

УДК 616.345-006.6-092

Короткоцепочечные жирные кислоты в слизистой оболочке толстой кишки и кишечном содержимом у больных раком толстой кишки: патогенетические и диагностические аспекты

С.Н. Топчий¹, М.Д. Ардатская², Н.А. Башанкаев¹,
Е.М. Липницкий¹, О.Н. Минушкин²

(¹Кафедра хирургии медико-профилактического факультета Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, ²кафедра гастроэнтерологии Учебно-научного центра Медицинского центра Управления делами Президента РФ)

Изучалось содержание короткоцепочечных жирных кислот (КЖК) у больных раком толстой кишки (РТК) в слизистой оболочке толстой кишки (СОТК) и кале методом газожидкостного хроматографического (ГЖХ) анализа. Исследования выполнены у 82 пациентов, оперированных по поводу РТК с правосторонней (24) и левосторонней (58) локализацией опухоли. Гистологически выявлялась аденокарцинома различной степени дифференцировки. Контрольную группу составили 40 практически здоровых лиц.

Полученные данные продемонстрировали характерные изменения качественного состава КЖК в СОТК у больных РТК в зависимости от локализации, степени дифференцировки опухоли и степени инвазии ею стенки кишки. Однонаправленность обнаруженных изменений позволяет предложить исследования метаболитов в кале в качестве скринингового метода диагностики РТК.

Ключевые слова: рак толстой кишки, короткоцепочечные жирные кислоты, патогенез, диагностика, микробиоценоз.

Причины возникновения рака толстой кишки в достаточной степени остаются не изученными. Сегодня большинство исследователей во всем мире признают РТК полиэтиологическим заболеванием. Скорее всего, к его развитию приводит сочетание нескольких неблагоприятных факторов, в числе ведущих — диета со сниженным содержанием пищевых волокон, условия внешней среды, хронические заболевания толстой кишки и наследственность [7].

«Золотым стандартом» диагностики РТК является эндоскопический метод с морфологическим исследованием биоптатов. Однако получение необходимых данных не всегда возможно вследствие инвазивности используемых методов, сложности как подготовки больных к исследованию, так и его проведения [4]. Поэтому идет активный поиск простых неинвазивных способов ранней диагностики, определяющих показания к проведению эндоскопического исследования.

В последнее время многие исследователи пристальное внимание уделяют низкомолекулярным метаболитам, продуцируемым индигенной микрофлорой толстой кишки (главным образом анаэробами) при ферментации углеводов и белков, — в частности короткоцепочечным жирным кислотам. КЖК оказывают многофакторное влияние на физиологию клеток кишечника и макроорганизма в целом. Доказано их участие в энергообеспечении эпителия, поставке

субстратов липо- и глюконеогенеза, поддержании ионного обмена, осуществлении антибактериального эффекта и блокировке адгезии патогенов, активации местного иммунитета и др. КЖК (в основном бутират) относятся к важным факторам роста и дифференцировки колоноцитов: подавляют пролиферацию и стимулируют дифференцировку [13, 14]. Установлена возможность их использования в качестве маркеров, отображающих состояние микрофлоры, для диагностики заболеваний желудочно-кишечного тракта [1, 8].

В последние годы широкое распространение для исследования КЖК в различных биологических субстратах получил метод газожидкостного хроматографического анализа. Метод имеет ряд преимуществ: простота воспроизведения, возможность быстрого получения данных [5].

Цель исследования: изучить у больных раком толстой кишки содержание короткоцепочечных жирных кислот в слизистой оболочке толстой кишки и кале методом ГЖХ-анализа.

Материал и методы исследования

Исследования выполнены у 52 пациентов (32 женщины и 20 мужчин), оперированных по поводу рака толстой кишки. Больные были в возрасте от 61 до 81 года. У 14 человек опухоль локализовалась в слепой и восходящем отделе ободочной кишки, у 6 — в нисходящем, у 26 — в сигмовидной ободочной кишке, у 6 — в ректосигмоидном отделе. В связи с этим в 14 случаях выполнена правосторонняя гемиколэктомия, в 14 — левосторонняя гемиколэктомия, в 16 — резекция сигмы (в 4 из них с наложением колостомы), в 8 — передняя резекция прямой кишки. При гистологическом исследовании выявлена аденокарцинома толстой кишки различной

степени дифференцировки (высокодифференцированная — 25, умереннодифференцированная — 20, низкодифференцированная — 7). Распространенность опухолевого процесса была следующей: I — у 2 больных, IIА — у 4, IIIА — у 36, IIIБ — у 10.

Контрольную группу составили 30 практически здоровых лиц, у которых в результате полного клинического обследования не было выявлено патологии, и 10 больных, которым выполнена резекция ТК по поводу травматических повреждений.

Методом ГЖХ-анализа были определены КЖК (уксусная, пропионовая, изомасляная, масляная, изовалериановая, валериановая, изокапроновая и капроновая) в СОТК и кале у больных РТК, а также в СОТК (диагностическая колоноскопия с биопсией и интраоперационные биоптаты) и кале у практически здоровых лиц.

Результаты исследования и их обсуждение

Абсолютное содержание КЖК в СОТК у больных с РТК практически не было изменено по сравнению с группой контроля, однако имело тенденцию к снижению — суммарное содержание КЖК (C_2-C_4) соответственно 0,417–0,478 мг/г.

В процессе изучения абсолютного содержания КЖК в зависимости от локализации опухоли обнаружено повышение их суммарной абсолютной концентрации при нахождении очага в правых отделах (слепая, восходящая кишка) — $0,641 \pm 0,091$ мг/г по сравнению с левосторонней локализацией (нисходящая, сигмовидная, ректосигмоидный отдел) — $0,413 \pm 0,085$ мг/г.

Были рассчитаны профили КЖК, под которыми подразумевается относительное содержание отдельных кислот в общем пуле кислот с длиной углеродных атомов C_2-C_4 , т. е. долевое участие каждой кислоты (pC_n):

$$pC_n = \frac{C_n}{C_2 + C_3 + C_4} .$$

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

Результаты изучения профилей КЖК C_2-C_4 в норме, а также в зависимости от локализации опухоли, в образцах выше и ниже опухоли приведены в табл. 1 и 2. Установлено, что в норме в профиле кислот отмечается доминирование масляной кислоты в левых отделах и пропионовой кислоты в правых отделах в общем пуле кислот. У больных РТК профиль кислот в интактной слизистой оболочке (выше и ниже опухоли) с лево- и правосторонней локализацией достоверно не отличается от показателей нормы в соответствующих отделах толстой кишки. В образцах опухоли при левосторонней локализации достоверно повышен уровень пропионовой и масляной кислот, при правосторонней — изолированно уровень масляной кислоты.

Помимо этого изучались профили КЖК и отношение содержания изоокислот (изо C_n , изо C_5) к кислотам (C_n , C_5) в СОТК в зависимости от глубины прорастания опухолью кишечной стенки (критерий Т по системе TNM, международная классификация, 1997). Мы выделили две группы больных, причем в первой группе при гистологическом исследовании опухоль не выходила за пределы кишечной стенки (Т1–3), во второй — инфильтрировала все слои кишки и прорастала в соседние органы (Т4). Результаты изучения представлены в табл. 3, из которой видно, что у больных с более выраженной инвазией опухолью стенки кишки (Т4) отмечается повышение уровня масляной кислоты, а также показателей соотношения изоокислот к кислотам, коррелирующее со

Таблица 1

Профили КЖК $C_2 - C_4$ и отношение содержания отдельных изокилот (изо C_n , изо C_5) к кислотам (C_n , C_5) в СОТК у больных с левосторонней локализацией опухоли, мг/г

Участок исследования	pC_2	pC_3	pC_4	Е	ЕiC/EC	IC ₅ /C ₅
Норма	0,779±0,004	0,134±0,01	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	0,41±0,001	1,11±0,21	5,73±0,93
Опухоль	0,736±0,002	0,159*±0,01	0,105*±0,002	0,35±0,001	1,023±0,21	3,153±0,93
Ниже опухоли	0,780±0,002	0,130±0,002	0,089±0,004	0,46±0,002	1,227±0,22	6,79±0,98

* $p < 0,05$.

Таблица 2.

Профили КЖК $C_2 - C_4$ и отношение содержания отдельных изокилот (изо C_n , изо C_5) к кислотам (C_n , C_5) в СОТК у больных с правосторонней локализацией опухоли, мг/г

Участок исследования	pC_2	pC_3	pC_4	Е	ЕiC/EC	IC ₅ /C ₅
Норма	0,754±0,01	0,179±0,011	0,067±0,01	0,53±0,5	1,22±0,04	7,7±0,93
Выше опухоли	0,766±0,02	0,173±0,031	0,065±0,009	0,51±0,5	1,6±0,01	6,35±0,95
Опухоль	0,725±0,051	0,182±0,022	0,093±0,011*	0,42±0,11	1,357±0,011	3,43±0,99
Ниже опухоли	0,751±0,031	0,181±0,032	0,068±0,011	0,49±0,21	1,14±0,014	6,29±1,531

* $p < 0,05$.

стадий нарастания инвазии опухоли.

Вышеприведенные показатели КЖК изучались также в зависимости от степени дифференцировки опухоли (табл. 4). Отмечено, что при снижении степени дифференцировки повышается доля масляной и пропионовой кислот, при этом соотношения изокилот к кислотам не имеют достоверных отличий.

Изменения абсолютных концентраций КЖК, возможно, связаны с особенностями метаболизма опухолей. Для опухолевых клеток типичен аэробный гликолиз — гликолитическое расщепление глюкозы до лактата в присутствии кислорода. Дефицит аденозинтрифосфорной

кислоты, обусловленный нарушением образования конденсата пируват-ацетил-коА, компенсируется ускорением распада глюкозы. Гликолиз в опухолевых клетках служит основным источником энергии, и таким образом все вышеуказанное сказывается на изменениях содержания КЖК [3].

Повышение уровня масляной кислоты как непосредственно в опухоли, так и в зависимости от степени ее прорастания и дифференцировки у больных с аденокарциномой толстой кишки, вероятно, связано с уменьшением утилизации бутирата колонocyтами («метаболический блок окисления» масляной кислоты) в условиях изменения метаболиз-

ма в опухолевых клетках. Установлено, что этот процесс инициируется и/или усугубляется интестинальной потерей жидкости и нарушением обмена ионов водорода и натрия, повышенным образованием сернистого водорода, являющегося ингибитором метаболизма масляной кислоты, а также переключением метаболизма колоноцитов на использование глутамин в качестве энергетического субстрата [8].

Полученные данные подтверждаются данными других авторов, изучавших протективную роль бутирата при РТК [11,12].

Повышение уровня изокилот при нарастании степени инвазии опухоли, по-видимому,

Таблица 3.

Профили КЖК $C_2 - C_4$ и отношение содержания отдельных изокилот (изо C_n , изо C_5) к кислотам (C_n , C_5) в СОТК у больных РТК в зависимости от стадии опухоли по критерию Т, мг/г

Стадия опухоли	pC_2	pC_3	pC_4	Е	ЕiC/EC	IC ₅ /C ₅
Норма	0,766±0,01	0,156±0,011	0,077±0,01	0,489±0,222	1,5±0,04	6,89±0,13
T1-3	0,759±0,021	0,142±0,012*	0,099±0,021*	0,323±0,211	1,929±0,01	5,689±0,15
T4	0,728±0,03	0,162±0,012*	0,110±0,03*	0,633±0,209	2,217±0,019*	7,664±0,19*

* $p < 0,05$.

Таблица 4

Профили КЖК $C_2 - C_4$ и отношение содержания отдельных изокислот (изо C_n , изо C_5) к кислотам (C_n , C_5) в СОТК у больных РТК в зависимости от степени дифференцировки опухоли, мг/г

Степень дифференцировки опухоли	pC_2	pC_3	pC_4	Е	EiC/EC	IC ₅ /C ₅
Высоко	0,763±0,01	0,152±0,01**	0,085±0,01**	0,42±0,01	1,189±0,01	6,514±0,01
Умеренно	0,67±0,02	0,209±0,01**	0,12±0,01**	0,312±0,01	1,103±0,01	6,296±0,01
Низко	0,58±0,02	0,224±0,01**	0,168±0,01**	0,972±0,01	1,093±0,01	6,006±0,01

* $p < 0,05$.

Таблица 5

Профили КЖК $C_2 - C_4$, отношение содержания отдельных изокислот (изо C_n , изо C_5) к кислотам (C_n , C_5) и анаэробные индексы в фекалиях у больных с различной локализацией опухоли, мг/г

Локализация опухоли	pC_2	pC_3	pC_4	Е	EiC/EC	IC ₅ /C ₅	AI
Норма	0,634±0,004	0,189±0,001	0,176±0,004	9,42±1,35	0,430±0,040	1,471±0,130	-0,576±0,012
Левосторонняя	0,539±0,003	0,241±0,001*	0,221±0,002*	5,33±0,001	0,83±0,03	2,622±0,12	-0,857±0,011*
Правосторонняя	0,528±0,003	0,191±0,002	0,281±0,002*	5,18±0,001	0,418±0,02	1,676±0,11	-0,894±0,012*

* $p < 0,05$.

Таблица 6

Профили КЖК $C_2 - C_4$, отношение содержания отдельных изокислот (изо C_n , изо C_5) к кислотам (C_n , C_5) и анаэробные индексы в фекалиях у больных РТК в зависимости от стадии опухоли по критерию Т, мг/г

	pC_2	pC_3	pC_4	Е	EiC/EC	IC ₅ /C ₅	AI
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
T1-3	0,608±0,003	0,191±0,001*	0,201±0,002*	4,369±0,001	0,587±0,021*	2,432±0,12*	-0,644±0,011*
T4	0,581±0,003	0,199±0,002	0,220±0,002*	4,588±0,001	0,923±0,029*	4,327±0,11*	-0,721±0,012*

* $p < 0,05$.

вызвано, с одной стороны, разрушением пристеночного слоя в области опухоли и нарушением муцинообразования, с другой, активацией белкового синтеза, особенно ядерных белков гистоновой и негистоновой природы. Экспериментально доказано, что вокруг опухоли идет процесс воспалительной пролиферации, которая сопровождается ростом уровня альфа-1-гликопротеинов, участвующих в фибриллогенезе коллагена [3].

Как известно, к факторам, регулирующим пролиферацию, относятся циклические нуклеотиды, причем цАМФ подавляет пролиферацию и способствует дифференцировке клеток, а цГМФ стимулирует пролиферацию. В литературе имеются данные о более низком содержании цАМФ в опухоли толстой кишки [9,10]. Учитывая факт сопряженности содержания про-

пионовой кислоты и цАМФ [3], повышение доли пропионовой кислоты может объясняться снижением степени дифференцировки опухоли.

Результаты изучения профилей КЖК $C_2 - C_4$ и соотношения изокислот к кислотам в фекаль-

ных образцах при различной локализации опухоли и в зависимости от степени прорастания ею кишечной стенки приведены в табл. 5 и 6. Как видно из представленных данных, отмечается одновременное увеличение долей пропионовой и масля-

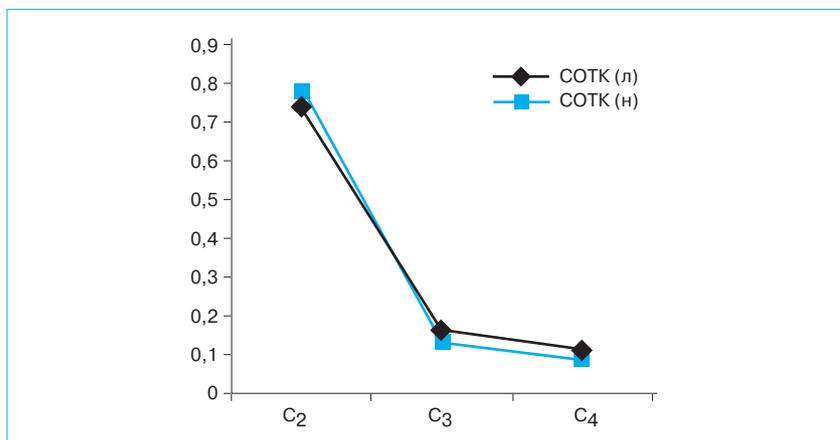


Рис. 1. Профили КЖК $C_2 - C_4$ в СОТК у больных с левосторонней локализацией опухоли

Примечание. Здесь и на следующих рисунках «н» — норма.

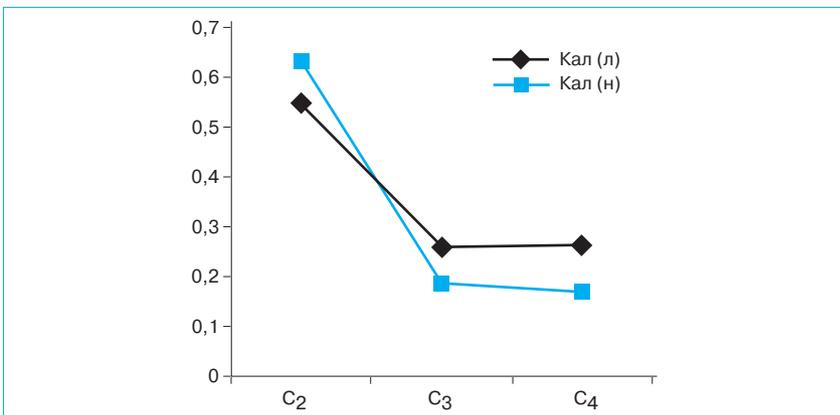


Рис. 2. Профили КЖК C₂–C₄ в кале у больных с левосторонней локализацией опухоли

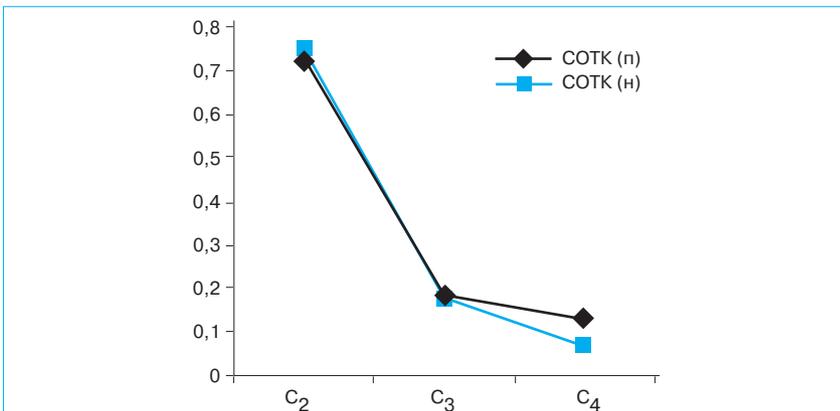


Рис. 3. Профили КЖК C₂–C₄ в СОТК у больных с правосторонней локализацией опухоли

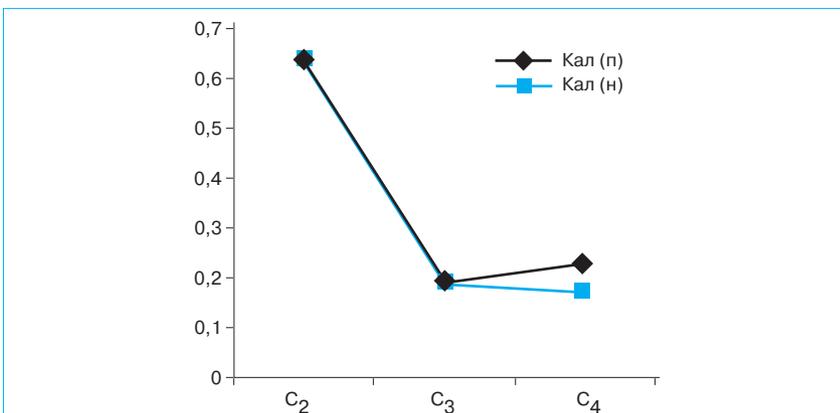


Рис. 4. Профили КЖК C₂–C₄ в кале у больных с правосторонней локализацией опухоли

ной кислот при левосторонней локализации опухоли и повышение доли масляной кислоты при снижении доли пропионо-вой кислоты в случае правосторонней локализации, что соотносится с результатами, полученными при изучении КЖК в СОТК (рис. 1–4). При увеличении степени прорастания опухоли кишечной стенки повышается

концентрация масляной кислоты и изокислот, что также соотносится с результатами при изучении КЖК в СОТК (рис. 5 и 6).

Профили и показатели абсолютного содержания КЖК в кале в зависимости от локализации опухоли могут быть объяснены тем, что в правых и левых отделах толстой кишки утилиза-

ция и абсорбция КЖК различны, а микрофлора, продуцирующая данные метаболиты, представлена разными популяциями [6,13]. Известно, что основное количество КЖК образуется в правых отделах толстой кишки, где концентрация питательных веществ, бактериальный рост и ферментативная активность микрофлоры значительно выше. В свою очередь, утилизация КЖК более активно происходит в левых отделах кишки [13].

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. Такое изменение стратегии метаболизма приводит к тому, что меняется трофическая база колоноцитов. Последние перестают всасывать и утилизировать КЖК, в первую очередь пропионат и бутират, и начинают использовать для своего дыхания эндогенный метаболит — глюкозу. Все вышеизложенное 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 бактероиды, клостридии и др. Кроме того, резкое повышение продукции изокислот, и особенно изовалериановой кислоты у больных со стадией T4, может характеризовать деструкцию приэпителиального и эпителиального слоев 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 протео-

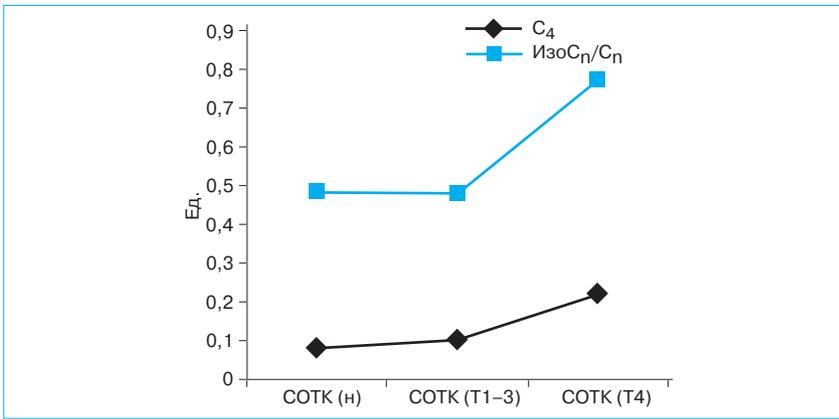


Рис. 5. Профили C₄ и отношение изоС_n/С_n в СОТК в зависимости от стадии опухоли по критерию Т

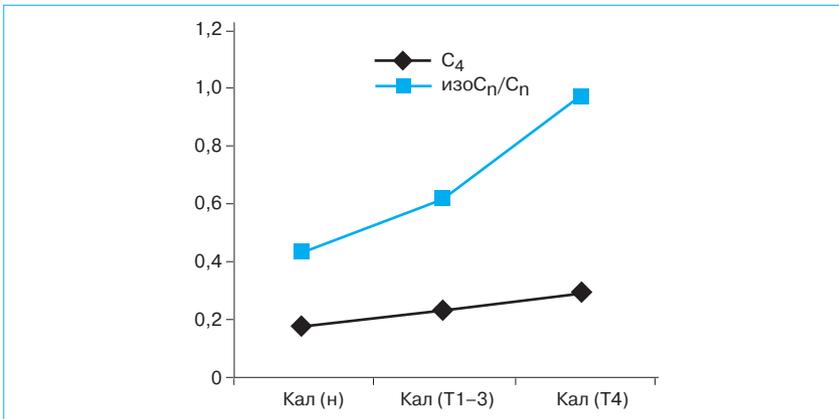


Рис. 6. Профили C₄ и отношение изоС_n/С_n в кале в зависимости от стадии опухоли по критерию Т

литической микрофлоры, утилизирующей белки и продуцирующей изомеры КЖК. 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.) [1].

Список литературы

1. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта: Дис. ... д-ра мед. наук. – М., 2003. – 299 с.
2. Блохина Н.Г., Пискунова Т.В., Киркин Б.В., Чижиков Б.А. Исследование циклических нуклеотидов при раке, полипах толстой кишки и неспецифических колитах // Вестн. АМН СССР. – 1985. – № 3. – С. 74–77.
3. Бышевский А.Ш., Терсенов О.А. Биохимия для врача. – Екатеринбург: Уральский рабочий, 1994.
4. Ганс Фромм, Майкл Б. Алберт. Раннее выявление колоректального рака // Рос. жур. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 1998. – Т.7, №4. – С. 79–82.
5. Иконников Н.С., Ардатская М.Д., Дубинин А.В. и др. Патент РФ

- «Способ разделения смеси жирных кислот фракции С2–С7 методом газожидкостной хроматографии» № 2145511 от 9.04.1999 г.
6. Осина В.А. Абсорбционная функция толстой кишки в норме и при патологии // Экспер. и клин. гастроэнтерол. – 2002. – № 1. – С. 81–85.
7. Основы колопроктологии: Учебное пособие / Под ред. Г.И. Воробьева. – Ростов н/Д, 2001.
8. Семенова Э.Э. Короткоцепочечные жирные кислоты толстокишечной микрофлоры у больных неспецифическим язвенным колитом, их значение в формировании клиники и диагностике.: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2002.
9. Федоров Н.А. Циклические пуриновые нуклеотиды 3,5-АМФ и 3,5-ГМФ как факторы регуляции пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток // Успехи

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

Выводы

1. Изменения качественного состава КЖК в СОТК у больных РТК указывают на специфические изменения метаболизма опухолевых клеток, выражающиеся в нарушении утилизации масляной кислоты.
2. Изменения качественного состава КЖК в СОТК имеют характерные особенности в зависимости от локализации опухоли и коррелируют со степенью ее дифференцировки и степенью инвазии стенки толстой кишки.
3. Качественные изменения КЖК в СОТК и кале носят однонаправленный характер, что позволяет предложить исследование метаболитов в кале в качестве скринингового метода диагностики РТК.

- соврем. биол., – 1975. – Т. 79, вып. 2. – С. 225–240.
10. 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. – Vol. 57. – P. 641–649.
11. Emenaker N.J., Basson M.D. Short chain fatty acids differentially modulate cellular phenotype and c-mycoprotein levels in primary human nonmalignant and malignant colonocytes // Dig. Dis. Sci. – 2001. – Vol. 46, N 1. – P. 96–105.
12. Emenaker N.J., Calaf G.M., Cox D. et al. 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. – Vol.131 (suppl 11). – P. 3041–3046.

13. Short Chain Fatty Acides // Congress Short Report Falk Symposium, comp. by Scheppach W. – Strasbourg, 1993. – 50 p.
14. *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. – Vol.46. – P. 507–514.

Short-chain fatty acids at the mucosa and contents of large intestine in patients with colorectal cancer: pathogenetic and diagnostic aspects

Topchy S.N., Ardatskaya M.D., Bashankayev N.A., Lipnitsky Ye.M., Minushkin O.N.

Contents of short-chain fatty acids (SCFA) at patients with colorectal cancer (CRC) in the large intestine mucosa (LIM) and feces was studied by the method of gas-liquid chromatography (GLCG) analysis. Investigation was carried out in 82 patients, that underwent surgery for CRC, with right-side (24) and left-hand (58) location of tumor. Adenocarcinoma of different differentiation degrees was diagnosed by histology. The control group included basically healthy 40 persons.

Obtained data have shown characteristic changes of SCFA qualitative content at LIM in patients with CRC according to localization of tumor, degree of its differentiation and stage of intestinal wall invasion. The definite pattern of the changes allows to look for metabolites in feces as a CRC screening method.

Key words: colorectal cancer, short-chain fatty acids, pathogenesis, diagnostics, microbiocenosis.