



¹ Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук, Москва

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

³ Центр хранения и анализа больших данных, Москва

Хеомикробиомный анализ синергизма D-маннозы и D-фруктозы в сравнении с другими метабиотиками

И.Ю. Торшин, к.ф.-м.н.¹, А.Н. Галустян, к.м.н.², М.И. Иванова³, А.К. Хаджидис, к.м.н.², О.А. Громова, д.м.н., проф.¹⁻³

Адрес для переписки: Ольга Алексеевна Громова, olga_gromova@rambler.ru

Для цитирования: Торшин И.Ю., Галустян А.Н., Иванова М.И. и др. Хеомикробиомный анализ синергизма D-маннозы и D-фруктозы в сравнении с другими метабиотиками // Эффективная фармакотерапия. 2020. Т. 16. № 20. С. 22–31.

DOI 10.33978/2307-3586-2020-16-20-22-31

В статье представлены результаты сравнительного хеомикробиомного анализа D-маннозы, лактулозы, сорбита, ксилита и D-фруктозы (структурной основы инулина), проведенного с помощью современных технологий анализа больших данных. Для каждой из исследованных молекул получены оценки значений площади под нормализованной кривой роста для репрезентативной выборки микробиоты человека, включившей 38 бактерий-комменсалов, в том числе бифидо- и лактобактерии. Вычислены значения минимальной подавляющей концентрации для 42 болезнетворных (бактериальных и грибковых) микроорганизмов. Ранее были установлены высокая эффективность и безопасность использования D-маннозы в терапии цистита: блокируя фимбрии болезнетворных бактерий (например, уропатогенные штаммы *Escherichia coli*), D-манноза тормозит развитие инфекций мочеполовых путей. В ходе хеомикробиомного анализа показано, что по сравнению с другими метабиотиками D-манноза меньше способствует росту условно патогенных бактерий микробиома человека и больше стимулирует рост *Bifidobacterium longum subsp. longum*, продуцирующих масляную кислоту и другие короткоцепочечные жирные кислоты. Результаты хеомикробиомного анализа указывают на перспективность дополнения метабиотических эффектов D-маннозы эффектами инулина, образованного из молекул D-фруктозы, для активизации синтеза короткоцепочечных жирных кислот, поддержки врожденного иммунитета и роста полезных штаммов *Escherichia coli*.

Ключевые слова: микробиом человека, пребиотики, метабиотики, хеоминформатика, площадь под кривой, Экоцистин

Введение

Состояние микробиоты кишечника тесно связано со здоровьем всего организма человека. Оздоровление микробиоты кишечника важно не только для желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), но и для кожи и мочеполовой системы. Физиологический баланс может поддерживаться посредством пробиотиков (микроорганизмов, используемых в терапевтических целях) или особых низкомолекулярных соединений, тонко модули-

рующих метаболизм микробиоты. Для обозначения таких соединений или их смесей применяются разнообразные термины: «пребиотики», «метабиотики», «конбиотики», «нутрицевтики», «функциональное питание» и т.д. [1].

Понятие «пребиотик» в настоящее время проходит стадию ревизионизма [2] и определяется как «субстрат, селективно используемый микроорганизмами организма-хозяина и приносящий пользу здоровью»

[3, 4]. Подобное определение, несмотря на кажущуюся простоту и очевидность, порождает комплекс противоречий между клинической медициной и микробиологией. По сути, оно подменяет идею объективного микробиологического исследования воздействия низкомолекулярных веществ на микробиоту (о чем будет сказано далее) идеей, схожей с концепцией доказательности в медицине. Как известно, доказательная медицина при принятии решений



в клинической практике призывает ориентироваться на исследования с некоторой произвольно определяемой статистической значимостью. В этом смысле, по мнению ряда выдающихся международных экспертов, «доказательность имеет довольно узкое значение и крайне уязвима к обоснованным упрекам в том, что отражает не объективную реальность, а всего лишь устоявшееся мнение» [5]. Зачастую в области «доказательности» используются устаревшие или просто ошибочные подходы к анализу данных [6], которые к тому же полностью пренебрегают результатами исследований функциональной геномики [7], микробиомики и методами анализа больших данных [8]. Поэтому с точки зрения приведенного ранее «ревизионистского» определения пребиотиков традиционные пребиотики (фруктоолигосахариды, инулин, галактаны и др.) могут перестать быть таковыми, если в каком-то метаанализе вдруг будет заявлено об «отсутствии достоверного клинического эффекта» (то есть уже упоминавшейся пользы для здоровья).

Целям настоящей статьи наиболее отвечает термин «метабиотик» [9]. Под метабиотиками понимаются молекулы с определенной химической структурой, которые способны оптимизировать специфичные для организма-хозяина физиологические функции, связанные с деятельностью симбиотической микробиоты. В соответствии с данными функциональной геномики, метабиотиками могут быть миллионы веществ [10]. Кроме того, концепция метабиотиков, предложенная Б.Я. Шендеровым и соавт., не содержит внутренних противоречий, находится в полном согласии с методологией микробиологии, позволяет учитывать данные современной геномики и микробиомики [1, 9]. Особенно важно подчеркнуть, что концепция метабиотиков в принципе не может вступить в противоречие с клинической медициной. Метабиотики как вещества, способствующие росту физиологической микробиоты, могут существенно различаться по воздействию на

различных представителей микробиома, а значит, и по фармакологическим свойствам (например, интенсивности проявления основного эффекта, выраженности побочных реакций – метеоризма, флатуленции и др.) [11]. Поэтому комплексная оценка эффектов того или иного метабиотика должна включать исследование влияния этого метабиотика на микробиом в целом.

Такого рода комплексная оценка эффектов метабиотиков может быть проведена посредством роботизированных микробиомных скринингов роста бактерий *in vitro* [12] – экспериментальной процедуры, доступной только в отдельных исследовательских центрах. Альтернативой дорогостоящим и практически недоступным роботизированным скринингам выступает хемомикробиомный скрининг, направленный на оценку активностей исследуемой молекулы по отношению к заданной выборке представителей микробиома. Хемомикробиомный анализ свойств потенциальных метабиотиков проводится на основании нахождения молекул, структурно схожих с исследуемым метабиотиком. Затем посредством современных методов машинного обучения (искусственного интеллекта) выполняются количественные расчеты свойств метабиотиков.

Известны различные молекулы метабиотиков. Например, лактулоза метаболизируется микробиотой толстого кишечника, закисляя среду, благодаря чему тормозится рост патогенных бактерий и увеличивается нейтрализация аммиака, улучшается всасывание кальция и магния [13]. В пищевой и фармацевтической промышленности повсеместно используются такие заменители сахара, как D-фруктоза (структурная единица метабиотического полисахарида инулина), ксилит (пищевая добавка E967), сорбит (пищевая добавка E420), которые тоже проявляют метабиотические свойства [14].

Метабиотик D-манноза – эндогенный моносахарид, необходимый для N-гликозилирования около 30% белков протеома человека [15] и участвующий в «тонкой настройке» струк-

тур и функций белков протеома, в том числе иммуноглобулинов E, M, D, A и G. Блокируя взаимодействие бактериальных фимбрий с эндотелием, D-манноза предотвращает абсорбцию различных бактерий (уропатогенных штаммов *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella*, *Leishmania*, *Mycobacterium* и др.) на поверхности тканей, что позволяет предупредить развитие рецидива инфекций мочеполовых путей [16]. D-манноза усваивается микробной организмом и частично подвергается расщеплению в процессе гликолиза. Пероральное введение D-маннозы и пробиотических штаммов бактерий стимулирует функциональную активность макрофагов, усиливая поглотительную и переваривающую способность клеток и приводя к снижению уровня фактора некроза опухоли альфа [17]. Однако воздействию D-маннозы и других метабиотиков на микробиом человека в целом остается малоизученным.

В настоящей работе представлены результаты сравнительного хемомикробиомного анализа D-маннозы, лактулозы, сорбита, ксилита и D-фруктозы, проведенного с использованием современных технологий машинного обучения. Актуальные методы прикладной математики позволяют достоверно и верифицируемо прогнозировать фармакологические эффекты молекул. На основании теории анализа размеченных графов и теории метрического анализа данных [18, 19], комбинаторной теории разрешимости [20], топологической теории анализа плохо формализованных задач [21] и новейших методов прогнозирования значений числовых переменных [22] нами разработан уникальный метод хемомикробиомного анализа, то есть прогнозирования влияния низкомолекулярных соединений на микробиом человека. Для каждой из исследованных молекул были получены значения площади под кривой роста (area under the curve – AUC) для репрезентативной выборки 38 микроорганизмов-комменсалов человека, включая бифидо- и лактобактерии.

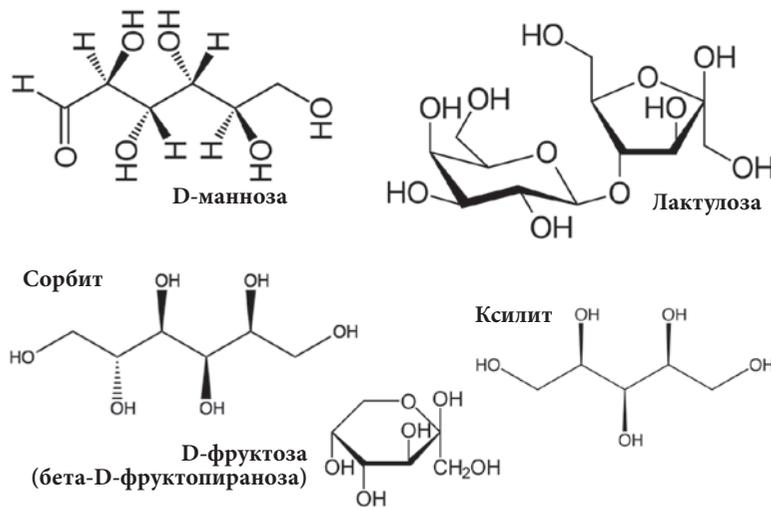


Рис. 1. Химические формулы молекул, исследованных в ходе хеомикробиомного анализа

Материал и методы

Проведен хеомикробиомный анализ молекул D-маннозы, лактулозы, сорбита, ксилита, D-фруктозы. Поскольку в водных растворах фруктоза существует в виде смеси таутомеров (динамических изомеров, переходящих друг в друга), в которой преобладает бета-D-фруктопираноза (около 80%), в настоящем исследовании для анализа эффектов D-фруктозы и инулина использовалась именно бета-D-фруктопираноза (рис. 1).

В микробиоте ЖКТ человека найдено более 1000 различных микроорганизмов [23], в том числе *Firmicutes* (*Clostridium*, *Dorea*, *Eubacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* и др.), *Bacteroides*, *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*, *Collinsella*), *Fusobacteria*, *Proteobacteria* (*Bilophila*, *Escherichia* и др.), *Verrucomicrobia*, *Melainabacteria*, *Fungi* (*Saccharomyces* и др.) [1]. Для адекватного представления микробиоты ЖКТ человека использована репрезентативная выборка бактерий кишечной микробиоты, сформированная на основании анализа 364 фекальных метабеномов здоровых добровольцев (таблица) [24]. Данная выборка репрезентативна и включает виды представителей микробиоты с учетом их распространенности в различных популяциях. Всего изучено 38 бактерий-комменсалов, которые относятся к различному 21 роду бак-

терий, представляют 80% микробиоты ЖКТ человека и существенно различаются по эффектам биохимического воздействия на организм человека (см. таблицу).

При проведении хеомикробиомного анализа D-маннозы, лактулозы, сорбита, ксилита и D-фруктозы моделировалось их воздействие в концентрации 10 ммоль/л, что приблизительно соответствует приему нескольких граммов метабактериала взрослым человеком и одновременно условиям культивирования бактерий (~1% сахаров). При моделировании принималось, что каждый штамм выращивается в стандартном анаэробном бульоне (так как все исследованные штаммы – анаэробы), а кривая роста демонстрирует зависимость оптической плотности от времени. Для того чтобы сопоставить результаты, в процессе подготовки данных для машинного обучения проводилась нормализация кривых роста. Процедура выполнения хеомикробиомного анализа подробно описана в работе И.Ю. Торшина и соавт. [25].

Результаты

В результате хеомикробиомного анализа получены прогнозы нормализованных значений AUC (рис. 2). Для дальнейшего анализа отобраны только те данные, которые соответствовали значениям, статистически достоверно отличающимся от контрольных экспериментов

($p < 0,05$ при сравнении со стандартной средой выращивания бактерий) и со стандартным отклонением, не превышающим погрешность метода (в среднем 0,2 у.е.).

Сравнительный хеомикробиомный анализ метабактериала D-маннозы, лактулозы, сорбита, ксилита и D-фруктозы позволил получить оценки значений AUC для 38 организмов-комменсалов микробиоты человека и вычислить профили воздействия метабактериала на микробиом человека (рис. 3).

Обсуждение результатов

D-манноза

Хеомикробиомный анализ показал, что в среднем по репрезентативной выборке микробиоты D-манноза в значительно меньшей степени, чем другие вещества, поддерживала рост бактерий-комменсалов (AUC для D-маннозы – $0,13 \pm 0,16$, лактулозы – $0,42 \pm 0,24$, сорбита – $0,59 \pm 0,24$, ксилита – $0,55 \pm 0,23$, D-фруктозы – $0,58 \pm 0,24$). Действительно, хорошо известно, что D-манноза достаточно слабо метаболизируется в организме человека: до 90% выводится с мочой в течение 30–60 минут [26], практически не претерпевая существенных биотрансформаций. Экзогенная D-манноза, поступающая из пищи, усваивается микробиотой лишь частично [27].

Тем не менее в соответствии с результатами хеомикробиомного анализа именно D-манноза лучше остальных молекул способствовала росту бифидобактерий *Bifidobacterium longum subsp. longum* (AUC для D-маннозы – 0,38, молекул сравнения – от 0,17 до 0,18). Бифидобактерии – важнейший представитель микрофлоры человека (удельный вес в составе микробиоценозов составляет до 85%). Им принадлежит ведущая роль в нормализации микробиоценоза кишечника, поддержании неспецифической резистентности организма, улучшении процессов всасывания и гидролиза жиров, белкового и минерального обмена. Бифидобактерии вырабатывают масляную кислоту и другие короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК)



Бактерии-комменсалы человека, воздействие на рост которых оценивалось в ходе хемомикробиомного анализа

Микроорганизм	Описание	Штамм
<i>Bacteroides caccae</i>	Микробиота кишечника. Некоторые штаммы патогенны	DSM 1447
<i>Bacteroides fragilis</i>	Микробиота ЖКТ. Участвует в газообразовании, развитии гнойно-воспалительных заболеваний после травм	DSM 20083
<i>Bacteroides ovatus</i>	Расщепляет пищевые волокна, продуцирует янтарную и фенилуксусную кислоты, вызывает осложнения при попадании в другие органы	DSM 20219
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Гидролизует амилозу, амилопектин, пуллулан, мальтоолигосахариды, поддерживает барьерную функцию слизистой кишечника. Некоторые штаммы считаются оппортунистическими патогенами	DSM 25238
<i>Bacteroides uniformis</i>	Микробиота тонкого кишечника. Деконъюгирует желчные кислоты	DSM 15670
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Микробиота толстой кишки. Продуцирует пропионат, участвует в биосинтезе витаминов К, В ₆ , В ₁₂	DSM 2544
<i>Bacteroides xyloxylosum</i>	Расщепляет ксилан и различные простые сахара, продуцирует ацетат и пропионат	ATCC 27758
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Составляет до 85% микробиома. Участвует во всасывании и гидролизе жиров, вырабатывает уксусную, молочную, янтарную кислоты, витамины группы В	DSM 3992
<i>Bifidobacterium longum</i>	Участвует в биосинтезе витаминов, входит в состав многих препаратов-пробиотиков	ED1a
<i>Bilophila wadsworthia</i>	Микробиота ЖКТ. Ассоциируется с выраженным газообразованием, выявляется в избытке при тяжелом аппендиците	IAI1
<i>Blautia obeum</i>	Микробиота толстого кишечника (5%). Продуцирует уксусную кислоту, аутоиндуктор 2, ограничивает колонизацию холерных вибрионов	DSM 3376
<i>Clostridium bolteae</i>	Продуцирует короткоцепочечные жирные кислоты: масляную, изомаляную, валериановую, капроновую, изовалериановую, изокапроновую	DSM 17629
<i>Clostridium difficile</i>	Токсикогенные штаммы являются основной причиной диареи в больницах	19495
<i>Clostridium perfringens</i>	Может вызывать анаэробную гангрену, антибиотик-ассоциированные диареи, некротический энтерит	DSMZ 18205
<i>Clostridium ramosum</i>	Микробиота кишечника. Усиливает усвоение углеводов и жиров	DSM 16839
<i>Clostridium saccharolyticum</i>	Метаболизирует различные сахара для употребления другими представителями микробиоты ЖКТ	DSM 14610
<i>Collinsella aerofaciens</i>	Ферментирует глюкозу, маннозу, галактозу, фруктозу, мальтозу и лактозу. Продуцирует этанол, муравьиную и молочную кислоты	ATCC 27255
<i>Coprococcus comes</i>	Микробиота ЖКТ	ATCC 29149
<i>Dorea formicigenerans</i>	Ферментирует глюкозу с образованием этанола, муравьиной, уксусной, молочной кислот, CO ₂ , H ₂	ATCC 27756
<i>Eggerthella lenta</i>	Нормальная микрофлора ЖКТ. Деконъюгирует желчные кислоты, участвует в смешанных инфекциях	DSM 19024
<i>Escherichia coli</i>	Конкурент условно патогенной микрофлоры. Абсорбирует в кишечнике кислород, вырабатывает витамины группы В, уксусную, муравьиную, молочную, янтарную кислоты, участвует во всасывании железа, кальция, магния	HM-20
<i>Eubacterium eligens</i>	Типичная нормофлора ЖКТ. Метаболизирует углеводы и пептоны с накоплением масляной, уксусной, муравьиной короткоцепочечных жирных кислот, используемых энтероцитами, может синтезировать витамин В ₁₂ , аминокислоты	ATCC 43860
<i>Eubacterium rectale</i>	Микробиота толстой кишки. Является основным продуцентом масляной кислоты, участвует в переработке клетчатки	DSM 2151
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Бактерия зубного налета. Запускает воспалительные процессы, приводящие к образованию атеросклеротических бляшек, артриту и др.	ATCC-8483
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Молочнокислые бактерии, используемые как пробиотики	ATCC SD5275
<i>Odoribacter splanchnicus</i>	Модулирует концентрацию глюкозы и артериальное давление, вырабатывает масляную кислоту, метаболизирует желатин	DSM 2079
<i>Parabacteroides distasonis</i>	Метаболизирует целлобиозу, глюкозу, лактозу, D-маннозу, D-мелцитозу, D-рафинозу, L-рамнозу, сахарозу, ксилозу. Определенные штаммы патогенны при ранениях	DSM 6597
<i>Parabacteroides merdae</i>	Продуцирует внеклеточные ферменты, которые способствуют расщеплению сложных полисахаридов (целлюлозы, гемицеллюлозы, мукополисахаридов)	HM-715
<i>Prevotella copri</i>	Выделена при анаэробных инфекциях дыхательных путей. Участвует в переработке углеводов, вытеснении патогенных бактерий	HM-722
<i>Roseburia hominis</i>	Регулирует иммунитет, производя антимикробные пептиды, поддерживая барьерную функцию и регулируя Т-лимфоциты	ATCC 49260
<i>Roseburia intestinalis</i>	Продуцирует масляную кислоту. Численность снижена при ожирении, глюкозотолерантности, болезни Паркинсона	-
<i>Ruminococcus bromii</i>	Один из доминантных видов бактерий толстой кишки. Участвует в переработке пищевых крахмалов и усвоении других растительных полисахаридов	DSM 756
<i>Ruminococcus gnavus</i>	Продуцирует антибактериальный руминококцин А, действующий против патогенных клостридий	DSMZ 1402
<i>Ruminococcus torques</i>	Нормальный компонент микробиоты кишечника (0,5%)	DSM 3979
<i>Streptococcus salivarius</i>	Регулирует воспалительный ответ, продуцирует бактериоцины против бактерий зубного налета. Некоторые штаммы считаются оппортунистическими патогенами	DSM 2243
<i>Veillonella parvula</i>	Пародонтопатогенная бактерия. Оказывает антагонистическое действие на кариесогенную микрофлору	DSM 15643

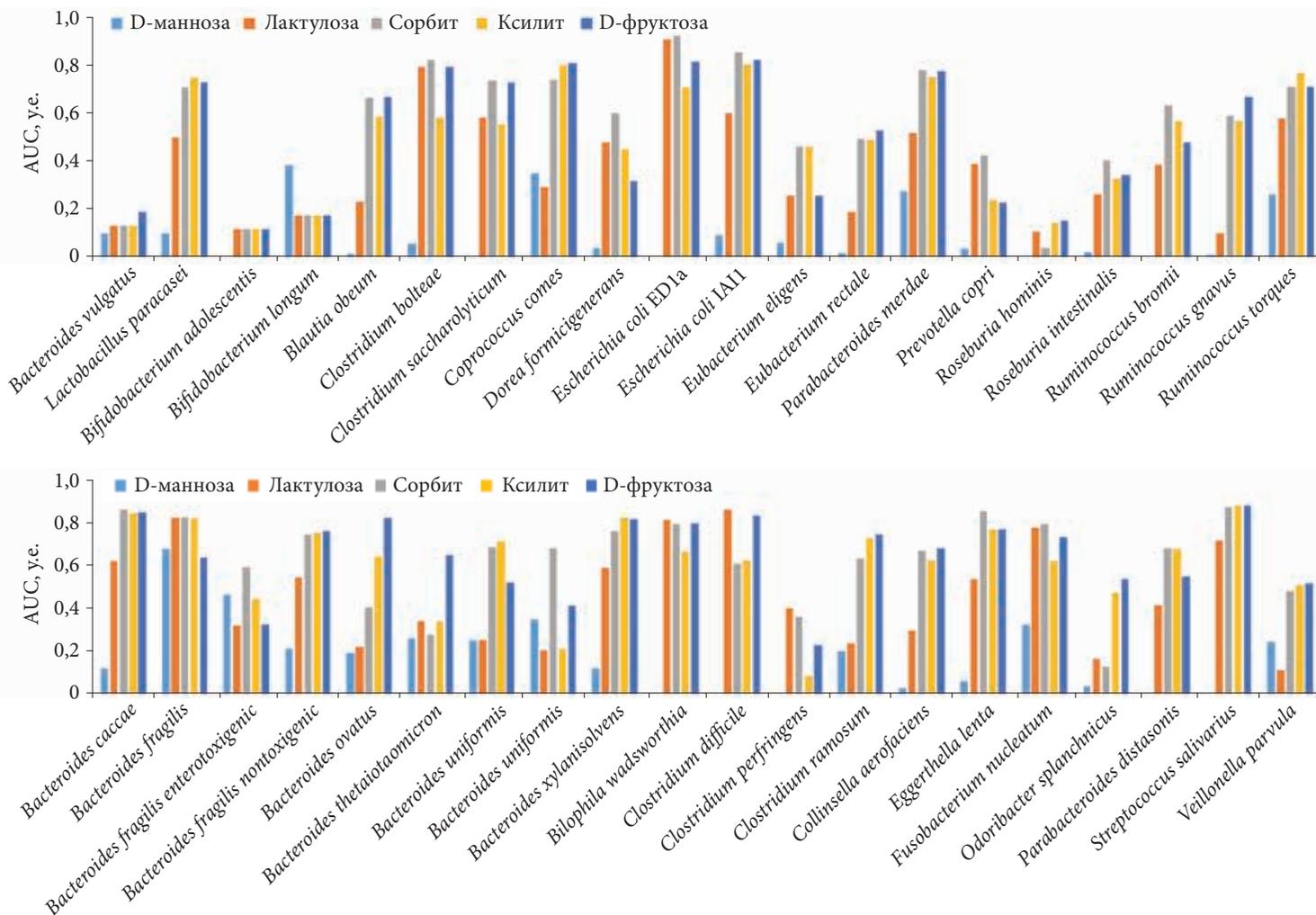


Рис. 2. Нормализованные значения AUC исследованных бактерий микробиома человека, достоверно отличающиеся от контроля (получены в результате проведения хемомикробиомного анализа)

(уксусную, молочную, янтарную). Сниженное количество бифидобактерий в ЖКТ считается одним из патогенетических факторов хронических расстройств пищеварения. В ходе исследования был получен важный результат: D-манноза была нейтральна и не влияла на рост патогенных бактерий *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* DSM 756, *Fusobacterium nucleatum* DSM 15643 (AUC для D-маннозы – 0,04, молекул сравнения – 0,61–0,86). Отметим, что инвазия клостридиями ассоциирована с тяжелыми формами цистита. Несмотря на то что патогенные штаммы *Clostridium difficile* найдены в кишечнике у 50% новорожденных и 3–15% здоровых детей стар-

ше двух лет, а также у взрослых, эти бактерии являются основной причиной больничной диареи. Количество *Clostridium difficile* в составе нормальной микрофлоры кишечника здорового взрослого человека не должно превышать 0,01–0,001%. Токсигенные штаммы клостридий продуцируют токсин А (энтеротоксин) и В (цитотоксин). *Clostridium difficile* – достаточно распространенная причина (30% случаев) антибиотик-ассоциированной диареи – одного из осложнений, которое возникает у 5–25% пациентов, получающих антимикробную терапию. Описаны случаи *Clostridium difficile*-зависимого эмфизематозного цистита, характеризующегося наличием

газонаполненных кист в стенке мочевого пузыря и встречающегося при сахарном диабете [28]. Установлено, что D-манноза практически не поддерживала рост условно патогенных бактерий *Clostridium perfringens* DSM 756 (AUC для D-маннозы – 0,002, молекул сравнения – 0,08–0,40), которые могут приводить к анаэробной гангрене, антибиотик-ассоциированной диарее, некротическому энтериту при попадании в не подвергшиеся первичной хирургической обработке раны. Заболевания, вызванные *Clostridium perfringens*, серотип F, кодируются как «A05.2 Пищевое отравление, вызванное *Clostridium perfringens* (*Clostridium welchii*)» (некротиче-

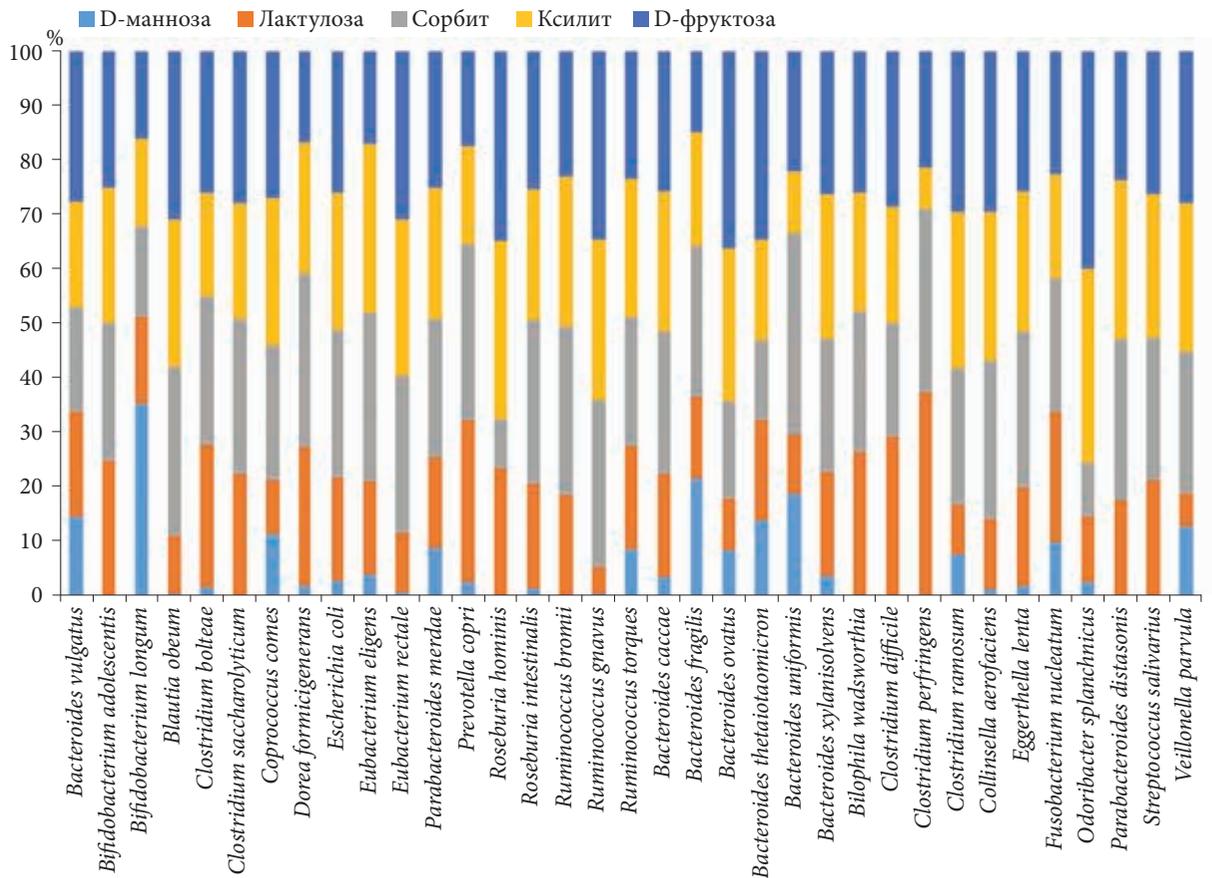


Рис. 3. Профиль воздействия исследованных метабиотиков на микробиом

ский энтерит) и «B96.7 *Clostridium perfringens* как причина болезней, классифицированных в других рубриках». Инвазия мочевого пузыря *Clostridium perfringens* может стать причиной гангренозного цистита, сопровождаться септическим шоком и даже некрозом костного мозга [29].

D-манноза в наименьшей степени, чем молекулы сравнения, способствовала росту патогенных *Fusobacterium nucleatum* DSM 15643 (AUC для D-маннозы – 0,32, молекул сравнения – 0,63–0,80). Повышенная обсемененность бактериями *Fusobacterium nucleatum* ротовой полости связана с различными заболеваниями десен. Некоторые подвиды *Fusobacterium* способны проникать между клетками, образуя стенки кровеносных сосудов, и, перемещаясь с кровотоком, формировать колонии в самых разных органах и тканях организма-хозяина. Эти

колонии запускают воспалительные процессы, стимулирующие развитие атеросклеротических бляшек, эрозии соединительной ткани клапанов сердца и хрящевой ткани суставов, хронических заболеваний легких, мозга, печени и мочеполовой системы.

Хемомикробиомный анализ значений минимальной подавляющей концентрации (minimum inhibitory concentration – MIC) показал, что D-манноза может тормозить рост некоторых болезнетворных организмов. Например, значение MIC *Candida albicans* для D-маннозы составило 5,35 мкг/мл (для молекул сравнения – 5,66–9,68 мкг/мл). Напомним, что *Candida albicans* присутствует у 80% людей, не приводя к развитию заболеваний. Однако на фоне иммунодефицита *Candida albicans* вызывает кандидоз. D-манноза тормозит рост возбудителя гриппа *Haemophilus influenzae* (MIC для D-маннозы – 4,19 мкг/мл,

других молекул – 5,19–16,07 мкг/мл), возбудителя менингита, отита, синусита, внебольничной пневмонии *Streptococcus pneumoniae* (MIC для D-маннозы – 0,50 мкг/мл, других молекул – 0,37–0,87 мкг/мл) и возбудителя скарлатины *Streptococcus pyogenes* (MIC для D-маннозы – 0,28 мкг/мл, других молекул – 0,20–0,72 мкг/мл).

Таким образом, D-манноза не способствует размножению различных болезнетворных микроорганизмов и при этом поддерживает рост бифидобактерий *Bifidobacterium longum*, важных для здоровья микробиома.

D-фруктоза

D-фруктоза продемонстрировала одно из самых значимых влияний на рост исследованных комменсалов (AUC для D-фруктозы – $0,58 \pm 0,24$, остальных молекул – 0,13–0,59). Известно, что инулин стимулирует рост бифидобакте-



рий *Bifidobacterium adolescentis* и *Bifidobacterium bifidum* [30]. D-фруктоза, образующаяся при переработке инулина в ЖКТ, может положительно влиять на численность и многих других представителей здоровой микробиоты (см. рис. 2), поддерживая синтез КЦЖК, врожденный иммунитет и другие полезные функции микробиоты. КЦЖК полезны для колоноцитов (клеток толстой кишки), так как ответственный за выработку энергии и нормальный темп деления клеток. КЦЖК производятся бифидобактериями, лактобактериями, эубактериями, непатогенными клостридиями, бактероидами и другими представителями здоровой микробиоты.

Хемомикробиомный анализ показал, что лактулоза, сорбит, ксилит и D-фруктоза в одинаковой мере содействовали росту *Lactobacillus paracasei* ATCC SD5275 (AUC 0,711–0,791, нет статистически значимых различий), а также *Eggerthella lenta* DSM 2243 (AUC для D-фруктозы – 0,77, молекул сравнения – 0,54–0,86), которые в свою очередь способствуют колонизации стенок кишечника лактобактериями [31].

Эубактерии – представители типичной нормофлоры ЖКТ, значительная часть всех населяющих ЖКТ микроорганизмов. Они метаболизируют углеводы с накоплением КЦЖК (масляной в виде бутират-аниона, уксусной, муравьиной), используемых энтероцитами. Бутират-анион важен для колоноцитов, поскольку в случае его недостатка эти клетки подвергаются аутофагии [32]. Эубактерии *Eubacterium rectale* входят в состав микробиоты толстой кишки и представляют собой основных продуцентов масляной кислоты. D-фруктоза оказывала выраженное положительное воздействие на рост эубактерий *Eubacterium rectale* DSM 17629 (AUC для D-фруктозы – 0,53, молекул сравнения – 0,19–0,48).

В продукции масляной кислоты также участвуют непатогенные клостридии *Clostridium bolteae* DSM 15670 (AUC для D-фруктозы – 0,79, молекул сравнения – 0,58–0,83). *Clostridium bolteae* – представители

нормальной микрофлоры кишечника, кожи и полости рта человека. Они продуцируют КЦЖК (масляную, изомаляную, валериановую, капроновую, изовалериановую, изокапроновую) [33]. *Clostridium saccharolyticum* DSM 2544 (AUC для D-фруктозы – 0,73, молекул сравнения – 0,55–0,74) метаболизируют различные сахара для употребления другими представителями микробиоты ЖКТ.

Bacteroides xylanisolvens HM-722 (AUC для D-фруктозы – 0,82, молекул сравнения – 0,59–0,83) участвуют в расщеплении ксилана, вырабатывают ацетат и пропионат [33]. *Bacteroides ovatus* ATCC-8483 (AUC для D-фруктозы – 0,83, молекул сравнения – 0,21–0,64), нормальные обитатели кишечника человека (1–3% от микробиома), расщепляют длинные цепи полисахаридов пищевых волокон и синтезируют янтарную и фенилуксусную кислоты. Таким образом, D-фруктоза – один из лучших метабиотиков для поддержания роста представителей микробиоты, синтезирующих КЦЖК. Иммуномодулирующие эффекты исследованных представителей микробиоты осуществляются отчасти путем увеличения синтеза масляной кислоты, которая ингибирует сигнальные пути гамма-интерферона (STAT1) и гистон-деацетилазы [34, 35], а также является медиатором воспалительного ответа толстого кишечника [36]. Кроме того, исследованные представители микробиоты человека проявляют и более специфические иммуномодулирующие свойства. В частности, *Blautia obeum* DSM 25238 (AUC для D-фруктозы – 0,67, молекул сравнения – 0,23–0,67) ограничивает колонизацию холерных вибрионов. Данный эффект реализуется за счет повышения экспрессии гена *luxS*, кодирующего синтазу аутоиндуктора 2. Молекула аутоиндуктора 2 усиливает формирование бактериальных пленок нормальной микробиоты, предотвращает абсорбцию холерных вибрионов и подавляет оперон *tcr* холерных вибрионов, участвующий в синтезе холерного токсина [37]. D-фруктоза поддерживает рост руминококков *Ruminococcus gnavus*

ATCC 29149 (AUC для D-фруктозы – 0,67, молекул сравнения – 0,08–0,59) и *Ruminococcus torques* ATCC 27756 (AUC для D-фруктозы – 0,71, молекул сравнения – 0,26–0,77), которые входят в число доминантных видов бактерий толстого кишечника (седьмое место по распространенности). Руминококки участвуют в переработке пищевых крахмалов и усвоении других растительных полисахаридов. Снижение популяции руминококков ослабляет антибактериальный иммунитет, поскольку руминококки продуцируют антибактериальное соединение руминококцин А, который активно подавляет рост патогенных клостридий [38, 39].

Поддерживаемые D-фруктозой стрептококки *Streptococcus salivarius* DSMZ 20560 (AUC для D-фруктозы – 0,89, молекул сравнения – 0,72–0,89) помогают функционированию барьерного иммунитета слизистых оболочек и регулируют воспалительный ответ. *Streptococcus salivarius* синтезируют бактериоцины, которые относятся к классу лангибиотиков – антимикробных полипептидов, содержащих редкие тиоэфирные аминокислоты лантионин и метиллантионин. *Streptococcus salivarius* обладают потенциалом в качестве пробиотика в микробиоме полости рта, снижают зубной налет за счет продуцирования бактериоцинов, нейтрализующих *Streptococcus mutans*, которые вызывают кариес (плохой запах изо рта) и кариес [40, 41].

D-фруктоза положительно влияет на бактерии-комменсалы, которые способствуют всасыванию жиров. Например, было показано, что *Clostridium ramosum* DSMZ 1402 (AUC для D-фруктозы – 0,75, молекул сравнения – 0,24–0,73) усиливают усвоение углеводов и жиров при высокожировой диете [42]. *Eggerthella lenta* DSM 2243 (AUC для D-фруктозы – 0,77, молекул сравнения – 0,54–0,86) содержат гидролазу желчных кислот, активация которой ведет к колонизации стенок кишечника лактобактериями [31].

Синергизм D-маннозы и D-фруктозы
Уринарный микробиом, биомасса которого составляет 100–100000 КОЕ/мл,



включает в свой состав лактобактерии (45%), гарднереллы и превотеллы (27%), энтеробактерии (9%), стафилококки (3%) бифидобактерии (2%) и др. [43, 44]. Патогенез хронических инфекций мочеполовых путей, в том числе цистита, зависит не только от определенных патогенных штаммов *Escherichia coli* и других патогенов, но и от состояния уринарного микробиома в целом. В частности, в развитии инфекций мочеполовых путей значительную роль играют вирусные инфекции [45], снижение популяции лактобактерий и увеличение популяции гарднерелл [44]. Эти и другие изменения уринарного микробиома ассоциированы с повышением уровней провоспалительных цитокинов [46]. Известны высокая эффективность и безопасность использования D-маннозы в терапии цистита: она непосредственно блокирует адгезию патогенных штаммов *Escherichia coli*, вызывающих цистит [16]. Хемомикробиомный анализ показал, что молекулы D-маннозы крайне слабо могут стимулировать рост исследованных штаммов кишечной палочки. *Escherichia coli* – один из важных конкурентов условно патогенной микрофлоры и важна для выработки КЦЖК. В то же время D-фруктоза способствует размножению полезных штаммов кишечной палочки *Escherichia coli* ED1a (AUC для D-фруктозы – 0,82, молекул сравнения – 0,71–0,92) и *Escherichia coli* IAI1 (AUC для D-фруктозы – 0,82, молекул сравнения – 0,60–0,86). D-фруктоза, которая усваивается бактериями после расщепления инулина, относится к числу лучших метабиотиков для поддержки синтеза масляной кислоты и других КЦЖК, врожденного иммунитета, всасывания жиров и противодействия росту

патогенных бактерий. Поскольку D-манноза влияет на полезную микробиоту в гораздо меньшей степени, чем D-фруктоза, то для усиления ее метабиотических свойств перспективным представляется сочетанное использование D-маннозы и инулина (источника молекул D-фруктозы для микробиоты). Это позволит блокировать абсорбцию уропатогенных форм *Escherichia coli* при цистите, положительно влияя на рост полезных штаммов *Escherichia coli* и здоровье микробиома человека в целом (см. рис. 2), в том числе рост лакто- и бифидобактерий.

Комбинация «D-манноза + инулин» доступна на российском рынке. Так, препарат Экоцистин содержит значительные дозы D-маннозы (1500 мг) и инулина (1492,5 мг) в одном саше для приготовления раствора для питья [47]. Этих количеств вполне достаточно и для поддержания полезной микробиоты, и для торможения абсорбции уропатогенных штаммов *Escherichia coli*. В общем случае терапевтический эффект может быть достигнут употреблением одного саше в сутки. При лечении тяжелых форм цистита доза может быть увеличена в два – четыре раза.

Заключение

Использование метабиотиков можно назвать одним из эффективных и безопасных способов оздоровления кишечного и уринарного микробиома. Анализ воздействия того или иного метабиотика на различных представителей микробиома важен для комплексной оценки фармакологического действия соответствующего препарата. Полученные результаты количественно обосновывают эффекты изученных метабиотических

молекул на конкретные штаммы позитивной или нейтральной микрофлоры ЖКТ, в том числе воздействие на синтез КЦЖК. Они также позволяют анализировать целесообразность сопровождения той или иной фармакотерапии приемом D-маннозы, лактулозы, сорбита и др.

Хемомикробиомный анализ показал, что D-манноза, хотя и слабо поддерживает рост большинства исследованных представителей полезной микробиоты, но все же может тормозить рост различных представителей патогенной флоры. Кроме того, D-манноза в большей степени, чем молекулы сравнения, способствует росту бифидобактерий *Bifidobacterium longum*, продуцирующих масляную кислоту и другие КЦЖК, тем самым оздоравливая кишечный микробиом.

Результаты проведенного хемомикробиомного анализа указали на целесообразность дополнения метабиотических эффектов D-маннозы эффектами инулина, образованного из молекул D-фруктозы. Синергидное сочетание «D-манноза + инулин» будет стимулировать рост многих представителей здоровой микробиоты, в том числе бифидо- и лактобактерий, поддерживать синтез КЦЖК, функцию врожденного иммунитета, блокируя абсорбцию уропатогенных форм *Escherichia coli* и одновременно содействуя росту полезных штаммов *Escherichia coli*. Совместное применение D-маннозы и инулина будет оздоравливать и кишечный, и уринарный микробиом, снижая воспаление и способствуя более быстрому восстановлению микробиоты пациентов после антибиотикотерапии. 🌐

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-07-00944.

Литература

1. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Т. 3: Пробиотики и функциональное питание: научное издание. М.: ГРАНТЪ, 2001.
2. Bindels L.B., Delzenne N.M., Cani P.D., Walter J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics // Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2015. Vol. 12. № 5. P. 303–310.
3. Hutkins R.W., Krumbeck J.A., Bindels L.B. et al. Prebiotics: why definitions matter // Curr. Opin. Biotechnol. 2016. Vol. 37. P. 1–7.



4. Gibson G.R., Hutkins R., Sanders M.E. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics // *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2017. Vol. 14. № 8. P. 491–502.
5. Ioannidis J.P. Contradicted and initially stronger effects in highly cited clinical research // *JAMA.* 2005. Vol. 294. № 2. P. 218–228.
6. Torshin I.Yu. Bioinformatics in the post-genomic era: physiology and medicine. NY, USA: Nova Biomedical Books, 2007.
7. Ioannidis J.P.A., Houry M.J. Evidence-based medicine and big genomic data // *Hum. Mol. Genet.* 2018. Vol. 27. № R1. P. R2–R7.
8. Manrai A.K., Patel C.J., Ioannidis J.P.A. In the era of precision medicine and big data, who is normal? // *JAMA.* 2018. Vol. 319. № 19. P. 1981–1982.
9. Shenderov B.A. Metabiotics: novel idea or natural development of probiotic conception // *Microb. Ecol. Health Dis.* 2013. Vol. 24. ID 20399.
10. Шендеров Б.А., Ткаченко Е.И., Лазебник Л.Б. и др. Метабиотики – новая технология профилактики и лечения заболеваний, связанных с микробиологическими нарушениями в организме человека // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2018. № 3. С. 83–92.
11. Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.C. et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function // *Br. J. Nutr.* 1998. Vol. 80. Suppl. 1. P. 147–171.
12. Vasquez K.S., Shiver A.L., Huang K.C. Cutting the Gordian knot of the microbiota // *Mol. Cell.* 2018. Vol. 70. № 5. P. 765–767.
13. Shawcross D.L., Jalan R. Treatment of hepatic encephalopathy: it's not lactulose // *BMJ.* 2004. Vol. 329. № 7457. ID 112.
14. Maguire A., Rugg-Gunn A.J. Xylitol and caries prevention – is it a magic bullet? // *Br. Dent. J.* 2003. Vol. 194. № 8. P. 429–436.
15. Medus M.L., Gomez G.E., Zacchi L.F. et al. N-glycosylation triggers a dual selection pressure in eukaryotic secretory proteins // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7. № 1. ID 8788.
16. Громова О.А., Торшин И.Ю., Тетрашвили Н.К. Систематический анализ исследований по D-маннозе и перспективы ее применения при рецидивирующих инфекциях мочеполовых путей у женщин репродуктивного возраста // *Акушерство, гинекология и репродукция.* 2019. Т. 13. № 2. С. 119–131.
17. Корнеева О.С., Черемушкина И.В., Глущенко А.С. и др. Пребиотические свойства маннозы и ее влияние на специфическую резистентность // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2012. № 5. С. 67–70.
18. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 2. Local completeness of invariants of chemographs in view of the combinatorial theory of solvability // *Pattern Recognit. Image Anal.* 2014. Vol. 24. № 2. P. 196–208.
19. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: Density properties // *Pattern Recognit. Image Anal.* 2016. Vol. 26. № 3. P. 483–496.
20. Torshin I.Yu. On solvability, regularity, and locality of the problem of genome annotation // *Pattern Recognit. Image Anal.* 2010. Vol. 20. № 3. P. 386–395.
21. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. On the theoretical basis of metric analysis of poorly formalized problems of recognition and classification // *Pattern Recognit. Image Anal.* 2015. Vol. 25. № 4. P. 577–587.
22. Torshin I.Yu., Rudakov K.V. On the procedures of generation of numerical features over the splits of a set of objects and the problem of prediction of numeric target variables // *Pattern Recognit. Image Anal.* 2019. Vol. 29. № 3. P. 65–75.
23. Rajilic-Stojanovic M., de Vos W.M. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota // *FEMS Microbiol. Rev.* 2014. Vol. 38. № 5. P. 996–1047.
24. Maier L., Pruteanu M., Kuhn M. et al. Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria // *Nature.* 2018. Vol. 555. № 7698. P. 623–628.
25. Торшин И.Ю., Громова О.А., Захарова И.Н., Максимов В.А. Хемомикробиомный анализ Лактитола // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2019. № 4. С. 111–121.
26. Alton G., Hasilik M., Niehues R. et al. Direct utilization of mannose for mammalian glycoprotein biosynthesis // *Glycobiology.* 1998. Vol. 8. № 3. P. 285–295.
27. Postma P.W., Lengeler J.W., Jacobson G.R. Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria // *Microbiol. Rev.* 1993. Vol. 57. № 3. P. 543–594.
28. Tariq T., Farishta M., Rizvi A., Irfan F.B. A case of concomitant emphysematous cystitis and clostridium difficile colitis with pneumoperitoneum // *Cureus.* 2018. Vol. 10. № 6. ID e2897.
29. Lazarescu C., Kimmoun A., Blatt A. et al. Clostridium perfringens gangrenous cystitis with septic shock and bone marrow necrosis // *Intensive Care Med.* 2012. Vol. 38. № 11. P. 1906–1907.
30. Ramirez-Farias C., Slezak K., Fuller Z. et al. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii // *Br. J. Nutr.* 2009. Vol. 101. № 4. P. 541–550.
31. Moser S.A., Savage D.C. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. № 8. P. 3476–3480.



32. Donohoe D.R., Garge N., Zhang X. *et al.* The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon // *Cell Metab.* 2011. Vol. 13. № 5. P. 517–526.
33. Алешкин В.А., Афанасьев С.С., Караулов А.В. и др. Микробиоценозы и здоровье человека. М.: Династия, 2015.
34. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N. *et al.* Diversity of the human intestinal microbial flora // *Science.* 2005. Vol. 308. № 5728. P. 1635–1638.
35. Zimmerman M.A., Singh N., Martin P.M. *et al.* Butyrate suppresses colonic inflammation through HDAC1-dependent Fas upregulation and Fas-mediated apoptosis of T cells // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2012. Vol. 302. № 12. P. G1405–1415.
36. Zeng H., Lazarova D.L., Bordonaro M. Mechanisms linking dietary fiber, gut microbiota and colon cancer prevention // *World J. Gastrointest. Oncol.* 2014. Vol. 6. № 2. P. 41–51.
37. Hsiao A., Ahmed A.M., Subramanian S. *et al.* Members of the human gut microbiota involved in recovery from *Vibrio cholerae* infection // *Nature.* 2014. Vol. 515. № 7527. P. 423–426.
38. Dabard J., Bridonneau C., Phillippe C. *et al.* Ruminococcus A, a new lantibiotic produced by a *Ruminococcus gnavus* strain isolated from human feces // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. № 9. P. 4111–4118.
39. Patterson A.M., Mulder I.E., Travis A.J. *et al.* Human gut symbiont *Roseburia hominis* promotes and regulates innate immunity // *Front. Immunol.* 2017. Vol. 8. ID 1166.
40. Burton J.P., Drummond B.K., Chilcott C.N. *et al.* Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial // *J. Med. Microbiol.* 2013. Vol. 62. Pt. 6. P. 875–884.
41. Burton J.P., Chilcott C.N., Moore C.J. *et al.* A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters // *J. Appl. Microbiol.* 2006. Vol. 100. № 4. P. 754–764.
42. Mohandas R., Poduval R.D., Unnikrishnan D., Corpuz M. Clostridium ramosum bacteremia and osteomyelitis in a patient with infected pressure sores // *Infect. Dis. Clin. Pract.* 2001. Vol. 10. № 2. P. 123–124.
43. Antunes-Lopes T., Vale L., Coelho A.M. The role of urinary microbiota in lower urinary tract dysfunction: a systematic review // *Eur. Urol. Focus.* 2020. Vol. 6. № 2. P. 361–369.
44. Gasiorek M., Hsieh M.H., Forster C.S. Utility of DNA next generation sequencing and expanded quantitative urine culture in the diagnosis and management of chronic or persistent lower urinary tract symptoms // *J. Clin. Microbiol.* 2019. Vol. 58. № 1. ID JCM.00204-19.
45. Ibishev K.S., Lapteva T.O., Krachotkin D.V., Ryabenchenko N.N. The role of viral infection in the development of recurrent lower urinary tract infections // *Urologia.* 2019. Vol. 5. P. 136–139.
46. Abernethy M.G., Rosenfeld A., White J.R. *et al.* Urinary microbiome and cytokine levels in women with interstitial cystitis // *Obstet. Gynecol.* 2017. Vol. 129. № 3. P. 500–506.
47. Экоцистин: инструкция по применению препарата // www.grls.rosminzdrav.ru.

Chemomicrobiome Analysis of Synergism of D-mannose and D-fructose in Comparison with Other Metabiotics

I.Yu. Torshin, PhD¹, A.N. Galustyan, PhD², M.I. Ivanova³, A.K. Khadzhidis, PhD², O.A. Gromova, PhD, Prof.¹⁻³

¹ Federal Research Center 'Computer Science and Control' of the Russian Academy of Sciences, Moscow

² St. Petersburg State Paediatric Medical University

³ Big Data Storage and Analysis Center, Moscow

Contact person: Olga A. Gromova, olga_gromova@rambler.ru

This paper presents the results of comparative chemomicrobiomic analysis of D-mannose, lactulose, sorbitol, xylitol and D-fructose (the structural basis of inulin), made with the use of modern technologies of big data analysis. For each of the studied molecules, estimations of the area under the normalized growth curve were obtained for the representative sample of the human microbiota, which included 38 commensal bacteria, including Bifidobacterium and Lactobacillus. The values of the minimum suppressing concentration for 42 pathogenic (bacterial and fungal) microorganisms were calculated. Previously, the high efficiency and safety of using D-mannose in the treatment of cystitis were established: by blocking the fimbriae of pathogenic bacteria (for example, uropathogenic strains of Escherichia coli), D-mannose inhibits the development of urinary tract infections. In the course of chemomicrobiomic analysis, it was shown that in comparison with other metabiotics, D-mannose contributes less to the growth of conditionally pathogenic bacteria in the human microbiome and more to the growth of Bifidobacterium longum subsp. longum, which produce butyric acid and other short-chain fatty acids. The results of chemomicrobiomic analysis indicate the prospects of supplementing the metabiotic effects of D-mannose with the effects of inulin formed from D-fructose molecules for activation of the synthesis of short-chain fatty acids, support of innate immunity and growth of beneficial Escherichia coli strains.

Key words: human microbiome, prebiotics, metabiotics, chemoinformatics, area under the curve, Ecocystin