

УДК 579.222.3

©Коллектив авторов

## ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ НЕКОТОРЫХ АНАЭРОБНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА

*Н.В. Белобородова<sup>1\*</sup>, И.Т. Байрамов<sup>1</sup>, А.Ю. Оленин<sup>1</sup>, Н.И. Федотчева<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева РАМН, 121522, Москва, Рублевское ш., д.135; тел.: (495)414-79-14; факс: (495)414-79-14;

эл. почта: nvbeloborodova@yandex.ru

<sup>2</sup>Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, 142290, Пущино

В статье представлены данные о продукции некоторыми представителями основных групп анаэробной микрофлоры человека различных экзометаболитов, детектированных методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС). На основании полученных данных выявлены особенности их метаболизма: помимо молочной кислоты бифидобактерии и лактобациллы *in vitro* продуцируют значительные количества фенилмолочной и *para*-гидроксифенилмолочной кислот. Клостридии вне зависимости от вида продуцируют 2-гидроксимасляную и в меньшей степени молочную и фенилмолочную кислоты. *C. sporogenes*, в отличие от *C. perfringens*, продуцирует значительные количества фенилпропионовой и *para*-гидроксифенилпропионовой кислот, и в меньшей степени *para*-гидроксифенилмолочную кислоту. *C. perfringens* продуцирует небольшое количество 2-гидроксиглутаровой кислоты. Бактероиды являются мощными продуцентами янтарной и фумаровой кислот, а также вносят существенный вклад в продукцию молочной кислоты. *E. lentum* продуцирует молочную, фенилмолочную и янтарную кислоты и образует свойственные только ей (из всех исследованных нами микроорганизмов) 2-гидроксигексановую и 2-гидрокси-3-метилбутановую кислоты.

**Ключевые слова :** ГХ-МС, метаболиты, анаэробы

**ВВЕДЕНИЕ.** Постоянное присутствие в организме человека огромного числа сапрофитных и условно патогенных микроорганизмов сопряжено с их активной метаболической активностью, что вызывает естественный интерес в связи с возможным вмешательством продуктов жизнедеятельности бактерий в метаболические процессы хозяина. Еще в начале XX века И.И. Мечников обратил внимание на влияние веществ, продуцируемых нормальной микрофлорой организма человека, на его жизнедеятельность и состояние здоровья. Дальнейшее развитие этих идей привело к созданию целой группы препаратов на основе живых культур бактерий нормальной микрофлоры человека и/или их метаболитов – пробиотиков. Пробиотики активно вошли в нашу жизнь в виде препаратов и биологических добавок, им посвящена обширная литература, в то же время

\* - адресат для переписки

## ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА

исследований о влиянии метаболитов условно-патогенной микрофлоры на макроорганизм хозяина крайне мало.

Между тем такое влияние, безусловно, существует и заслуживает самого пристального внимания. Исследования в области метаболитов анаэробов - летучих жирных кислот (ЛЖК) и их влияния на иммунореактивность человека обобщены в обзоре [1]. Например, было доказано, что продуцируемая бактериоидами янтарная кислота обладает антифагоцитарным эффектом [2]. В другом исследовании было показано [3], что не только масляная, но и другие ЛЖК (пропионовая, янтарная) подавляют фагоцитоз золотистого стафилококка альвеолярными макрофагами и нейтрофилами человека.

К настоящему времени крайне мало достоверной информации о роли других метаболитов бактерий. Определенный интерес проявляется к фенилуксусной кислоте, но это больше связано с поиском её продуцентов в промышленных целях. Канадские коллеги, располагая обширной (более 350 штаммов) коллекцией изолятов анаэробных микроорганизмов различных видов целенаправленно изучили продукцию ими фенилуксусной кислоты и показали, что в отличие от аэробов большинство облигатных анаэробов не продуцирует её. Исключение составили лишь несколько видов (но далеко не все штаммы) бактериоидов и клостридий [4]. Биологическая роль многих микробных метаболитов изучена крайне недостаточно. Ряд исследователей уделяют особое внимание важной роли фенольных соединений микробного происхождения для функции толстой кишки человека, обсуждается их роль в качестве антиканцерогенных агентов [5]. Показаны токсические эффекты фенилкарбоновых кислот микробного происхождения на функцию митохондрий [6]. В то же время, существуют серьезные основания полагать, что роль микробных метаболитов значительно шире и что они активно участвуют в поддержании гомеостаза здорового организма человека [7].

Ранее в клиническом исследовании при сравнении сывороток крови здоровых людей (доноров) и больных с сепсисом нами были выявлены значительные отличия в содержании некоторых микробных метаболитов [8], что привело нас к сознательному поиску микроорганизмов-продуцентов этих метаболитов (табл. 1).

Нами было показано также, что аэробы или факультативные анаэробы (стафилококки, энтерококки, энтеробактерии и др.) из числа наиболее частых возбудителей гнойно-септических заболеваний у человека, с разной степенью интенсивности продуцируют *in vitro* различные экзосметаболиты [9].

В исследовании микробных метаболитов нами использован метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии (ГХ-МС). Во всех анализах мы контролировали содержание примерно 30 низкомолекулярных продуктов, в числе которых простые карбоновые кислоты и их производные, фенилкарбоновые кислоты, производные индола и др. Большинство этих соединений хорошо известны, описаны в ряде публикаций как метаболиты исключительно микробного происхождения, а концентрации некоторых из них - фенилуксусной, фенилпропионовой, *n*-гидроксифенилуксусной, *n*-гидроксифенилпропионовой, дигидроксициннамовой, бензойной и др. изучены в кишечном содержимом здоровых людей [5]. Другие вещества, например, янтарная, молочная, фумаровая и другие кислоты в равной степени характерны как для микробного метаболизма, так и для метаболизма эукариотических клеток. С учетом того, что кишечная микрофлора человека более чем на 95% представлена строгими анаэробами, актуальной задачей является исследование продуктов жизнедеятельности анаэробных микроорганизмов из состава микрофлоры человека для выявления особенностей их метаболизма.

Целью данного исследования является выявление вклада строгих анаэробов – представителей микрофлоры человека в продуцировании низкомолекулярных соединений микробного происхождения, ранее обнаруженных в крови людей.

Таблица 1. Список определяемых соединений и их масс-спектральные и хроматографические характеристики.

№	Вещество	Время удержания ТМС-производного, мин	Основной ион (отн. инт.)	Дополнительный ион
1	D <sub>5</sub> -Бензойная кислота	10,45	184 (999)	110
2	Фенол	6,92	151 (999)	166
3	<i>n</i> -Крезол	8,45	165 (999)	180
4	Бензиловый спирт	8,55	91 (999)	165
5	Бензойная кислота	10,51	179 (999)	105
6	<i>n</i> -Гидроксibenзойная кислота	18,27	267 (999)	223
7	2,4-Дигидроксibenзойная кислота	20,75	355 (999)	281
8	3,4-Дигидроксibenзойная кислота	20,84	193 (846)	370
9	Фенилуксусная кислота	11,71	164 (172)	91
10	<i>n</i> -Гидроксифенилуксусная кислота	18,04	179 (256)	296
11	2-Гидроксифенилуксусная кислота	15,22	179 (999)	147
12	Фенилпропионовая кислота	14,02	104 (999)	207
13	<i>n</i> -Гидроксифенилпропионовая кислота	19,80	179 (999)	192
14	Коричная кислота	16,29	205 (999)	131
15	<i>n</i> -Гидроксифенилкоричная кислота	22,22	219 (999)	293
16	Фенилмолочная кислота	17,12	193 (999)	147
17	<i>n</i> -Гидроксифенилмолочная кислота	22,02	179 (999)	147
18	Фенилпировиноградная кислота	16,85	147 (999)	293
19	<i>n</i> -Гидроксифенилпировиноградная кислота	20,01	147 (999)	325
20	N-Ацетилтирозин	23,09	179 (999)	308
21	<i>o</i> -Гидроксифенилуксусная кислота	16,75	147 (325)	253
22	<i>n</i> -Гидроксibenзальдегид	13,45	179 (999)	194
23	1-Индолуксусная кислота	22,20	130 (999)	247
24	3-Индолуксусная кислота	22,80	202 (999)	319
25	Янтарная кислота	12,05	147 (999)	148
26	Фумаровая кислота	12,68	245 (999)	147
27	2-Кетоглутаровая кислота	17,50	147 (798)	347
28	2-Гидроксиглутаровая кислота	16,98	129 (692)	147
29	2-Гидроксимасляная кислота	8,22	131 (784)	147
30	Молочная кислота	6,82	117 (696)	145
31	Яблочная кислота	15,58	147 (367)	233
32	Гомованилиновая кислота	20,15	209 (338)	326

**МЕТОДИКА.**

*Выращивание микроорганизмов.* В исследовании использованы музейные штаммы *Eubacterium lentum* ATCC 43055, *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *B. thetaiotaomicron* ATCC 29741, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *C. sporogenes* ATCC 19404. Кроме того мы использовали штаммы *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus fermentum*, выделенные из препаратов “Бифидумбактерин” и “Лактобактерин”, произведенных ФГУП “НПО Микроген” МЗ РФ. Чистота всех исследованных штаммов была проверена на полуавтоматической системе идентификации микроорганизмов BD BBL CRYSTAL anaerobe ID system (“Beckton Dickinson”). Перед началом эксперимента все культуры исследованных микроорганизмов были выращены в бульоне Шедлера (“Beckton Dickinson”) в стеклянных центрифужных пробирках в анаэроостате, помещенном в термостат при 37°C в течение 48 часов в атмосфере содержащей 80% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> и 10% H<sub>2</sub>. После инкубации все штаммы методом десятикратных разведений были высеяны на агаризованную среду Шедлера (“Beckton Dickinson”), после чего инкубированы в анаэроостате, помещенном в термостат при 37°C в течение 48 часов в анаэробной атмосфере, указанной выше. После этого нами учтено число КОЕ исследованных штаммов в исходном инокуляте (3–6)×10<sup>8</sup> КОЕ на 1 мл среды в зависимости от штамма). После отбора проб для определения КОЕ 0,1 мл исходного инокулята вносили в стеклянные центрифужные пробирки, содержащие по 8 мл бульона Шедлера (по 9 образцов для каждого штамма). Все пробирки были помещены в анаэроостат, где инкубировались в анаэробной атмосфере, указанной выше в термостате при 37°C. Через 24, 48 и 96 часов изымалось по 3 образца с культурой каждого штамма для ГХ-МС исследований. В каждом случае учёт КОЕ проводился аналогично методике, описанной выше. После 24 ч инкубации численность бактерий рода *Clostridium* достигала 8×10<sup>8</sup>-2×10<sup>9</sup> КОЕ/мл и в дальнейшем изменялась в этих же пределах, численность остальных микроорганизмов достигала подобных же величин к 48 ч инкубации и в дальнейшем изменялась незначительно.

Для воспроизводимости результатов эксперимент повторяли трехкратно с недельным интервалом. При исследовании всех трех повторностей результаты были воспроизводимы.

После отбора проб для определения КОЕ все пробирки центрифугировались в течение 15 минут при 1400 g, супернатант отбирали и направляли на ГХ-МС-анализ для определения экзосметаболитов исследованных штаммов. Контролем служил стерильный бульон Шедлера, который инкубировался рядом с опытными пробирками в том же режиме. Культуры изучались в 2 этапа (сначала бифидобактерии, лактобациллы и клостридии, затем бактероиды и зубактерии), соответственно, в результатах отражены фоновые содержания веществ поочередно в двух контролях.

**Определение экзосметаболитов.**

*Пробоподготовка для ГХ-МС анализа:* 1 мл супернатанта подкисляли 10 мкл 50% серной кислоты (до pH=2), туда же вносили 10 мкл спиртового раствора, содержащего 400 нг D<sub>5</sub>-бензойной кислоты (внутреннего стандарта для ГХ-МС), после чего полученную смесь дважды экстрагировали порциями по 1 мл диэтилового эфира. Объединенный эфирный экстракт упаривали досуха при 40°C, после чего обрабатывали 20 мкл N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамида (BSTFA, “Fluka”), выдерживали в виале под крышкой при 80°C в течение 15 минут. Полученный ТМС-замещенный продукт растворяли в 80 мкл n-гексана, переносили во вставку в виал объемом 200 мкл, после чего исследовали методом ГХ-МС.

*ГХ-МС анализ:* Хромато-масс-спектральное определение экзосметаболитов проводили с использованием газового хроматографа Agilent Technologies 6890, оснащенного масс-спектральным детектором Agilent Technologies 5973 в режиме

полного сканирования. Хроматографическое разделение компонентов происходило на кварцевой капиллярной колонке HP5MS диаметром 0,2 мм, длиной 25 м, с толщиной слоя 0,33 мкм. Газ-носитель – гелий, скорость потока – 24 мл/мин, скорость потока через колонку – 1,2 мл/мин. Температурный режим во время анализа: температура испарителя 280°C, начальная температура термостата колонки 80°C, время выдержки 4 мин, далее нагрев до 240°C со скоростью 7°C/мин, до 320°C со скоростью 15°C/мин, затем термостатирование при 320°C до конца анализа. Объём анализируемой пробы – 2 мкл, общее время анализа – 35 мин, время задержки работы детектора – 4 мин. Для определения площадей пиков использовали хроматограммы, полученные в режиме селективных ионов. Список определяемых соединений, времена удерживания, ионы и их относительные интенсивности в масс-спектрах приведены в таблице 1. Масс-спектральные данные для идентификации соединений получены с использованием базы данных NIST-02.

Обработку хроматограммы производили следующим образом: находили пик ТМС-производного D<sub>5</sub>-бензойной кислоты (RT=10.45), определяли его площадь, затем находили пик *i*-го компонента смеси по пику основного иона, подтвержденному пиком дополнительного иона с тем же временем удерживания, и определяли его площадь (по основному иону). Для ряда соединений в качестве основного иона использовался не самый интенсивный пик в масс-спектре, поэтому в расчетную формулу введена соответствующая поправка. Количественный расчёт содержания *i*-го компонента производился по формуле:

$$c_i = \frac{S_i \cdot M_{ri} \cdot m_{st} \cdot I_{max}}{S_{st} \cdot M_{rsi} \cdot V_s \cdot I_i},$$

где  $c_i$  – концентрация *i*-го компонента (нг/мл),  $S_i$  – площадь пика *i*-го компонента,  $M_{ri}$  – молекулярная масса ТМС-производного *i*-го компонента,  $m_{st}$  – масса вводимого стандарта (400 нг),  $I_{max}$  – высота наиболее интенсивного пика в масс-спектре *i*-го компонента (999),  $S_{st}$  – площадь пика стандарта,  $M_{rsi}$  – молекулярная масса ТМС-производного стандарта (231),  $V_s$  – Объём образца (1 мл),  $I_i$  – высота основного иона в масс-спектре ТМС-производного *i*-го компонента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** В результате проведённого исследования нами обнаружено, что ряд низкомолекулярных соединений, которые по существующим представлениям имеют микробное происхождение, не являются продуктами жизнедеятельности изученных нами строгих анаэробных микроорганизмов, так как они либо не были обнаружены в питательной среде ни до, ни после культивирования анаэробов (гомованилиновая кислота), либо их концентрации в среде после культивирования анаэробов не отличались от контрольных образцов (*n*-гидроксibenзойная, *n*-гидроксифенилуксусная, *o*-гидроксифенилуксусная, *n*-гидроксифенилциннамовая, 1- и 3-индолуксусные кислоты, а также бензиловый спирт, и N-ацетилтирозин). Соответственно, эти соединения не включены в таблицу 2. В приведённой ниже сводной таблице включены лишь те соединения, которые так или иначе связаны с метаболизмом изученных нами штаммов, так как в ходе эксперимента установлен факт их продукции (появление или увеличение концентраций по сравнению с контролем), либо утилизации (снижение концентрации по сравнению с контролем) в жидкой среде культивирования анаэробов спустя 24, 48 или 96 ч. Для удобства анализа результатов из всех трех повторностей было получено среднее значение и пересчитано в мкг/мл.

ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА

Таблица 2. Сводная таблица экзометаболических анаэробных микроорганизмов.

Микроорганизмы	Время инкубации, ч	Экзометаболические ( мкТ/мл)										
		ФПК	n-ГФПК	ФМК	n-ГФМК	МК	ЯнК	ФК	2-ГГК	2-ГМК	ЯК	
Этап 1. Контроль 1		0,1	0,3	0,6	0,2	7,9	40,3	1,7	0,2	0,1	1,3	
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	24	0,1	0,1	29,4	12,0	31,4	41,0	0,0	0,3	0,1	1,1	
	48	0,1	0,1	64,9	35,4	51,3	40,3	0,0	0,0	0,1	1,1	
	96	0,1	0,1	80,3	38,2	61,0	39,1	0,0	0,0	0,1	1,1	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	24	0,1	0,3	27,1	9,5	76,0	35,2	0,0	0,3	0,3	0,0	
	48	0,2	0,6	39,4	13,7	132,0	52,3	0,0	0,4	0,5	0,1	
	96	0,3	0,6	35,6	12,4	110,1	44,3	0,0	0,2	0,7	0,0	
<i>Clostridium sporogenes</i>	24	182,7	129,5	10,2	4,0	10,5	32,6	0,0	0,0	9,5	0,8	
	48	155,7	123,2	0,9	0,4	9,5	29,9	0,0	0,0	12,0	0,7	
	96	128,0	101,0	0,5	0,2	26,3	28,3	0,0	0,0	15,2	0,1	
<i>S.perfringens</i>	24	0,2	0,1	2,2	0,1	48,3	31,8	0,0	2,4	8,5	0,8	
	48	0,1	0,1	1,7	0,1	45,9	27,1	0,0	2,0	8,5	0,8	
	96	0,1	0,1	2,2	0,2	46,4	26,9	0,0	1,9	6,3	0,8	
Этап 2. Контроль 2.		0,0	0,0	0,2	0,1	6,4	37,4	0,6	0,2	0,0	1,2	
<i>Bacteroides fragilis</i>	24	0,0	0,0	0,1	0,0	7,5	88,1	17,7	0,1	0,0	3,9	
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	44,5	346,9	32,8	0,0	0,0	20,5	
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	20,6	363,6	2,8	0,0	0,0	1,9	
<i>B. thetaiotaomicron</i>	24	0,0	0,0	0,1	0,0	6,1	32,1	12,9	0,0	0,0	2,8	
	48	0,0	0,0	0,2	0,0	30,1	100,1	17,6	0,1	0,0	9,3	
	96	0,1	0,0	0,3	0,1	14,2	420,3	6,8	0,2	0,0	4,0	
<i>Eubacterim lentum</i>	24	0,0	0,0	3,3	0,4	14,5	18,5	1,5	0,0	0,0	0,6	
	48	0,0	0,0	111,0	25,9	174,2	186,4	4,5	0,2	0,1	0,4	
	96	0,0	0,0	137,2	25,8	197,6	140,8	4,8	0,3	0,3	0,0	

Сокращения: ФПК - фенил-пропионовая кислота, n-ГФПК - n-гидроксифенил-пропионовая кислота, ФМК - фенил-молочная кислота, n-ГФМК - n-гидроксифенил-молочная кислота, МК - молочная кислота, ЯнК - янтарная кислота, ФК - фумаровая кислота, 2-ГГК - 2-гидрокси-глутаровая кислота, 2-ГМК - 2-гидрокси-масляная кислота, ЯК - яблочная кислота.

*Bifidobacterium*. Бактерии рода *Bifidobacterium* в норме выделяются из полости рта, кишечника и репродуктивного тракта у женщин. Принято считать, что их высокое содержание в кишечнике является показателем здоровья, особенно у маленьких детей. Бифидобактерии считаются непатогенными, их относят к так называемой полезной микрофлоре, они крайне редко встречаются в клинических образцах, но тем не менее иногда их выделяют и при инфекционных процессах у человека [10].

Известно, что бифидобактерии активно сбраживают углеводы с образованием в основном уксусной и молочной кислот в молярном соотношении 3:2, не образуют масляную, пропионовую кислоты и углекислый газ [10]. Данных по образованию бифидобактериями фенол-производных молочной кислоты в литературе нами не найдено.

В наших экспериментах обнаружено, что помимо молочной кислоты (61 мкг/мл), бифидобактерии образуют весьма значительные количества фенолмолочной (80,3 мкг/мл) и *para*-гидроксифенолмолочной (38,2 мкг/мл) кислот. Иных метаболитов нами выявлено не было. Следует отметить, что суммарная продукция этих двух кислот практически вдвое превосходит продукцию молочной кислоты.

Также нами установлено что *B. bifidum* в следовых количествах (до 150 нг/мл) продуцирует 2-кетоглутаровую кислоту.

*Lactobacillus*. Бактерии рода *Lactobacillus* в норме содержатся в кишечнике в высокой концентрации. По некоторым данным, их также выделяют иногда из других биотопов организма человека, однако сведения об их участии в патологических процессах недостоверны. Об их метаболизме существуют сведения, что по меньшей мере половина углерода конечных продуктов брожения приходится на молочную кислоту. [10].

Нами было выявлено что помимо молочной (до 132 мкг/мл) лактобациллы образуют фенолмолочную (до 39,4 мкг/мл) и *para*-гидроксифенолмолочную (до 13,7 мкг/мл) кислоты и не образуют иных метаболитов, то есть в отношении изученных нами низкомолекулярных соединений ведут себя так же, как и бифидобактерии. Эти данные коррелируют с литературными данными, где показано что продукция фенолмолочной кислоты *L.plantarum* сопоставима с продукцией молочной кислоты [11].

В процессе обработки результатов исследований нами выявлено, что *L. fermentum* потребляла находящиеся в среде бензойную, 2,4- и 3,4-дигидроксибензойные а также коричную кислоты, снижая их концентрации до количеств не уловимых прибором.

*Clostridium*. В эксперименте нами изучены два вида клостридий – *C. perfringens* и *C. sporogenes*.

*C. perfringens* распространена в природе более широко, чем любой другой патогенный микроорганизм. У людей отмечено частое носительство *C. perfringens* как компонента нормальной эндогенной флоры. Хотя данный вид может быть выделен у небольшой части пациентов из полости рта, поверхности кожи, влагалища/шейки матки или мочи (приблизительно у 20% лиц), основным местообитанием *C. perfringens* в организме человека являются дистальные отделы желудочно-кишечного тракта. *C. perfringens* — самый распространённый вид клостридий при инфекционных процессах у человека; связанные с ним тяжёлые инфекции обычно полимикробные. *C. perfringens* является возбудителем газовой гангрены, может вызывать бактериемию, в том числе - с внутрисосудистым гемолизом. Бактерии данного вида чаще всего выделяют при заболеваниях, причинно связанных с микрофлорой толстой кишки (например, при перитоните, внутрибрюшном абсцессе, инфекциях мягких тканей промежности и нижних конечностей) [10].

*C. sporogenes* выделены из фекалий младенцев и взрослых людей, а при инфекциях этот микроорганизм может встречаться при таких нозологиях,

## ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА

как бактериемия, инфекционный эндокардит, инфекции центральной нервной системы, легочно-плевральные нагноения, абсцессы, "боевые" раны и другие гнойные инфекции [10].

В литературе есть сведения, что из углеводов или пептона клостридии обычно образуют смесь органических кислот и спиртов [10].

Нами показано что общим свойством для исследованных нами клостридий является продукция молочной (от 26,3 мкг/мл до 48,3 мкг/мл) и 2-гидроксимасляной кислоты (от 8,5 до 15,2 мкг/мл) у *C. sporogenes* и у *C. perfringens* соответственно. В отношении других метаболитов у них имеются внутривидовые различия. Так, если *C. sporogenes*, в отличие от всех других исследованных нами анаэробов, активно продуцирует фенилпропионовую (до 182,7 мкг/мл) и пара-гидроксифенилпропионовую (до 129,5 мкг/мл) кислоты, то *C. perfringens* этим свойством не обладает, но в отличие от *C. sporogenes* в небольшом количестве (2,4 мкг/мл) продуцирует 2-гидроксиглутаровую кислоту.

Следует отметить некоторые особенности метаболизма клостридий в отличие от всех других анаэробов: по результатам таблицы 2 видно, что наиболее значительная продукция исследованных нами экзосметаболитов у клостридий наблюдается в первые 24 ч инкубации, а затем резко снижается, в некоторых случаях до уровня контроля, что видимо следует отнести на счет их высокой метаболической активности с включением в метаболизм собственных продуктов жизнедеятельности.

Из таблицы 2 также видно, что клостридии вносят вклад в образование фенилмолочной кислоты - до 10,2 мкг/мл при инкубации 24 ч с последующим падением до уровня контроля у *C. sporogenes* и стабильных 2,2 мкг/мл у *C. perfringens*. Также *C. sporogenes*, в отличие от *C. perfringens*, в первые 24 ч образует до 4,0 мкг/мл пара-гидроксифенилмолочной кислоты с последующим падением концентрации до уровня контроля, однако при этом у *C. perfringens* продукция молочной кислоты как минимум вдвое выше, чем у *C. sporogenes*, и сопоставима с таковой у бифидобактерий.

В процессе обработки результатов исследований нами выявлено, что *C. sporogenes* в отличие от *C. perfringens* потребляла находящиеся в среде бензойную, 2-гидроксифенилуксусную кислоты и *n*-гидроксibenзальдегид снижая их концентрации до количеств не уловимых прибором.

*Bacteroides*. Род бактероидов чрезвычайно широко распространён в природе, количество видов бактероидов исчисляется десятками. Для эксперимента нами были использованы два вида бактероидов – *B. thetaiotaomicron*, для которого более характерно присутствие в кишечнике здорового человека, и *B. fragilis* как наиболее частый возбудитель неклостридиальных анаэробных инфекций у человека. На долю *B. fragilis* в составе нормальной кишечной микрофлоры человека приходится менее 1%. Значительно чаще его выделяют (в монокультуре или чаще в ассоциации с другими микроорганизмами) из различных клинических образцов, включая аппендикс при аппендиците, экссудат брюшной полости при перитоните, клапаны сердца при инфекционном эндокардите, кровь, абсцессы параректальной клетчатки, эпителиальный копчиковый ход и др; иногда выделяют из полости рта и влагалища. *B. fragilis* является самым распространенным видом анаэробных бактерий, выделяемым при инфекциях мягких тканей, послеоперационных раневых инфекциях и анаэробной бактериемии у человека. В отличие от *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* часто выделяется из фекалий [10].

Из литературы известно, что основными конечными продуктами сбраживания глюкозы у бактероидов являются уксусная и янтарная кислоты; в меньших количествах могут образовываться другие кислоты [10].

В данном исследовании получено, как и следовало ожидать, что оба вида бактероидов продуцируют значительные количества янтарной кислоты (от 363,6 мкг/мл для *B. fragilis* до 420,3 мкг/мл для *B. thetaiotaomicron*). Кроме того, они продуцируют фенилуксусную ((начиная с 48 часов) до 3,7 мкг/мл и 4,2 мкг/мл

соответственно), фумаровую (32,8 мкг/мл и 17,6 мкг/мл соответственно) и молочную (44,5 мкг/мл и 30,1 мкг/мл соответственно) кислоты, то есть в плане продукции этих кислот *B. fragilis* ведет себя в 1,5-2 раза активнее, чем *B. thetaiotaomicron*. Следует также отметить повышение концентрации яблочной кислоты после 48 ч инкубации обоих видов бактериоидов с последующим понижением до концентрации близкой к контролю.

*Eubacterium. E. lentum* выделяют из фекалий, содержимого тощей кишки у здоровых людей, а также больных с язвой желудка, синдромом слепой петли и прогрессирующим системным склерозом, из полости рта, в том числе при инфекционных процессах [10]. Микроорганизмы данного вида выделены из крови, послеоперационных ран, аппендикса, опухоли прямой кишки, а также из абсцессов различной локализации (головного мозга, челюстно-лицевой области, перикарда, кишечника, малого таза и мошонки); при синусите, перитоните, пиомиозите, гангрене; из околоплодных вод у беременных женщин с хориоамнионитом, из мочи у мужчин с бесплодием после массажа предстательной железы [10].

Интересно отметить, что среди всех других микроорганизмов зубактерии наиболее часто упоминаются при различных патологических состояниях, не связанных напрямую с инфекцией. Так, в литературе имеются сведения, что зубактерии участвуют в метаболизме стероидов — желчных кислот, холестерина, половых гормонов, ксенобиотиков, в частности — сердечного гликозида дигоксина, предупреждая развитие токсических эффектов, оказывают противоопухолевое действие, снижают мутагенную активность канцерогенов. Эти бактерии также деградируют оксалаты, что снижает риск развития мочекаменной болезни [10]. Фрагменты клеточной стенки *E. lentum* индуцируют хронический полиартрит [12]. Повышенное их содержание отмечается также у больных периодической болезнью [13].

Вышеприведённые факты особенно интересны в свете полученных нами данных о наиболее высокой метаболической активности зубактерий по сравнению с другими изученными нами анаэробами. Так, по литературным источникам известно, что при культивировании зубактерий обнаруживают продукты брожения глюкозы — уксусную, молочную и янтарную кислоты [10].

В нашем эксперименте *E. lentum* продемонстрировала наибольшую метаболическую активность: для неё оказалось характерным накопление в среде к 96 ч инкубации достаточно высоких количеств и фенолкарбоновых (фенилмолочной - до 137,2 мкг/мл, *para*-гидроксифенилмолочной - до 25,8 мкг/мл), и простых карбоновых (что соотносится с литературными данными) кислот: молочной — до 197,6 мкг/мл), янтарной — до 186,4 мкг/мл и ряда их производных (2-гидроксигексановой и 2-гидрокси-3-метилбутановой кислот (до 175,8 и 82,6 мкг/мл соответственно). Также в следовых количествах (до 77 нг/мл) *E. lentum* продуцирует 2-кетоглутаровую кислоту.

На основании полученных нами экспериментальных данных выявлены особенности метаболизма некоторых видов анаэробных микроорганизмов, представителей микрофлоры организма человека, на среде Шедлера:

- Бифидобактерии и лактобациллы *in vitro* продуцируют весьма значительные количества фенилмолочной и *para*-гидроксифенилмолочной кислот, которые считаются потенциально токсичными для человека

- Клостридии вне зависимости от вида продуцируют 2-гидроксимасляную и в меньшей степени молочную и фенилмолочную кислоты. *C. sporogenes* в отличие от *C. perfringens* продуцирует весьма значительные количества фенилпропионовой и *para*-гидроксифенилпропионовой кислот, и в меньшей степени *para*-гидроксифенилмолочную кислоту. *C. perfringens* в отличие от всех исследованных микроорганизмов продуцирует небольшое количество 2-гидроксиглутаровой кислоты.

- Бактероиды являются мощными продуцентами янтарной и фумаровой кислот, а также вносят существенный вклад в продукцию молочной кислоты.

## ЭКЗОМЕТАБОЛИТЫ МИКРОФЛОРЫ ЧЕЛОВЕКА

• Из всех исследованных анаэробов наибольшее разнообразие продуктов метаболизма выявлено у *E. lentum*. Продукция молочной и фенилмолочной кислот у этого микроорганизма сопоставима с продукцией их у лактобацилл и бифидобактерий вместе взятых; а *para*-гидроксифенилмолочной сопоставима с ними. *E. lentum* образует свойственные только ей (из всех исследованных нами микроорганизмов) 2-гидроксигексановую и 2-гидрокси-3-метилбутановую кислоты. Кроме того, *E. lentum*, наряду с бактероидами, принимает участие в создании пула янтарной кислоты в организме человека.

Полученные данные могут быть полезными для широкого круга специалистов, работающих в областях микробиологии и биохимии. Так, видовые различия в метаболической активности с избирательным накоплением разных конечных продуктов метаболизма у разных анаэробов можно использовать для некультурального изучения состава биоценозов и микробных ассоциаций. Медицинское значение будущих выводов можно прогнозировать уже сейчас. Косвенным подтверждением чего является тот факт, что исследование инициировано клиницистами и выполнено в клиническом учреждении.

Можно высказать лишь теоретические предположения о возможной биологической роли фенилкарбоновых и карбоновых кислот, обнаруженных у анаэробов, например, об их способности подавлять иммунореактивность по аналогии с более изученными летучими жирными кислотами. Интересно заметить, что описанные в 80-90-х годах эффекты подавления реактивности иммунокомпетентных клеток человека метаболитами анаэробов связывают с ЛЖК, но в большинстве работ исследовали фильтрат культуральной жидкости анаэробов, в котором, как теперь можно утверждать с уверенностью, могли находиться и другие низкомолекулярные метаболиты, которые стали доступны для изучения лишь с использованием ГХ-МС-анализа. Так, *in vitro* добавление фенилкарбоновых кислот приводит к снижению фагоцитарной активности нейтрофилов, полученных из крови здоровых и больных людей, о чём нами сообщалось ранее [14].

Число изученных штаммов анаэробов в данной работе невелико, но однонаправленность результатов в повторных опытах позволяют утверждать, что полученные различия в конечных продуктах метаболизма разных групп анаэробных микроорганизмов действительно отражают происходящие в биоценозах человека процессы и приоткрывают завесу к раскрытию биохимических тайн “метаболического реактора”, как иногда образно называют совокупность кишечной микрофлоры человека.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (09-04-01236-а).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белобородова Н.В., Белобородов С.М. (2000) Антибиотики и химиотерапия, **45**, 28-36.
2. Larsen B. (1993) Normal Flora and Endogenous Infection. in: Obstetric and perinatal infections (ed. D.Charles) Mosby-Year Book, pp. 3-9.
3. Eftimiadi C., Tonetti M., Cavallero A., Sacco O., Rossi G.A. (1990) J. Infect. Dis., **161**, 138-142.
4. Mayrand D., Bourgeau G. (1982) J. Clin. Microbiol., **16**, 747-750.
5. Jenner A.M., Rafter J., Halliwell B. (2005) Free Radic. Biol. Med., **38**, 763-772.
6. Fedotcheva N.I., Kazakov R.E., Kondrashova M.N., Beloborodova N.V. (2008) Toxicol. Lett., **180**, 182-188.
7. Beloborodova N.V., Osipov G.A. (2000) Microbial Ecology in Health and Disease, **12**, 12-21

8. Белобородова Н.В., Архипова А.С., Белобородов Д.М., Бойко Н.Б., Мелько А.И., Оленин А.Ю. (2006) Клин. лабор. диагностика, №2, 3-6.
9. Khodakova A.S., Beloborodova N.V. (2007) Crit. Care, **11**(4), PS.
10. Бухарин О.В., Вальшев А.В. (2004) Анаэробная микрофлора человека. Екатеринбург.
11. Lavermicocsa P., Valerio F., Visconti A. (2003) Applied and Environmental Microbiology, **69**, 634–640.
12. Severijnen A.J., van Kleef R., Hazenberg M.P., van de Merwe J.P. (1990) Infect. Immun., **58**, 523-528.
13. Белобородова Н.В., Кицюян Ж.А., Осипов Г.А., Саркисян Н.Н., Карагезян К.Г. (2002) Вестн. РАМН, №2, 41-45.
14. Белобородова Н.В., Черневская Е.А., Архипова А.С. (2006) Сборник тезисов X Ежегодной сессии НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, **7**, с. 186

Поступила: 31. 11. 2009.

#### EXOMETABOLITES OF SOME ANAEROBIC MICROORGANISMS OF HUMAN MICROFLORA

*N.V. Beloborodova<sup>1</sup>, I.T. Bairamov<sup>1</sup>, A.Yu. Olenin<sup>1</sup>, N.I. Fedotcheva<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Bakoulev Center for Cardiovascular Surgery RAMS, Roublevskoe sh., 135, Moscow, 121522 Russia;  
tel.: +7 (495) 414-79-14; fax: +7 (495) 414-79-14; e-mail: nvbeloborodova@yandex.ru

<sup>2</sup>Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, 142290, Pushchino, Moscow Region, Russia

Some exometabolites produced by basic representatives of human anaerobic microflora were investigated, detected by gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS). *In vitro* besides lactic acid *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* generate substantial amounts of phenyllactic and *p*-hydroxyphenyllactic acids. *Clostridium* produced 2-hydroxybutyric acid and to a lesser extent lactic and phenyllactic acids. In contrast to *C. perfringens*, *C. sporogenes* generates substantial amount of phenylpropionic and *p*-hydroxyphenylpropionic acids and less *p*-hydroxyphenyllactic acid. *C. perfringens* produced minor amounts of 2-hydroxyglutaric acid. Bacteroids are potent producers of succinic and fumaric acids; they also contribute to production of significant portion of lactic acid. *E. lentum* generate lactic, phenyllactic and succinic acids and form a characteristic only for ones (from studied microorganisms) 2-hydroxyhexanic and 2-hydroxy-3-methylbutyric acids.

**Key words:** GS-MS, metabolites, anaerobes.