the level of butyric acid (0,099±0,021 ed at T 1–3, to 0,110±0,030 ed at T4 in SOTK, 0,201±0,002 ed at T 1–3, to 0,220±0,002 ed at T4 in the feces) and increasing the ratio of isocyclic to acids in CM and feces (1,929±0,010 u at T 1–3, to 2,217±0,019 ed at T4 in CM, with 2,432±0,120 ed at T 1–3, to 4,327±0,110 units at T4 in feces). By reducing the degree of tumor differentiation (highly, moderately -, poorly-differentiated) in CM marked increase in the proportion of propionic (of 0.152±0,010 u, 0,209±0,01 units, 0,224±0,010 u, respectively) and mainly oil acid (of 0.085±0,010 units, 0,120±0,010 units, 0,168±0,010 units, respectively). The ratio of isocyclic forms to acids do not differ.

Conclusion: in CC patients revealed specific changes SCFA in CM, depending on the localization, differentiation grade and depth of germination by the tumor of the intestinal wall is comparable to the change in feces. Changes SCFA in the stool can be used as a non-invasive test that allows indirectly to judge the presence of tumor, its localization and extent of germination of the bowel wall by the tumor. The use of preparations containing precursors of butyric acid (psyllium) or itself butyric acid, is a promising direction of CC canceroprevention.

Keywords: microflora, of low molecular weight metabolites of the intestinal microbiota, short chain fatty acids (SCFA), colon cancer, butyric acid (butyrate), psyllium, butyrate+inulin

Ekspierimental'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya 2017; 139 (3): 15–21

Причины возникновения колоректального рака (КРР) в достаточной степени остаются не изученными. В настоящее время большинством исследователей во всем мире признается тот факт, что КРР является полиэтиологическим заболеванием. Скорее всего, к возникновению КРР приводит сочетание нескольких неблагоприятных факторов, ведущими из которых являются диета со сниженным содержанием пищевых волокон, факторы внешней среды, хронические воспалительные заболевания толстой кишки и наследственность (1).

В последние годы активно изучаются механизмы развития КРР, ассоциированные с кишечной микробиотой. Взаимоотношения организм человека-микробиота носят сложный характер, реализующийся на метаболическом, регуляторном,

внутриклеточном и генетическом уровнях, поэтому изменения микробиоценоза толстой кишки могут играть важную роль в колоректальном канцерогенезе. Обсуждается влияние отдельных видов или ассоциаций микроорганизмов в качестве триггерных факторов развития опухолевого процесса в толстой кишке или наоборот, оказывающих протективное антиканцерогенное действие (2). У пациентов с КРР в фекалиях отмечается снижение одних видов микроорганизмов (*Lactobacillus*, бутират-продуцирующие бактерии (включая *Roseburia* и *Fecalibacterium*), *Microbacterium*, *Anoxybacillus*, *Akkermansia muciniphilia* (муцин-разрушающие штаммы) и повышение других (*S. bovis*, *Streptococcus spp.*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium*, *Bacteroides*), по сравнению со здоровыми лицами (3).

Несмотря на значительный прогресс в изучении влияния микрофлоры на кишечный канцерогенез, многие вопросы остаются дискуссионными, а данные противоречивыми. Так до сих пор не ясно, является ли выявленный дисбиоз у пациентов КРР причиной онкопроцесса или его следствием. Также следует отметить, что полученные изменения микрофлоры в фекальных образцах следует интерпретировать с осторожностью, поскольку состав микрофлоры каждого конкретного человека имеет индивидуальные различия и зависит от диетических и многих других факторов.

В последнее время многими исследователями пристальное внимание уделяется низкомолекулярным метаболитам, продуцируемым индигенной микрофлорой толстой кишки (главным образом анаэробами) при ферментации углеводов и белков, в частности короткоцепочечным жирным кислотам (КЦЖК).

КЦЖК оказывают многофакторное влияние на физиологию клеток кишечника и макроорганизма в целом (4). Ведущую роль в поддержании кишечного гомеостаза и нормального функционирования колоноцита играет масляная кислота (бутират). Важность масляной кислоты (бутирата) как основного источника энергии и метаболического регулятора для здоровых клеток толстого кишечника (колоноцитов), а также как регулятора клеточных функций и пролиферации хорошо известна (6). Также масляная кислота обеспечивает целостность слизистого барьера, оказывает противовоспалительное действие, регулирует водно-электролитный баланс в толстой кишке и др. Каждая КЦЖК образуется при ферментации субстрата бактериями определенного вида. Масляная кислота (бутират) образуется определенными видами бактерий, которые выделены в отдельную группу, так называемых бутират-продуцирующих бактерий. Многочисленными исследованиями было установлено значительное снижение количества бутират-продуцентов (*Eubacterium rectale*, *Eubacterium ramulus*, *Eubacterium hallii*, *Roseburia cecicola*, *Roseburia faecis*, *Faecalibacterium prausnitzii*) в фекалиях и слизистой толстой кишки у пациентов КРР и аденоматозными полипами, что коррелирует и с более низкой концентрацией масляной кислоты в толстой кишке у данной группы больных (3). Дефицит масляной кислоты рассматривается в настоящее время как важнейший фактор риска образования полипов и неоплазии в толстой кишке.

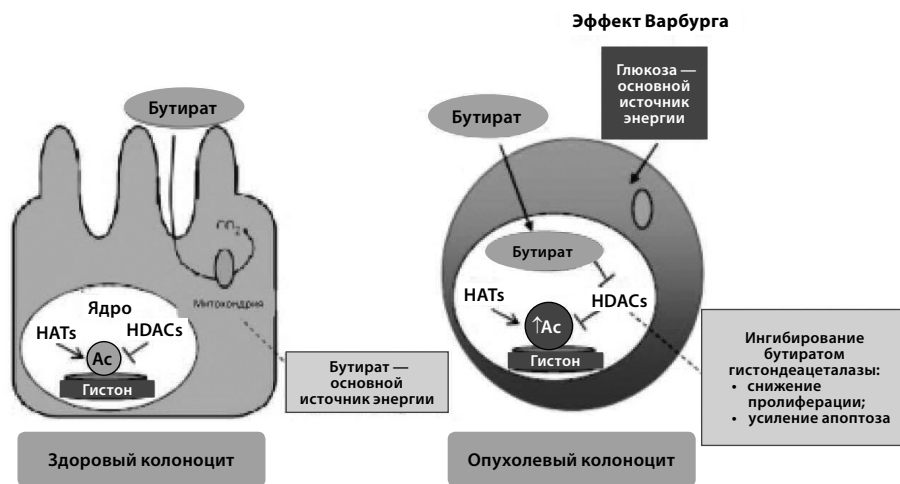
Влияние бутирата на патогенез опухолевого роста в толстой кишке хорошо изучено (5). Большинство противоопухолевых свойств масляной кислоты было выявлено *in vitro* в культурах злокачественных клеток. В этих моделях введение масляной кислоты приводило к ингибированию процессов пролиферации, индукции апоптоза или дифференциации опухолевых клеток. Влияние масляной кислоты на атипичные клетки отличается от его воздействия на неизмененные колоноциты. Было показано, что масляная кислота не только стимулирует процессы физиологической пролиферации в базальных криптах толстого кишечника, но и уменьшает количество и размер aberrантных

участков в криптах (одного из наиболее ранних диагностических признаков неопластического поражения толстого кишечника). Такие противоположные свойства масляной кислоты получили название «парадокс масляной кислоты» (7).

Несколько последних исследований (8,9) на гнотобионтных (стерильных) мышах убедительно продемонстрировали антиканцерогенное действие масляной кислоты и протективный эффект диеты с высоким содержанием пищевых волокон, являющихся предшественником бутирата. Кишечник стерильных мышей был колонизирован естественным видом бутират-продуцирующих бактерий (*Butyrivibrio fibrisolvens*) и мутантным штаммом данного вида бутират-продуцентов, у которого была удалена часть оперона, ответственного за продукцию бутирата, и который продуцировал низкий уровень бутирата, по сравнению с обычным штаммом. В каждом изоляте мыши получали диету с высоким содержанием клетчатки диеты (не менее 6% фруктоолигосахариды / инулин), либо контрольную изокалорийную диету без клетчатки. Также одна стерильная группа мышей получала масляную кислоту. Рак толстой кишки у мышей индуцировался азоксиметаном. Было установлено, что диета с высоким содержанием пищевых волокон или масляная кислота в чистом виде коррелировала с высоким уровнем бутирата в кишке, повышением ацетилирования гистонов и снижения массы опухоли, по сравнению с контрольной диетой и/или отсутствием бутират-продуцирующих бактерий.

Данное исследование также продемонстрировало механизм тумор-супрессивного действия бутирата при КРР. Как уже указывалось выше, в отличие от большинства клеток человеческого организма, утилизирующих глюкозу в качестве первичного источника энергии, основным источником энергии (70% энергопотребности) для здоровых колоноцитов является бутират. Бутират проникая в колоноцит подвергается β -окислению в митохондриях с образованием АТФ, поддерживая энергетический гомеостаз, необходимый для быстрой пролиферации кишечного эпителия, обновляющегося каждые 7 дней. В отличие от здоровых, опухолевые клетки кишечного эпителия (как и опухолевые клетки вообще), согласно эффекту Варбурга, переключаются с бутирата на утилизацию глюкозы и аэробный гликолиз (рисунок 1). В результате этого метаболического переключения, бутират не метаболизируется в митохондриях опухолевого колоноцита, а накапливается в ядре клетки и ингибирует гистоновую деацетилазу (HDAC), избыточная активность которой приводит к нарушению транскрипции и «выключению» генов, ответственных за контроль клеточного цикла (9). Раковые клетки более восприимчивы к действию ингибиторов HDAC, чем доброкачественные клетки (11). Подавление активности HDAC под действием масляной кислоты вызывает гиперацетилирование гистонов, что, во-первых, делает нуклеосомальную ДНК более доступной для факторов транскрипции, а во-вторых, через изменение синтеза белка p21WAF1/Cip1, блокирует клеточный цикл в точке G1. При такой остановке цикла ферменты

Рисунок 1.
Механизм бутират-опосредованного подавления роста опухоли по Scott J. Vultman, 2016 (9).



Примечание: HATs — гистонацетилтрансфераза; HDACs — гистондеацетилаза

репарации ДНК получают возможность исправить дефекты нуклеиновой кислоты. Кроме того, бутират, подавляя активность гистондеацетилазы эпигенетически регулирует гены, участвующие в клеточной пролиферации и апоптоза, что приводит к подавлению пролиферации и усилению апоптоза опухолевого колоноцита.

Антиканцерогенный эффект бутирата не ограничивается только данным механизмом. Нормальная слизистая оболочка толстой кишки экспрессирует GPR 109A — рецептор к никотиновой кислоте, сцепленный с G-белками, обладающий сродством к бутирату (12) и ответственный за инициацию апоптоза. Экспрессия этого рецептора в раковых опухолях подавляется за счет метилирования ДНК. Масляная кислота, как было продемонстрировано в ходе исследования (13), предотвращает метилирование ДНК и тем самым увеличивает экспрессию

GPR 109A, что запускает клеточно-специфичный апоптоз. Связь длительного воспаления в толстой кишке и КРР давно доказана, и подтверждена у пациентов с длительным анамнезом ЯК, имеющих 10-кратное увеличение риска КРР (14,15). В этом отношении противовоспалительный эффект масляной кислоты также играет важную роль в подавлении опухолевого роста. Механизмы противовоспалительного действия бутирата хорошо изучены и подтверждены в клинических исследованиях у пациентов с ВЗК (11).

Таким образом, бутират обладает плеiotропным механизмом действия, предотвращая опухолевый рост колоноцитов.

Целью нашего исследования явилось: изучить содержание КЦЖК у больных РТК в слизистой оболочке толстой кишки (СОТК) и кале методом ГЖХ-анализа.

Материалы и методы

Исследования выполнены у 52 пациентов, оперированных по поводу рака толстой кишки. Больные были в возрасте от 61 до 81 года, 32 женщины и 20 мужчин. В 14-ти случаях опухоль локализовалась в слепой и восходящем отделе ободочной кишки, 6-ти — в нисходящей, в 26-ти — в сигмовидной кишке, в 6-ти — в ректосигмоидном отделе. В связи с этим в 14-ти случаях выполнена правосторонняя гемиколэктомия, в 14-ти левосторонняя гемиколэктомия, в 16-ти резекция сигмы, причем в 4-х случаях с наложением колостомы, в 8-ми — передняя резекция прямой кишки.

При гистологическом исследовании выявлялась аденокарцинома толстой кишки различной степени дифференцировки (высокодифференцированная-25, умереннодифференцированная-20, низкодифференцированная-7). Распределение больных по распространенности опухолевого процесса было следующим: I —2, IIА —4, IIIА —36, IIIБ —10.

Группа нормы была сформирована из 30 практически здоровых лиц, у которых в результате

полного клинического обследования не было выявлено патологии и 10 больных, которым была выполнена резекция толстой кишки по поводу травматических повреждений.

Методом ГЖХ-анализа (16,17) были определены КЦЖК — уксусная (С2), пропионовая (С3), изомасляная (изо-С4), масляная (С4), изовалериановая (изо-С5), валериановая (С5), изокапроновая (изо-С6) и капроновая кислоты (С6) — в слизистой оболочке толстой кишки (СОТК) и кале у больных КРР, а также в СОТК (диагностическая колоноскопия с биопсией и интраоперационные биоптаты) и кале практически здоровых лиц.

Статистическая обработка результатов: для сравнения средних показателей относительного содержания отдельных короткоцепочечных жирных кислот (рСп) между изучаемыми группами и подтверждения их статистически значимых различий использовали линейный регрессионный анализ с вычислением доверительных интервалов угла наклона (а) и свободного члена (b) в уравнениях регрессии.

Результаты исследования

Абсолютное содержание КЦЖК в СОТК у группы больных с КРР практически не изменено по сравнению с группой контроля, однако, имеет тенденцию к снижению (Σ КЦЖК (С2-С4) опух. $0,417 < 0,478 \Sigma$ КЦЖК (С2-С4) норм.) (мг/г).

Было изучено абсолютное содержание КЦЖК в зависимости от локализации опухоли. Установлено повышение суммарной абсолютной концентрации КЦЖК при локализации опухоли в правых отделах

(слепая, восходящая кишка) ($0,641 \pm 0,091$ мг/г), по сравнению с концентрацией КЦЖК при левосторонней локализации (нисходящая, сигмовидная, ректосигмоидный отдел) ($0,413 \pm 0,085$ мг/г).

Были рассчитаны профили КЦЖК, под которыми подразумевается относительное содержание отдельных кислот в общем пуле кислот с длиной углеродных атомов С2-С4, т.е. долевое участие каждой кислоты (рСn):

$$pCn = \frac{Cn}{C_2 + C_3 + C_4}$$

Профиль КЦЖК в норме не зависит ни от количества продуцирующих и утилизирующих метаболиты микроорганизмов, ни от числа клеток (эпителиоцитов) всасывающей поверхности.

Результаты изучения профилей С2-С4 в норме, а также в зависимости от локализации опухоли, в образцах выше и ниже опухоли в СОТК представлены в *таблицах 1 и 2*. Установлено, что в норме в профиле кислот отмечается доминирование уровня масляной кислоты в левых отделах и пропионовой кислоты в правых отделах ТК в общем пуле кислот. У больных КРР профиль кислот в интактной слизистой (выше и ниже опухоли) с лево- и правосторонней локализацией достоверно не отличается от показателей нормы в соответствующих отделах ТК. В образцах опухоли при левосторонней локализации достоверно повышен уровень пропионовой и масляной кислот; при правосторонней — изолированно уровень масляной кислоты.

Нами были изучены профили КЦЖК и отношение содержания изокилот (изоСп, изоС5) к кислотам (Сп, С5) в СОТК у больных КРР в зависимости от глубины прорастания опухоли кишечной стенки (критерий Т по системе TNM, международная классификация, 1997). Мы выделили 2 группы больных, причем в 1 группе — при гистологическом исследовании опухоль не выходила за пределы кишечной стенки (Т1-3), во второй группе — инфильтрировала все слои кишки и проросла соседние органы (Т4). Результаты изучения профилей КЦЖК и изокилот к кислотам в СОТК представлены в *таблице 3*, из которой видно, что у больных с более выраженной инвазией опухолью стенки толстой кишки (Т4) отмечается нарастание уровня масляной кислот, а также повышение показателей соотношения изокилот к кислотам, коррелирующее со стадией нарастания инвазии опухоли.

Мы также исследовали вышеуказанные показатели КЦЖК в СОТК в зависимости от степени

	р.С2(ед)	р.С3 (ед)	р.С4 (ед)	Е	ЕСn/ЕСn (ед)	IS5/С5 (ед)
Норма	0,779±0,004	0,134±0,001	0,087±0,004	0,418±0,002	1,384±0,11	5,77±0,93
Выше опухоли	0,772±0,002	0,139±0,002	0,089±0,002	0,410±0,001	1,11±0,21	5,73±0,93
Опухоль	0,736±0,002	0,159±0,001*,**	0,105±0,002*,**	0,350±0,001	1,023±0,21	3,153±0,93
Ниже опухоли	0,780±0,002	0,130±0,002	0,089±0,004	0,460±0,002	1,227±0,22	6,79±0,98

Таблица 1

Абсолютное содержание КЦЖК, профили КЦЖК (С2-С4) и отношение содержания отдельных изокилот (изоСп, изоС5) к кислотам (Сп, С5) в СОТК у больных с левосторонней локализацией опухоли.

Примечание:

М±м, где * — $p < 0,05$ при сравнении с группой нормы, ** — $p < 0,05$ при сравнении между группами

	р.С2(ед)	р.С3 (ед)	р.С4 (ед)	Е	ЕСn/ЕСn (ед)	IS5/С5 (ед)
Норма	0,754±0,010	0,179±0,011	0,067±0,010	0,530±0,050	1,22±0,14	7,7±0,93
Выше опухоли	0,766±0,020	0,173±0,031	0,065±0,009	0,510±0,050	1,60±0,11	6,35±0,95
Опухоль	0,725±0,051	0,182±0,022	0,093±0,011*,**	0,420±0,110	1,35±0,09	3,43±0,99
Ниже опухоли	0,751±0,031	0,181±0,032	0,068±0,011	0,490±0,210	1,14±0,011	6,29±1,53

Таблица 2.

Абсолютное содержание КЦЖК, профили КЦЖК (С2-С4) и отношение содержания отдельных изокилот (изоСп, изоС5) к кислотам (Сп, С5) в СОТК у больных с правосторонней локализацией опухоли.

Примечание:

М±м, где * — $p < 0,05$ при сравнении с группой нормы, ** — $p < 0,05$ при сравнении между группами

Таблица 3.

Абсолютное содержание КЦЖК, профили КЦЖК (С2-С4) и отношение содержания отдельных изокислот (изоСп, изоС5) к кислотам (Сп, С5) в СОТК у больных КРР в зависимости стадии опухоли по критерию Т.

Примечание:

М±м, где * — p<0,05 при сравнении с группой нормы, ** — p<0,05 при сравнении между группами

	р.С2 (ед)	р.С3 (ед)	р.С4 (ед)	Е (мг/г)	ЕIСп/ЕСп (ед)	IC5/С5 (ед)
Норма	0,766±0,010	0,156±0,011	0,077±0,010	0,489±0,222	1,50±0,14	6,89±0,13
Т 1-3	0,759±0,021	0,142±0,012*	0,099±0,021*	0,323±0,211	1,929±0,12	5,689±0,15
Т 4	0,728±0,030*	0,162±0,012*	0,110±0,024*	0,633±0,209	2,217±0,19**,**	7,66±0,21**,**

Таблица 4.

Абсолютное содержание КЦЖК, профили КЦЖК (С2-С4) и отношение содержания отдельных изокислот (изоСп, изоС5) к кислотам (Сп, С5) в СОТК у больных КРР в зависимости от степени дифференцировки опухоли.

Примечание:

М±м, где * — p<0,05 при сравнении с группой нормы, ** — p<0,05 при сравнении между группами

	р.С2 (ед)	р.С3 (ед)	р.С4 (ед)	Е (мг/г)	ЕIСп/ЕСп (ед)	IC5/С5 (ед)
Высоко	0,763±0,024**,**	0,152±0,010**,**	0,085±0,009**,**	0,42±0,01	1,189±0,14	6,514±0,01
Умеренно	0,671±0,021**,**	0,209±0,011**,**	0,120±0,017**,**	0,312±0,01	1,103±0,10	6,296±0,01
Низко	0,580±0,012**,**	0,224±0,012**,**	0,168±0,019**,**	0,972±0,01	1,093±0,10	6,006±0,01

Таблица 5.

Абсолютное содержание КЦЖК, профили КЦЖК (С2-С4), отношение содержания отдельных изокислот (изоСп, изоС5) к кислотам (Сп, С5) и анаэробные индексы в фекалиях у больных с различной локализацией опухоли.

Примечание:

М±м, где * — p<0,05 при сравнении с группой нормы, ** — p<0,05 при сравнении между группами

	р.С2 (ед)	р.С3 (ед)	р.С4 (ед)	Е(мг/г)	ЕIСп/ЕСп (ед)	IC5/С5 (ед)	AI (ед)
Норма	0,634±0,004	0,189±0,001	0,176±0,004	9,42±1,35	0,430±0,040	1,47±0,130	-0,576 ±0,012
Левосторонняя	0,539±0,003	0,241±0,001**,**	0,221±0,002**,**	5,33±0,18*	0,830±0,030	2,62±0,12	-0,857±0,011**,**
Правосторонняя	0,528±0,003	0,191±0,002	0,281±0,002**,**	5,18±0,11*	0,418±0,020	1,67±0,11	-0,894±0,012**,**

Таблица 6.

Абсолютное содержание КЦЖК, профили КЦЖК (С2-С4), отношение содержания отдельных изокислот (изоСп, изоС5) к кислотам (Сп, С5) и анаэробные индексы в фекалиях у больных КРР в зависимости стадии опухоли по критерию Т.

Примечание:

М±м, где * — p<0,05 при сравнении с группой нормы, ** — p<0,05 при сравнении между группами

	р.С2 (ед)	р.С3 (ед)	р.С4 (ед)	Е (мг/г)	ЕIСп/ЕСп (ед)	IC5/С5 (ед)	AI (ед)
Норма	0,634±0,004	0,189±0,001	0,176±0,004	9,42±1,35	0,430±0,011	1,471±0,130	-0,576 ±0,012
Т1-3	0,608±0,003	0,191±0,001*	0,201±0,003**,**	4,369±0,001	0,587±0,021**,**	2,432±0,12**,**	-0,644±0,011**,**
Т 4	0,581±0,003	0,199±0,002	0,220±0,004**,**	4,588±0,001	0,923±0,029**,**	4,327±0,11**,**	-0,721±0,012**,**

дифференцировки опухоли (табл. 4). Отмечено, что при снижении степени дифференцировки опухоли отмечается достоверное повышение доли масляной и пропионовой кислот; при этом соотношения изокилот к кислотам не имеют достоверных отличий.

Результаты изучения профилей КЦЖК С2-С4 и соотношения изокилот к кислотам в фекальных образцах с различной локализацией опухоли и в зависимости от степени прорастания опухолью кишечной стенки представлены в таблицах 5 и 6.

Обсуждение полученных результатов

Изменение абсолютных концентраций КЦЖК в опухоли связаны с особенностями метаболизма опухолей (эффект Варбурга). Для опухолевых клеток типичен аэробный гликолиз — гликолитическое расщепление глюкозы до лактата в присутствии кислорода. Дефицит АТФ, связанный с нарушением образования конденсата пируват-ацетил-коА, компенсируется ускорением распада глюкозы. Гликолиз в опухолевых клетках служит основным источником энергии, и, т.о., все вышеуказанное сказывается на изменениях содержания КЦЖК (14).

Повышение относительного содержания масляной кислоты как непосредственно в опухоли, так и в зависимости от степени прорастания и дифференцировки опухоли у больных с аденокарциномой толстой кишки, возможно, связано с уменьшением утилизации бутирата колоноцитами («метаболический блок окисления» масляной кислоты) в условиях изменения метаболизма в опухолевых клетках и накоплением его в ткани опухоли. Установлено, что этот процесс инициируется и/или усугубляется интестинальной потерей жидкости и нарушением и нарушением обмена ионов водорода и натрия, повышенным образованием сернистого водорода, являющегося ингибитором метаболизма масляной кислоты, а также переключением метаболизма колоноцитов на использование глутамина в качестве энергетического субстрата (6).

Таким образом, полученные данные подтверждают ранее проведенные исследования, изучающими роль бутирата при КРР (9,10).

Повышение уровня изокилот в СОТК при нарастании степени инвазии опухоли, по-видимому, связано, с одной стороны, с разрушением пристеночного слоя в области опухоли и нарушением муцинообразования, а, с другой стороны, с активизацией белкового синтеза, особенно ядерных белков гистоносовой и негистоносовой природы. В экспериментах установлено, что вокруг опухоли идет процесс воспалительной пролиферации, которая сопровождается ростом уровня альфа-1 — гликопротеинов, участвующих в фибриллогенезе коллагена (14).

Как известно, к факторам, регулирующим пролиферацию, относятся циклические нуклеотиды, причем цАМФ подавляет пролиферацию и способствует дифференцировке клеток, а цГМФ стимулирует пролиферацию (11,12). В литературе имеются данные о более низком содержании цАМФ

Как видно из представленных таблиц, отмечается одновременное повышение долей пропионовой и масляной кислот при левосторонней локализации опухоли и повышение доли масляной кислот при снижении доли пропионовой кислоты при правосторонней локализации, что соотносится с данными, полученными при изучении КЦЖК в СОТК.

При увеличении степени прорастания опухолью кишечной стенки увеличивается концентрация масляной кислоты и изокилот, что также соотносится с данными при изучении КЦЖК в СОТК.

в опухоли ТК (12,13). Учитывая факт сопряженности содержания пропионовой кислоты и цАМФ (3), повышение доли пропионовой кислоты может объясняться снижением степени дифференцировки опухоли.

Полученные результаты абсолютного содержания КЦЖК в кале и их профилей в зависимости от локализации опухоли могут быть объяснены, тем, что в правых и левых отделах толстой кишки утилизация и абсорбция КЦЖК различны, а микрофлора, продуцирующая данные метаболиты представлена разными популяциями (3,8). Известно, что основное количество КЦЖК образуется в правых отделах ТК, где концентрация питательных веществ, бактериальный рост и ферментативная активность микрофлоры значительно выше (3,8). В свою очередь, утилизация КЦЖК более активно происходит в левых отделах ТК (8).

Однако, полученные данные могут свидетельствовать о качественных изменениях микрофлоры, обусловленных наличием патологического процесса, связанного с изменением метаболизма колоноцитов: переключением его с цикла Кребса на активацию гексозомонофосфатного пути шунтирования (ГМШ). Такое изменение стратегии метаболизма приводит к тому, что меняется трофическая база колоноцитов. Последние перестают всасывать и утилизировать КЦЖК, в первую очередь, пропионат и бутират и начинают использовать для своего дыхания эндогенный метаболит — глюкозу. Все выше изложенное приводит к изменению внутрипросветного редокс-потенциала, при котором жизнедеятельность облигатных анаэробов угнетается (за счет блокирования терминальных ферридоксинсодержащих ферментов) и активизируются условно-патогенные штаммы анаэробов, в частности условно-патогенные бактерии, клостридии и др.

Кроме того, резкое повышение продукции изокилот и особенно изовалериановой кислоты у больных со стадией Т4 могут характеризовать деструкцию приэпителиального и эпителиального слоя кишечной стенки.

Известно, что эпителиальная слизь представляет собой молекулы, в которых к полипептидному остову прикреплены боковые поли- и олигосахаридные звенья, что является метаболическим субстратом для протеолитической микрофлоры, утилизирующей белки и продуцирующей изомеры КЦЖК. Увеличение кишечной кровоточивости

приводит к повышению активности аэробных и анаэробных микроорганизмов, способных к гемолизу (гемолитические штаммы аэробов-*E.coli* и анаэробов- некоторые штаммы клостридий, бактероидов и др.) (5).

С практической точки зрения, учитывая однонаправленные изменения КЦЖК в СОТК и кале, можно предложить исследование изученных параметров в скрининговом обследовании больных в качестве неинвазивного теста, позволяющего косвенно судить о наличии опухолевого процесса, его локализации и степени прорастания стенки кишки опухолью.

Кроме того, с учетом накопленных данных о противопухоловом эффекте масляной кислоты разрабатываются подходы к ее применению с целью профилактики КРР. Клинические исследования терапевтического применения масляной кислоты с целью профилактики колоректального рака при полипозе толстой кишки на сегодняшний момент не проводились. Однако, высказанное Беркитт еще в 1972 г предположение, что потребление пищевых волокон — предшественников бутирата- предотвращает развитие колоректальных аденом и аденокарциномы толстой кишки нашло подтверждение во многих эпидемиологических исследованиях. Недавние исследования показали, что потребление пищевых волокон изменяет состав микробиоценоза толстой кишки в большей степени, чем другие пищевые факторы и увеличивает количество бутират-продуцирующих бактерий (10–12). При анализе пациентов с колоректальным раком в Испании за 1995–2000 гг. была выявлена обратная зависимость смертности, обусловленной этим заболеванием, от уровня потребления пищевых волокон [105]. Аналогичная закономерность наблюдалась и для японской популяции [106]. Малое потребление фруктов, овощей и других источников пищевых волокон по результатам исследования 500 000 американцев также было признано значимым фактором риска рака толстой кишки. Мета-анализ публикаций, посвященных факторам риска рака толстой кишки, опубликованных к 2006 г, продемонстрировал благоприятное профилактическое воздействие пищевых волокон [107].

К сожалению, современная западная диета содержит относительно небольшую долю пищевых волокон, в связи с чем с 1990-х гг были предприняты попытки создания и терапевтического применения лекарственных препаратов, содержащих максимальную концентрацию пищевых волокон, так и самой масляной кислоты. В качестве лекарственных препаратов на основе пищевых волокон наибольшее применение в клинической практике имеет псилиум, содержащий оболочку семян

подорожника овального, и является мягким пищевым волокном. Применение 10 г псиллиума в день позволяет обеспечить треть необходимой суточной нормы пищевых волокон. При разведении псиллиума в воде, в отличие от грубых пищевых волокон, за счет гелеобразующей фракции образуется мягкая желеобразная масса, оказывающая в том числе обволакивающее и противовоспалительное действие на слизистую оболочку кишечника. За счет быстро ферментируемой фракции при утилизации псиллиума бутират-продуцирующей микрофлорой толстой кишки образуется масляная кислота. Согласно данным Nordgaard и соавторов [23] у пациентов после резекции толстой кишки по поводу колоректального рака, получавших псилиум в дозе 20 граммов в день в течение 3 месяцев, средний уровень образования бутирата в кишечнике увеличился на 42% и оставался повышенным еще в течение 2 месяцев после прекращения приема псиллиума. Кроме, стимуляции синтеза бутирата, псилиум ускоряет выведение по толстой кишке канцерогенов и уменьшает их концентрацию (естественная энтеросорбция).

Другим подходом к канцеропревенции КРР может являться применение препаратов, содержащих непосредственно масляную кислоту. На сегодняшний день в нашем арсенале есть комбинированный препарат, содержащий масляную кислоту и инулин. Благодаря, технологии полимерной мультиматриксной системы, действующие вещества доставляются непосредственно в толстую кишку и обеспечивается их постепенное высвобождение вплоть до дистальных отделов.

Таким образом, противоопухолевая активность масляной кислоты представляет собой особый интерес, так как она относится к эндогенным веществам, физиологически синтезируемым нормальными бутират-продуцирующими видами бактерий толстой кишки. Полученные нами данные демонстрируют изменения качественного состава КЦЖК в СОТК у больных КРР, связанные со специфическим изменением метаболизма опухолевых клеток. Изменения качественного состава КЦЖК в СОТК имеют характерные особенности при локализации опухоли и коррелируют со степенью инвазии опухолью стенки ТК и ее дифференцировки. Качественные изменения КЦЖК в СОТК и кале имеют однонаправленные изменения, что позволяет предложить исследования метаболитов в кале в качестве скринингового метода диагностики КРР. Применение препаратов, содержащих предшественники масляной кислоты (псилиум) или непосредственно саму масляную кислоту, является перспективным направлением канцеропревенции КРР.

Литература

1. Шапошников А. В. Колоректальный рак. Канцерогенез и онкопревенция: пособие для врачей. — Москва: Форте принт, 2015.
2. Marta Borges-Canha, et al. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig (Madrid)* Vol. 107, № 11, pp. 659–671, 2015.
3. Scott J. Bultman. Emerging roles of the microbiome in cancer. *Carcinogenesis* vol.35 № .2 pp.249–255, 2014.
4. Short Chain Fatty Acides.// Congress Short Report Falk Symposium, comp. by Scheppach W. — Strasbourg, 1993. — 50 p.
5. Siavoshian S. Et al. Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of humen intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression.// *Gut*. — 2000. — V.46. — Pp. 507–514.
6. Ардатская М. Д. Масляная кислота и инулин в клинической практике. Москва, Прима Принт, 2016.
7. Lupton, J.R. Microbial degradation products influence colon cancer risk: the butyrate controversy. 2004, *J. Nutr.*, 134, 479–482.
8. Donohoe DR, et al. (2014) A Gnotobiotic Mouse Model Demonstrates That Dietary Fiber Protects against Colorectal Tumorigenesis in a Microbiota- and Butyrate-Dependent Manner. *Cancer discovery* 4(12):1387–1397.
9. Sebastian C & Mostoslavsky R (2014) Untangling the fiber yarn: butyrate feeds warburg to suppress colorectal cancer. *Cancer discovery* 4(12):1368–1370.
10. Scott J. Bultman. The Microbiome and Its Potential as a Cancer Preventive Intervention. *Semin Oncol.* 2016 Feb;43(1):97–106.
11. Головенко О. В., Халиф И. Л., Головенко А. О. Лечение заболеваний кишечника масляной кислотой. *Поликлиника* № 2, 2012.
12. Thangaraju M, et al. (2009) GPR 109A is a G-protein-coupled receptor for the bacterial fermentation product butyrate and functions as a tumor suppressor in colon. *Cancer research* 69(7):2826–2832.
13. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity* 2014;40:128–39. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.12.007
14. Terzic J, Grivennikov S, Karin E, & Karin M (2010) Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138(6):2101–2114 e2105.
15. Itzkowitz SH & Harpaz N (2004) Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 126(6):1634–1648.
16. Ардатская М. Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Докторская диссертация, М., 299 с., 2003.
17. Иконников Н. С., Ардатская М. Д., Дубинин А. В., и др. Патент РФ «Способ разделения смеси жирных кислот фракции C2-C7 методом газожидкостной хроматографии». N 2145511 от 9.04.1999 г.
18. Осина В. А. Абсорбционная функция толстой кишки в норме и при патологии.// *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. — 2002. — № 1. — С. 81–85.
19. Emenaker N. J., Basson M. D. Short chain fatty acids differentially modulate cellular phenotype and c-myc protein levels in primary human nonmalignant and malignant colonocytes. *Dig Dis Sci.* 2001 Jan;46(1):96–105.
20. Emenaker N. J., Calaf G. M., Cox D, Basson M. D., Qureshi N. Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-1, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an in vitro cell culture model. *J Nutr.* 2001 Nov;131(11 Suppl): 3041S–6S.
21. Федоров Н. А. Циклические пуриновые нуклеотиды 3,5-АМФ и 3,5-ГМФ как факторы регуляции пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток.// *Успехи современной биологии*, 1975, Т. 79, вып.2, с. 225–240.
22. De Rubertis F. R., Chayoth R, Field J. B. The content and metabolism of cyclic AMP and cyclic GMP in the adenocarcinoma of the human colon.// *J. Clin. Invest.*, 1976, v.57, p.641–649.
23. Блохина Н. Г., Пискунова Т. В., Киркин Б. В., Чижиков Б. А. Исследование циклических нуклеотидов при раке, полипах толстой кишки и неспецифических колитах.// *Вест. АМН СССР*, 1985, № 3, с. 74–77.
24. Бышевский А. Ш., Терсенов О. А. Биохимия для врача. Екатеринбург, «Уральский рабочий», 1994.