



УДК 611.34:[577.115.3:547.39.04]:579.22

СПЕКТР КОРОТКОЛАНЦЮГОВИХ ЖИРНИХ КИСЛОТ У ВМІСТІ КИШЕЧНИКА ЩУРІВ ЗА ВПЛИВУ НІПАЗОЛУ

Я. І. Колісник, В. В. Литвин, Н. Б. Сkochияс

*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: kolyaryna@ ukr.net*

Досліджено якісний і кількісний склад коротколанцюгових жирних кислот (оцтової, пропіонової, масляної, ізовалеріанової, валеріанової та капронової) у вмісті товстої кишки щурів, яким перорально вводили 10 мг/кг антимікробного консерванту ніпазолу. Встановлено, що на 7 і 14 добу експерименту зменшується вміст оцтової кислоти, порівняно з таким у тварин контрольної групи. Кількість пропіонової та масляної кислот на 7 добу введення ніпазолу зростає, на 14 добу експерименту вміст цих кислот знижується, проте є вищим, порівняно з таким у тварин, яким не вводили консервант. Концентрації ізовалеріанової та валеріанової кислот на 7 і 14 доби дослідження були вищими, порівняно з вмістом цих кислот у кишечнику тварин у нормі. Після припинення введення ніпазолу на 7 добу (21 доба експерименту) кількість досліджених жирних кислот поверталася практично до вихідного рівня у нормі. На основі аналізу профілю коротколанцюгових жирних кислот із кількістю атомів карбону C2-C4 встановлено, що за введення ніпазолу щурам знижувалася частка оцтової кислоти і одночасно зростали частки масляної та пропіонової кислот. Отримані нами дані свідчать про те, що рівень коротколанцюгових жирних кислот у вмісті кишечника є важливим показником зміни складу мікробіоти травного тракту за впливу різних факторів.

Ключові слова: мікробіота, коротколанцюгові жирні кислоти, консерванти, ніпазол.

ВСТУП

Мікробіота травного тракту людини виконує низку важливих функцій як на місцевому, так і на системному рівнях, і основна їхня частина здійснюється за участю утворених нею продуктів обміну речовин. До таких низькомолекулярних метаболітів належать коротколанцюгові жирні кислоти (КЖК), які здійснюють багатofакторний вплив на фізіологічні процеси в клітинах кишечника і макроорганізму загалом. Наприклад, КЖК є основним джерелом енергозабезпечення епітеліальних клітин товстої кишки, впливають на їхню проліферацію, беруть участь у постачанні субстратів ліпо- та глюконеогенезу, підтриманні водно-електролітної рівноваги і мінерального

обміну, активації місцевого імунітету, запобігають пухлинній трансформації колоноцитів, регулюють детоксикаційну функцію печінки, моторику гладенької мускулатури, задіяні в ентерогепатичній циркуляції жовчних кислот та ін. [3–8, 18].

Порушення складу мікробіоти травного тракту, дисбіоз, супроводжується зміною спектра утворюваних нею метаболітів, у тому числі й КЖК. Надлишкове утворення цих сполук, як і зменшення їхнього вмісту негативно впливає на стан травної системи й організму людини загалом. Вважають, що кожне захворювання кишечника має свій специфічний спектр метаболітів мікроорганізмів, який достатньо чітко корелює з клінічними проявами хвороби [1, 2, 10]. Дослідження ролі КЖК у розвитку та прогресуванні патологій шлунково-кишкового тракту, а також локального і системного впливу низькомолекулярних метаболітів на організм людини дали змогу використовувати їх як діагностичні маркери низки захворювань кишечника, гепатобіліарної системи та підшлункової залози [5, 6, 10, 13].

На кількісний і якісний склад автохтонних представників мікробоценозу кишечника можуть впливати різноманітні фактори. Зокрема, безпосередній вплив має приймання антибіотиків, гормонів, ферментів, сорбентів тощо [17]. До речовин, які потрапляють у травний тракт людини з їжею і лікарськими засобами, належать антимікробні консерванти. Це сполуки, які додають у продукти харчування, фармацевтичні препарати, косметичні засоби та низку інших продуктів для запобігання розвитку в них мікроорганізмів. У більшості країн як антимікробні консерванти використовують метилові та пропілові естери *n*-гідроксибензойної кислоти (ніпагін, ніпазол). Антимікробна активність парабенів спрямована на широкий спектр грам-позитивних і грамнегативних бактерій, а також грибів, які спричиняють псування готової продукції [7].

Результати проведених нами досліджень довели, що внаслідок перорального введення тваринам 10 мг/кг ніпазолу змінюється не тільки чисельність, а й співвідношення та домінування мікроорганізмів певних родів, що належать до складу мікробоценозу товстого кишечника тварин. Зокрема, у складі порожнинної мікробіоти товстої кишки зменшується чисельність бактерій родів *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*, *Lactobacillus* і грибів роду *Candida*. За таких умов збільшується кількість представників родів *Proteus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* і *Fusobacterium*. У складі мікрофлори порожнини товстої кишки щурів, яким вводили ніпазол, виявляються лактозонегативні представники роду *Escherichia* і бактерії *Klebsiella* sp. [16].

Метою даної роботи було дослідити зміни складу КЖК у вмісті товстої кишки щурів за перорального введення тваринам 10 мг/кг ніпазолу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди було проведено на 20 щурах – самцях лінії Wistar, віком 8–10 тижнів, масою 150–200 г, яких утримували у стандартних умовах віварію біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка [11, 12]. Раціон містив спеціалізований сертифікований комбікорм ПК-120-1. Усі тварини належали до 4 класу чистоти за мікробіологічним статусом [12]. Дослідні щури упродовж 14 днів отримували по 10 мг/кг консерванту ніпазолу (перерахунок допустимої добової дози для людей), який вводили металевим зондом безпосередньо у шлунок. Контрольною групою були тварини, яким вводили водно-гліцериновий розчин (розчинник консерванту). Відбір проб вмісту товстого кишечника щурів проводили після

евтаназії тварин (передозованого наркозу за допомогою хлороформу) на 7, 14 та 21 добу експерименту (7 добу після припинення введення консерванту). У тварин обробляли операційне поле, стерильними ножицями по білій лінії живота робили розтин черевної порожнини, брали відрізок ободової кишки, з якого стерильним пінцетом у стерильних умовах видавлювали вміст [12].

Усі дослідження на тваринах проводили згідно з нормами, встановленими законом України № 3447-IV, 21.02.2006 “Про захист тварин від жорстокого поводження” та принципів “Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986).

Визначення жирних кислот проводили за методом Й. Ф. Рівіса та співавторів [15]. До 1 г рідкого вмісту товстого кишечника у скляній пробірці додавали 0,5 мл 33%-го водного розчину метафосфорної кислоти і 1 мкл бутанолу (останній слугував внутрішнім стандартом). Після добової витримки з пробірки відбирали 1 мкл надосадової рідини та вводили у випарювач газового хроматографа.

Кількісну концентрацію досліджуваної КЖК в абсолютних одиницях визначали за формулою:

$$X = [(P \times K \times C) / P_{\text{ст}}] \times 1000 \times n / P,$$

де X — кількісна концентрація досліджуваної КЖК в абсолютних одиницях, мг/кг; P — параметри піку досліджуваної КЖК, мм; K — поправочний коефіцієнт для досліджуваної КЖК; C — кількість добавленого внутрішнього стандарту (бутанол), мкл; $P_{\text{ст}}$ — параметри піку внутрішнього стандарту (бутанол), мм; 1000 — коефіцієнт перерахунку в абсолютні одиниці (кг); n — розведення досліджуваного зразка реактивами; P — наважка досліджуваного матеріалу, г [15].

Для досліджень використовували газовий хроматограф Agilent Technologies 7890A, колонку DB-FFAP, 30 м × 320 мкм × 1 мкм, швидкість гелію становила 1,5 мл/хв, температура детектора — 250 °С.

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили методом варіаційної статистики з визначенням середніх значень величин ($n = 5$), середньої похибки. Достовірність відмінностей між середніми значеннями під час проведення аналізу оцінювали, використовуючи критерій Стюдента (t). Відмінність між величинами вважали достовірною, коли ймовірність різниці $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

За допомогою хроматографічного розділення компонентів відібраних проб вмісту товстої кишки щурів нами ідентифіковано піки основних КЖК у вмісті товстої кишки щурів із таким порядком виходу карбонових кислот: оцтова, пропіонова, масляна, ізовалеріанова, валеріанова і капронова (рис. 1). Піки окремих кислот не накладалися та могли бути кількісно визначені. Для отримання кількісних даних проводили калібрування результатів хроматографічних досліджень методом внутрішнього нормування.

Дослідженням вмісту КЖК з'ясовано, що кількість жирних кислот у вмісті товстої кишки дослідних щурів на 7 і 14 доби експерименту є меншою в 1,5 і 2,6 рази, порівняно зі значенням цього показника у тварин, яким не вводили розчин ніпазолу. Встановлена певна динаміка змін кількості КЖК у вмісті кишечника щурів упродовж дослідження (7 доба введення → 14 доба введення → 21 доба (7 доба після припинення введення консерванту)).

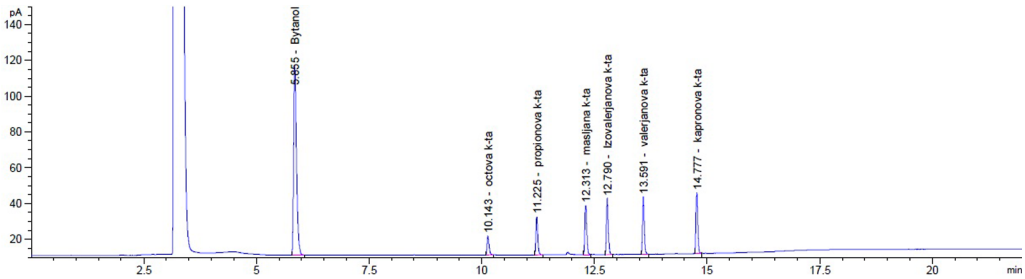


Рис. 1. Хроматограма коротколанцюгових жирних кислот у вмісті товстої кишки щурів у нормі (без введення розчину консерванту)

Fig. 1. Chromatogram of short chain fatty acids in the colonic content of rats in norm (without administration of preservative solution)

Як видно з рис. 2, А, на 7 і 14 доби експерименту кількість оцтової кислоти зменшується у 2,5 та 4,4 разу, відповідно, порівняно із рівнем цієї сполуки у тварин контрольної групи. На 7 добу після припинення введення консерванту значення цього показника статистично не відрізняється від визначеного в тварин у нормі. Із даних літератури відомо, що основними продуцентами оцтової кислоти у товстому кишечнику є бактерії родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Ruminococcus* [9, 14]. Як з'ясовано раніше проведеними дослідженнями складу мікробіоти товстого кишечника щурів за впливу 10 мг/кг ніпазолу, чисельність представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* за цих умов зменшується [16]. Це вказує на те, що концентрація оцтової кислоти у вмісті кишечника і чисельність бактерій, які її продукують, змінюються прямо пропорційно.

Відмінну динаміку змін кількості пропіонової, масляної, ізовалеріанової та валеріанової кислот виявлено за введення тваринам ніпазолу. Рівень пропіонової та масляної кислот на 7 добу дослідження зростає в 4,1 і 13,0 разів, порівняно з таким у вмісті кишечника тварин, яким не вводили ніпазол (рис. 2, Б, В). Кількість ізовалеріанової та валеріанової кислот за впливу ніпазолу збільшується в 5,5 і 6,4 разу та в 4,7 і 4,9 разу, відповідно, на 7 і 14 доби дослідження, порівняно з вмістом цих кислот у кишечнику тварин у нормі (рис. 2, Г, Д). Основними продуцентами пропіонової кислоти є бактерії родів *Veillonella*, *Propionibacterium*, *Arachnia*, *Anaerovibrio*; валеріанової, ізовалеріанової – *Megasphaera*, *Clostridium*; масляної – *Acidaminococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lachnospira*, *Butyrivibrio*, *Gemmiger*, *Coprococcus*, *Fusobacterium* [9, 14]. Концентрації перелічених жирних кислот за введення ніпазолу змінюються прямо пропорційно із виявленими збільшеннями чисельності таких мікроорганізмів як *Clostridium*, *Fusobacterium* у складі мікробіоти порожнини кишечника щурів [16].

Коливання кількості капронової кислоти у вмісті кишечника щурів протягом експерименту не були статистично значимими (рис. 2, Е).

Отже, на основі аналізу результатів дослідження абсолютного вмісту пропіонової, масляної, ізовалеріанової та валеріанової кислот у вмісті товстої кишки дослідних тварин встановлено збільшення концентрації цих кислот у разі введення консерванту, що може бути зумовлено змінами функціональної активності та/або чисельності резидентної анаеробної мікробіоти, зокрема бактерій родів *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacteroides*. Зниження концентрацій оцтової кис-

лот за таких умов, очевидно, залежить від зміни функціональної активності та/або чисельності резидентних мікроорганізмів, які населяють порожнину товстої кишки, зокрема представників родів *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*.

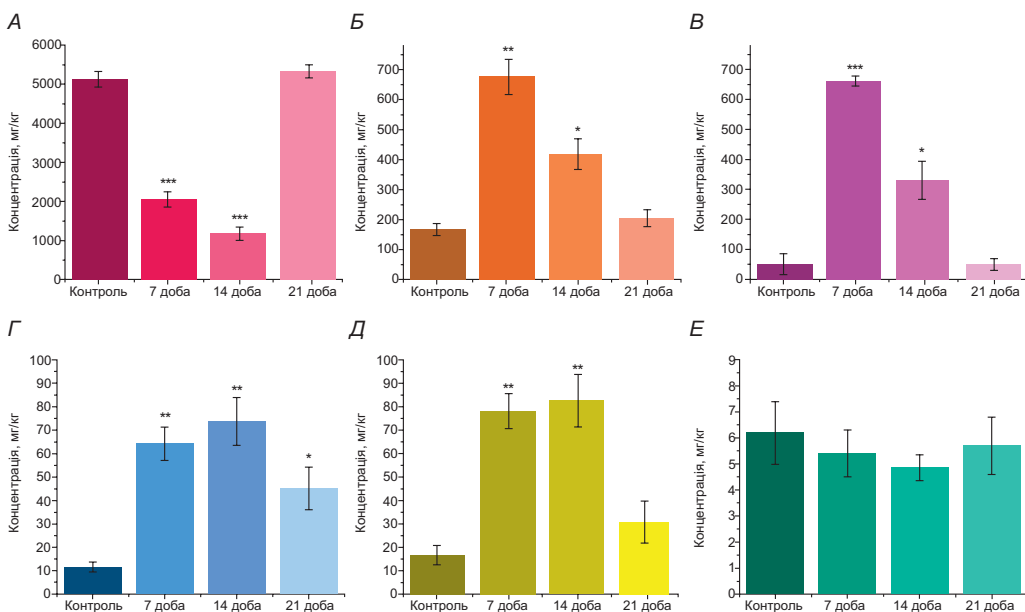


Рис. 2. Зміни концентрацій окремих коротколанцюгових жирних кислот у вмісті товстої кишки щурів за впливу ніпазолу: А – оцтова; Б – пропіонова; В – масляна; Г – ізовалеріанова; Д – валеріанова; Е – капронова кислоти.

Примітка: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ (наведено тільки статистично достовірні відмінності).

Fig. 2. Changes of some short chain fatty acids concentrations in the colon content of rats under the nipsol effect: А – acetic; Б – propionic; В – butyric; Г – isovaleric; Д – valeric; Е – caproic acids.

Comment: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ (shown only statistically significant difference).

Вміст досліджуваних жирних кислот на 7 добу після припинення введення ніпазолу (21 доба експерименту) практично не відрізняється від рівня КЖК у тварин контрольної групи (рис. 2). Це вказує на самовідновлювальний потенціал мікробіоти товстого кишечника. Очевидно, достатнім фактором для відновлення порушень, обумовлених вживанням консерванту, буде його відміна.

Основний вклад в загальний пул КЖК вносять оцтова, пропіонова та масляна кислоти. Тому низкою авторів запропоновано [1, 13] розраховувати профіль КЖК з числом атомів карбону C2-C4 (оцтова, пропіонова, масляна) за формулою:

$$rCn = Cn / (C_2 + C_3 + C_4).$$

Профіль КЖК, особливо із довжиною ланцюга атомів карбону 2–4, є чутливим параметром нозологічної приналежності. Проаналізовано профілі КЖК у вмісті товстої кишки дослідних тварин і встановлено зміни відносного вмісту окремих кислот, що може свідчити про зміни видового складу мікроорганізмів травного тракту, які продукують різні леткі жирні кислоти. Відомо, що мікробіота створює для епітелію товстої кишки як енергетичну, так і сировинну базу для синтезуючої діяльності. Порушення функцій кишечника зазвичай обумовлені негативним впливом на резидентні анаероби – продуценти КЖК [1, 8, 18].

Аналіз профілів C2-C4 КЖК показав зниження частки оцтової кислоти в 1,6 разу на 7 і 14 доби введення ніпазолу тваринам (див. таблицю). Проте за таких умов на 7 та 14 добу збільшується частка масляної та пропіонової кислот у 23,3 і 18,9 разу та 6,7 і 7,3 разу, відповідно. Клінічними та експериментальними дослідженнями деяких авторів з'ясовано, що за певних кишкових патологій відбувається різке зниження частки оцтової кислоти і збільшення відносного вмісту масляної та пропіонової кислот [1, 13]. За цих умов відбувається перехід метаболізму колоноцитів із циклу Кребса на гексозомонофосфатне шунтування. Це призводить до того, що колоноцити перестають всмоктувати й утилізувати КЖК, зокрема пропіонат і бутират. Відбувається порушення метаболітичних взаємовідносин макроорганізму й анаеробних резидентних мікроорганізмів [8, 13].

Профілі C2-C4 коротколанцюгових жирних кислот за введення щурам 10 мг/кг ніпазолу
C2-C4 short chain fatty acids profiles under administration of nipazol in 10 mg/kg dose

КЖК	Профілі C2-C4 КЖК			
	Контроль	7 доба	14 доба	21 доба
Оцтова	0,96	0,60	0,61	0,95
Пропіонова	0,03	0,20	0,22	0,03
Масляна	0,009	0,21	0,17	0,01

Отже, консервант ніпазол у концентрації 10 мг/кг впливає не тільки на якісний і кількісний склад представників мікробіоти кишечника досліджуваних тварин, а й на процеси метаболізму, які відбуваються за участю мікроорганізмів у цьому біотопі.

ВИСНОВКИ

На основі результатів проведених нами досліджень встановлено, що за перорального введення щурам 10 мг/кг ніпазолу у вмісті товстого кишечника тварин знижується рівень оцтової кислоти і збільшується кількість пропіонової, масляної, ізовалеріанової та валеріанової кислот, порівняно з рівнем цих сполук у кишечнику тварин у нормі. Після припинення введення ніпазолу на 7 добу (21 доба експерименту) вміст досліджуваних жирних кислот практично не відрізняється від рівня КЖК у тварин контрольної групи.

Доведена прямо пропорційна залежність між кількістю досліджуваних коротколанцюгових жирних кислот і чисельністю мікроорганізмів певних родів, які належать до складу нормальної мікробіоти кишечника тварин.

1. *Ardatskaya M. D., Minushkin O.N., Ikonnikov N.S.* Intestinal dysbiosis: definition, diagnostic approaches and ways of correction. Features and benefits of biochemical studies of feces: **Manual for doctors**. Moscow, 2004. 35 p. (In Russian).
2. *Babin V.N., Domaradskiy I.V., Dubinin A.V.* et al. Biochemical and molecular aspects of the symbiosis of man and him microflora. **Rus. Chem. Journal (JRS Mendeleev)**, 1994; 38(6): 66–78. (In Russian).
3. *Beloborodova N.V., Beloborodov S.M.* Metabolites of anaerobic bacteria (volatile fatty acids) and reactivity of the macroorganism. **Antibiotics and Chemotherapy**, 2000; 45 (2): 28–36. (In Russian).
4. *Clausen M.R., Mortensen P.B.* Kinetic studies on colonocyte metabolism of short chain fatty acids and glucose in ulcerative colitis. **Gut**, 1995; 37(5): 684–689.

5. Cook S. I., Selin J.H. Short-chain fatty acids in health and disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, 1998; 12: 499–507.
6. Cummings J.A. Short chain fatty acids in the human colon. **Gut**, 1981; 22(9): 763–779.
7. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A.L. **Antimicrobials in food**. New York: CRC Press. Taylor & Francis Group, 2005. 706 p.
8. Dubinin A.V., Babin V.N., Rayevskiy P.M. Trophic, regulatory communications of intestinal microflora and macroorganism (in the pathogenesis of irritable bowel syndrome). **Clinical Medicine**, 1991; 7: 24–28. (In Russian).
9. Hove H., Norgaard H., Mortensen B. Lactic acid bacteria and the human gastrointestinal tract. **Eur.-J.Clin. Nutr.**, 1999; 53(5): 339–350.
10. Il'ina N.O., Mazankova L.N., Kondrakova O.A., Zatevalov A.M. Metabolic criteria of intestinal dysbiosis in acute intestinal infections in children. **Pediatrics**, 2006; 8(1): 89–94. (In Russian).
11. Kozhem'yakin Y.M. **Scientific and practical advice on maintenance of laboratory animals and work with them**. Kyiv: Avicenna, 2002. 156 p. (In Ukrainian).
12. Kotsyumbas I.J. **Preclinical studies of veterinary drugs**. Lviv: Triada Plus, 2006. 360 p. (In Ukrainian).
13. Kovalenko S.V., Dorofeyev A.E., Ardatska M.D. et al. Peculiarities of changes of short-chain fatty acids levels in the feces, sputum and bronchial mucous membrane in patients with chronic obstructive pulmonary disease and irritable bowel syndrome. **Clin. and Experim. Pathology**, 2012; 11(4): 71–76. (In Ukrainian).
14. O'leary W.M. The fatty acids of bacteria. **Bacteriol Rev**, 1962; 26(4): 421–447.
15. Rivis Y.F., Fedoruk R.S. **Quantitative chromatographic methods for determination of some lipids and fatty acids in biological material**. Lviv: Spolom, 2010. 110 p. (In Ukrainian).
16. Skochylyas N., Kolisnyk Ya. Effect of nipasol on composition of luminal microflora in large intestine of rats. **Studia Biologica**, 2013; 7(3): 161–168. (In Ukrainian).
17. Shenderov B.A. **Medical microbial ecology and functional nutrition**. Vol. 1. Humans and animals microflora and its function. M.: Publishing Grants, 1998. 288 p. (In Russian).
18. Topping D. L., Clifton P.M. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. **Physiological Reviews**, 2001; 81(3): 1031–1064.

SHORT CHAIN FATTY ACIDS PATTERN IN RAT INTESTINE CONTENT UNDER NIPASOL EFFECT

Ya. I. Kolisnyk, V. V. Lytvyn, N. B. Skochylyas

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: kolyaryna@ukr.net

The qualitative and quantitative composition of the short chain fatty acids (SFA) (acetic, propionic, butyric, isovaleric, valeric and capric) in the colonic content of the rats, which were orally given preservative nipasol (10 mg/kg) has been studied. It was shown that the content of acetic acid was lower on the 7-th and 14-th days of the experiment in comparison with control group of animals. The amount of propionic and butyric acids in the colonic content was increased on the 7-th day, but on the 14-th days of the experiment it was decreased, however, this amount was higher, than in control group of rats. Concentrations of isovaleric and valeric acids on the 7-th and 14-th days of the experiment exceeded normal limits. After cessation of nipasol introduction on the 7-th day (21-th day of the experiment) the amount of fatty acids almost returned to baseline. Analysis of C₂-C₄-acids profile after nipasol introduction revealed a decrease in the concentration of acetic acid and an increase in the levels of butyric and propionic acids.

Obtained results provide a possibility to suggest that the level of SFA in the colonic content is an important indicator of changes in gastrointestinal microocenosis under the influence of different factors.

Keywords: microbiota, short chain fatty acids, preservatives, nipazol.

СПЕКТР КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В СОДЕРЖИМОМ КИШЕЧНИКА КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ НИПАЗОЛА

Я. И. Колиснык, В. В. Литвин, Н. Б. Сковчиляс

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко,
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: kolyaryna@ukr.net*

Исследован качественный и количественный состав короткоцепочечных жирных кислот (уксусной, пропионовой, масляной, изовалериановой, валериановой и капроновой) в содержимом толстой кишки крыс, которым перорально вводили 10 мг/кг antimicrobial консерванта нипазола. Установлено, что на 7 и 14 сутки эксперимента уменьшается содержание уксусной кислоты, по сравнению с таковым у животных контрольной группы. Количество пропионовой и масляной кислот на 7 сутки введения нипазола растет, на 14 сутки эксперимента содержание этих кислот снижается, однако остается выше, по сравнению с таковым у животных, которым не вводили консервант. Концентрации изовалериановой и валериановой кислот на 7 и 14 сутки исследования были выше по сравнению с содержанием этих кислот в кишечнике животных в норме. После прекращения введения нипазола на 7 сутки (21 сутка эксперимента) содержание исследованных жирных кислот возвращалось практически к исходному уровню в норме. На основе анализа профиля короткоцепочечных жирных кислот с числом атомов углерода C2-C4 кислот установлено, что при введении нипазола крысам снижалась доля уксусной кислоты и одновременно возрастали доли масляной и пропионовой кислот. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что уровень короткоцепочечных жирных кислот в содержимом кишечника является важным показателем изменения состава микробиоценоза пищеварительного тракта при воздействии различных факторов.

Ключевые слова: микробиота, короткоцепочечные жирные кислоты, консерванты, нипазол.

Одержано: 10.10.2014