НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК ТАДЖИКИСТАНА
ИНСТИТУТ ХИМИИ ИМЕНИ В.И. НИКИТИНА
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И СОЦИАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ НАСЕЛЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ ТАДЖИКИСТАН

На правах рукописи

УДК 615.454:547.458.88:579.67

БОБОКАЛОНОВ ДЖАМШЕД ТОЛЕХМУРОДОВИЧ

РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ПЕКТИНА И ЕГО РОЛЬ В МОДУЛЯЦИИ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание учёной степени доктора фармацевтических наук по специальностям 3.4.1. Технология получения лекарств и 3.4.5. Фармакология, клиническая фармакология

Научные консультанты:
доктор фармацевтических наук,
профессор, академик НАНТ
Юсуфи Саломудин Джаббор,
доктор химических наук,
профессор,
Мухиддин Зайниддин Камар

ДУШАНБЕ – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень сокращений и условных обозначений 9
Введение 12
Общая характеристика исследования 16
ГЛАВА 1. Современное состояние и перспективы разработки биополимерных систем доставки лекарственных средств 25
1.1. Краткий обзор существующих традиционных лекарственных форм и их ограничения 25
1.1.1. Традиционные пероральные формы 26
1.1.2. Трансдермальные системы 27
1.1.3. Ограничения и перспективы 28
1.2. Перспективы применения систем доставки лекарств для повышения эффективности и снижения побочных эффектов лекарственных средств. 29
1.2.1. Историческая справка и становление концепции целенаправленной доставки 29
1.2.2. Ключевые аспекты целенаправленной доставки 29
1.2.3. Механизмы целенаправленной доставки лекарственных средств 30
1.2.4. Примеры реализации и перспективы 30
1.3. Пектины и зеины в разработке биополимерных систем доставки лекарственных средств 31
1.3.1. Общие положения о роли биополимеров 31
1.3.1.1. Полисахариды (пектины) 32
1.3.1.2. Белки (зеин) 38
1.4. Микробиота кишечника и её влияние на фармакокинетику лекарств 39
1.4.1. Современное понимание микробиоты кишечника 39
1.4.1.1. Что мы знаем о микробиоте кишечника? 42
1.4.1.2. Исследование микробиоты кишечника человека 43
1.4.1.3. Полное метагеномное секвенирование методом дробовика 45
1.4.2. Модели ферментации *in vitro* 48

1.4.2.1. Влияние микробиоты на метаболизм, биодоступность и трансформацию лекарственных средств..... 53
1.4.2.2. Влияние микробиоты на эффективность и безопасность фармакотерапии. 55
1.4.2.3. Модуляция структуры и функции микробиоты кишечника двумя структурно различными пектинами 57
1.4.2.4. Изменение профиля высвобождения лекарств в условиях, моделирующих отделы кишечника. 59
1.5. Проблемы, перспективы и тенденции развития систем доставки лекарств 60
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования 63
2.1. Источники пектина и его гидролиз-экстракция 63
2.1.1. Проект пилотной установки для системы тангенциальной диультрафильтрации для очистки пектина 63
2.1.2. Определение содержания ангидрогалактуроновой кислоты и степени метилэтерификации групп галактуроновой кислоты в пектине..... 65
2.1.3. Анализ состава моносахаридов пектина 65
2.1.4. Исследования структуры биополимеров методом ядерно-магнитного резонанса 66
2.1.5. Определение молекулярной массы методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии 67
2.1.6. Определение молекулярной массы и гидродинамических свойств методом многоуглового лазерного светорассеяния 68
2.2. Выделение зеина из кукурузы..... 68
2.2.1. Методики эксперимента обезжиривания семян кукурузы..... 68
2.2.2. Определение общего белка в обезжиренной муке кукурузы..... 69
2.2.3. Выделение зеина из обезжиренной муки кукурузы. 69
2.2.4. Выделение и характеристика зеина кукурузы методом т. Б. Осборна... 69
2.2.5. Статистический и биоинформатический анализ..... 70

2.3. Технология получения гидрогелевых микросфер на основе пектина и зеина..... 71
2.4. Сравнительный анализ микробиоты кишечника, культивируемой *in vitro* с использованием однокамерного модуля по сравнению с трёхкамерным экспериментальным дизайном толстого кишечника 73
2.4.1. Обнаружение общих бактерий и *bifidobacterium* с использованием qPCR 77
2.4.2. Анализ короткоцепочечных жирных кислот 77
2.4.3. Общий метод извлечение днк и с использованием технологий на основе кремнезёма 78
2.4.4. Амплификация гена 16s ррнк и секвенирование ампликонов..... 79
2.4.5. Секвенирование гена 16s ррнк..... 79
2.5. Подготовка образцов, разделение и обнаружение метаболитов 81
2.5.1. Анализ короткоцепочечных жирных кислот с использованием газовой хроматографий с масс-спектрометрическим детектором 81
2.6. Кинетика высвобождения пироксикама из разработанных биополимерных систем доставки лекарственных средств 82
2.6.1. Кинетика высвобождения пироксикама из микросфер..... 82
2.6.1.1. Эксперименты *in vitro* 82
2.6.1.2. Эксперименты *ex vivo* 83
2.6.1.3. Эксперименты *in vivo*..... 83
2.6.2. Математический анализ механизма транспорта лекарств 84
2.6.3. Разработка in vitro – in vivo и ex vivo – in vivo корреляции..... 85
ГЛАВА 3. Технология получения пектина и зеина, исследование их свойств 86
3.1. Получения пектинов различными методами и их структурная характеристика..... 86
3.2. Технология получения и характеристика зеинов кукурузы, произрастающей в таджикистане. 91
ГЛАВА 4. Разработка биополимерных систем доставки лекарственных веществ 97

4.1. Биополимерные системы доставки лекарств для пролонгированного высвобождения лекарственного вещества 97
4.2. Разработка гидрогелевых микросфер из пектина и зеина 98
4.3. Исходные соотношения компонентов и общая характеристика микросфер 99
4.4. Оптимизация состава и влияние концентрации пироксикама 100
4.5. Сравнение различных типов пектина и ионов-сшивателей 101
ГЛАВА 5. Исследования модуляции микробиоты кишечника 105
5.1. Исследование метаболизма микробиоты кишечника 105
5.1.1. Сравнение альфа-разнообразия между однокамерной и трёхкамерной системами 106
5.1.2. Отличие сообщества фекальной инокуляции внутри однокамерной и трёхкамерной модели толстого кишечника 107
5.1.3. Значимые различия в структуре сообществ между двумя методами культивирования 112
5.1.4. Сравнительный анализ метаболитов сообщества однокамерной и трёхкамерной модели 115
5.1.5. Ключевые факторы и различия в окружающих условиях, влияющие на дивергенции сообществ 117
5.1.6. Исследование структуры сообщества в однокамерной и трёхкамерной моделях 120
5.1.7. Зависимость уровня короткоцепочечных жирных кислот от применяемой методики культивирования 122
5.1.8. Влияние изменения уровня ph среды на альфа-разнообразие 123
5.1.9. Влияние изменения ph на структуру сообщества и количество определенных таксонов в независимости от донора 125
5.1.10. Влияние ph среды на тип и уровни короткоцепочечных жирных кислот в системе 129
5.2. Модуляция структуры и функции микробиоты кишечника двумя структурно различными пектинами 134

5.2.1. *In vitro*-культивирование микробиоты кишечника и экспериментальный дизайн 134
5.2.2. Влияние пектинов с низкой молекулярной массой и высокой степенью этерификации и высокой молекулярной массой и низкой степенью этерификации на альфа-разнообразие 136
5.2.3. Оценка структуры сообщества с помощью анализа главных координат..... 138
5.2.4. Изучение структурного влияния пектина с использованием секвенирования гена 16s ррнк..... 140
5.2.5. Влияния пектинов на метаболиты микробиоты..... 144
5.3. Влияние добавления растворимых и нерастворимых биополимеров на количество бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты в микробиоте кишечника. 152
5.3.1. Влияние типа добавок на состав микробиоты кишечника. 152
5.3.2. Изменения в таксономической структуре микробиоты кишечника после добавление растворимого и нерастворимого волокон для каждого донора.. 155
5.3.3. Межиндивидуальные изменения в анализе короткоцепочечных жирных кислот 161
5.3.4. Зависимость метаболизма полисахаридов от разных доноров в зависимости от типа добавки..... 164
5.4. Стойкость пробиотического штамма *lacticaseibacillus rhamnosus gg* (lgg) в *in vitro*- модели микробиома кишечника..... 170
5.4.1. Выживание и рост lgg в многокамерной *in vitro* - модели толстой кишки..... 170
5.4.2. Оценка способности штамма lgg к колонизации в сравнении с его временным пребыванием в системе 174
5.5. Влияние на собственное микробное сообщество 176
5.6. Влияние добавления штамма lgg на синтез короткоцепочечных жирных кислот 181
5.7. Метагеномное секвенирование методом дробовика 183

5.8. Взаимосвязь между микробиомом и метаболомом 186
5.9. Пространственное разрешение метаболических преобразований..... 188
5.10. Индивидуальные метаболиты и пути метаболизма..... 190
ГЛАВА 6. Фармакокинетические исследования высвобождения пироксикама из пектин-зеиновых систем доставки лекарственных средств..... 196
6.1. Подготовка гидрогелевых микросфер, инкапсулированных лекарственным средством..... 196
6.2. Фармакокинетическое исследование высвобождения лекарственного средства *in vitro*..... 197
6.3. Фармакокинетическое исследование *in vivo* на крысах 199
6.4. Корреляционный анализ *in vitro – in vivo* и *ex vivo – in vivo* 204
ГЛАВА 7. Применение комбинации “пектин–антибиотик” при кишечных инфекциях 211
7.1. Дизайн исследования 211
7.2. Исследуемые схемы лечения..... 211
7.2.1. Характеристика пектинов..... 212
7.2.2. Определение метронидазола в крови и фекалиях..... 212
7.3. Клиническая оценка lmap..... 213
7.4. Клиническая оценка hmap..... 214
7.5. Клиническое ведение пациентов и критерии оценки эффективности терапии 214
7.6. Лечение острых инфекционных заболеваний с использованием низкометилированного пектина..... 215
7.6.1. Оценка эффективности комбинации метронидазола с lmap при кишечном амебиазе..... 215
7.6.2. Оценка эффективности комбинации метронидазола с hmap при кишечном амебиазе 217
ГЛАВА 8. Обзор результатов исследования 223
Выводы 234

Рекомендации для практического использования результатов исследования 237
Список литературы 238
Публикации по теме диссертации 275

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВМ – высокометилированный пектин (High-Methylated pectin)

ВМ-НСЭ – пектин с высокой молекулярной массой и с низкой степенью этерификации (High Molecular Weight–Low Degree of Esterification Pectin)

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт (Gastrointestinal Tract, GIT)

КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты (Short-Chain Fatty Acids)

НМ – низкометилированный (Low-Methylated, LM)

НМ-ВСЭ – пектин с низкой молекулярной массой и с высокой степенью этерификации (Low Molecular Weight–High Degree of Esterification Pectin)

П/З – пектин/зеин (Pectin/Zein, P/Z)

РКЦЖК – разветвлённые короткоцепочечные жирные кислоты

СЭ – степень этерификации (Degree of Esterification, DE)

ТФ – традиционная форма (Traditional Form, TF)

16S рРНК – 16S рибосомальная РНК (16S ribosomal RNA)

3С – трехкамёрный модуль (3 compartment)

АС – восходящий отдел ободочной кишки толстого кишечника (Ascending Colon)

AG – арабиногалактан (Arabinogalactan)

ASV – варианты ампликонных последовательностей (Amplicon Sequence Variants)

AUC – площадь под кривой (Area Under the Curve)

AUMC – площадь под первым моментом кривой (Area Under the First Moment Curve)

DC – Нисходящий отдел ободочной кишки толстого кишечника (Descending Colon)

DUF – диаультрафильтрация (Diaultrafiltration).

EVIVC – корреляция ex vivo–in vivo (Ex vivo–In vivo Correlation)

F/B – соотношение *Firmicutes* /*Bacteroidetes* (*Firmicutes* /*Bacteroidetes* Ratio)

GA – гликохолевая кислота (Glycocholic acid).

GC/MS – газовая хроматография/масс-спектрометрия (Gas Chromatography–Mass Spectrometry, GC/MS)

HMAP – высокометилированный яблочный пектин (High Methylated Apple Pectin)

HPSEC – высокоэффективная жидкостная эксклюзионная хроматография (High-Performance Size-Exclusion Chromatography)

ILA – индоллактат

IPA – индолпропионовая кислота (Indolepropionic Acid)

ISF – нерастворимые волокна (Insoluble fibers)

IVIVC – корреляция in vitro–in vivo (In vitro–In vivo Correlation)

LGG – Lacticaseibacillus rhamnosus GG (LGG)

LMAP – низкометилированный яблочный пектин (Low Methylated Apple Pectin)

MAG – метагеномно-собранный геном (Metagenome-Assembled Genome)

MALLS – многоугольное лазерное светорассеяние (Multi-Angle Laser Light Scattering)

MetaPhlAn – метагеномный филогенетический анализ (Metagenomic Phylogenetic Analysis).

MRT – среднее время удержания (Mean Residence Time)

Mw – молекулярная масса (Molecular Weight)

NGS – секвенирование нового поколения (Next-Generation Sequencing)

NMR – ядерный магнитный резонанс (Nuclear Magnetic Resonance)

PBS – фосфатно-буферный раствор (Phosphate-Buffered Saline)

PCA – анализ главных компонент (Principal Component Analysis)

PCoA – анализ главных координат (Principal Coordinates Analysis)

PERMANOVA – анализ дисперсии на основе пермутаций (Permutational Multivariate Analysis of Variance)

Phe – фенилаланин (Phenylalaninehe)

PJ – панкреатический сок (Pancreatic Juice)

Px – пироксикам (Piroxicam)

qPCR – количественная полимеразная цепная реакция (quantitative Polymerase Chain Reaction)

RF – метод случайного леса (Random Forest)

RT – время удерживания (Retention time)

SC – однокамерный модуль (Single compartment)

SF – растворимые волокна (Soluble fibers)

SHIME – симулятор микробной экосистемы кишечника человека (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem)

SWS – водный раствор сахара (Sugar Water Solution)

TA – таурохолевая кислота (Taurocholic acid)

TC – поперечный отдел ободочной кишки толстого кишечника (Transverse Colon)

TCS – триклозан (Triclosan)

Trp – триптофан (Tryptophan)

Tyr – тирозин (Tyrosine)

VEAP – вакуумноое выпаривание с последующим спиртовым осаждением (Vacuum evaporation and alcohol precipitation)

WGS – полногеномное секвенирование (Whole Genome Sequencing)

WVTR – скорость передачи водяного пара (Water Vapor Transmission Rate)

XGA – ксилогалактуронан (Xylogalacturonan, XGA)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. «Одним из направлений развития современной фармацевтической технологии является создание систем направленной доставки лекарственных средств, которые обеспечивают высвобождение действующих веществ в назначенных отделах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ)» [1, 2, 3]. «При разработке таких систем особое значение имеет взаимодействие лекарственных средств с микробиотой кишечника, которая может влиять на их метаболизм и фармакологическое параметры» [4, 5]. «Инфекционные заболевания ЖКТ (включая амебиаз), воспалительные патологии кишечника и общие дисбиозы обуславливают высокую потребность в препаратах, которые действуют локально и минимально влияют на нормальную микрофлору» [2].

«В связи с этим особый интерес представляют биополимерные носители природного происхождения, в частности пектин и зеин, обеспечивающие пролонгированное высвобождение лекарств. Пектины обладают способностью к избирательной деградации в толстом кишечнике и оказывают пребиотическое воздействие [6, 7], а зеин (кукурузный проламиновый белок) формирует гидрофобную матрицу» [8, 9], защищающую пектин от набухания и от преждевременного высвобождения активного вещества. Совместное применение пектина и зеина в составе гидрогелевых микросфер актуально для разработки лекарственных форм, которые обеспечивают пролонгированное высвобождение действующего вещества. Такие системы могут быть использованы при разработке препаратов для борьбы с патогенными микроорганизмами, восстановления нормальной микрофлоры кишечника, удобства в применении и для пролонгирования терапевтического эффекта [8]»

«В связи с этим разработка систем доставки лекарственных средств на основе пектина и зеина остаётся актуальным направлением фармацевтической технологии, многие аспекты которого ещё недостаточно изучены. Важную роль при этом играет разработка способа очистки пектина» [10, 11]. «Традиционный метод очистки, основана на спиртовом осаждении, не

позволяет полностью удалить сопутствующие низкомолекулярные примеси. Их содержание и состав зависят от используемого сырья, а также от условий получения пектина» [12]. Наличие таких примесей затрудняет стандартизацию пектина, поэтому разработка методов получения фармакопейного пектина со стабильными и воспроизводимыми характеристиками имеет практическое значение.

«Наряду с этим поведение пектин-зеиновых систем доставки лекарственных средств в условиях, приближённых к физиологической среде желудочно-кишечного тракта остаётся недостаточно изученным. К примеру, необходимы провести исследования с использованием моделей *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* [13, 14]. Также, отсутствует комплексный подход к оценке фармакокинетики высвобождения лекарственных веществ из данных систем (*in vitro* - *in vivo* и *ex vivo* - *in vivo* – корреляции), их эффективность при лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта инфекционной природы» [15].

«Важным направлением исследований является изучение взаимодействия растительных полисахаридов и пробиотиков с кишечной микробиотой. Кроме того, открытым остаётся вопросы как растворимые и нерастворимые пищевые волокна (полисахариды) изменяют таксономический состав микробных сообществ и образование короткоцепочечных жирных кислот, причём все пре- и пробиотики одинокого модулируют кишечную микробиоту, от каких факторов завысять эти изменение. Не менее важным является изучение способен ли пробиотический штамм *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG сохраняться в кишечной среде, оказывать влияние на состав и метаболическую активность микробных сообществ. Поэтому изучение этих процессов позволяет разграничить влияние пребиотических субстратов и пробиотических микроорганизмов на структуру и функциональные свойства кишечной микробиоты и могут служит основой для оценки пребиотических свойств других полисахаридов для их применения в системах доставки лекарственных средств» [16, 17].

«Дополнительный интерес представляет изучение влияния пектина на структуру и метаболическую активность кишечной микробиоты» [18]. «Недостаточно исследованы вопросы применения пребиотических полимеров и пробиотических микроорганизмов, а также особенности функционирования данной платформы в условиях кишечной среды» [16, 17].

Таким образом, необходимость разработки, комплексного исследования и обоснования пектин-зеиновых систем доставки лекарственных средств с учётом технологических, фармакокинетических и микробиологических аспектов определяет актуальность настоящего исследования.

Степень научной разработанности изучаемой проблемы. В научной литературе достаточно подробно освещены физико-химические свойства пектина и зеина, методы их получения и применения в пищевой, биотехнологической и фармацевтической отраслях [6, 8, 9, 10]. Показано, что пектин способен образовывать гидрогелевые структуры, подвергаться ферментативной деградации в толстом кишечнике и влиять на кишечную микробиоту [7, 19, 20]. Зеин, благодаря гидрофобным свойствам, рассматривается как перспективный компонент для стабилизации полимерных матриц и замедления высвобождения лекарственных веществ [8, 9].

Наряду с этим недостаточно изучено совместное применение пектина и зеина в составе гидрогелевых микросфер. В литературе, данные о влиянии способа очистки пектина, его молекулярной массы и степени этерификации на формирование пектин-зеиновых систем, инкапсуляцию лекарственного вещества и кинетику его высвобождения представлены ограниченно [10, 11, 12, 13]. Также недостаточно разработаны подходы к оценке таких систем в условиях *in vitro, ex vivo* и *in vivo*, включая установление корреляционной зависимости IVIVC и EVIVC.

«Изучение влияния структурно различных пектинов, пребиотических и пробиотических компонентов на состав и метаболическую активность микробиоты кишечника требует отдельного внимания» [16, 17, 18]. Кроме того, ограниченно освещены клинические аспекты применения комбинации

«пектин–антибиотик» при кишечных инфекциях [15]. Поэтому комплексное исследование пектин-зеиновых систем доставки с учётом технологических, фармакокинетических, микробиологических и клинических аспектов остаётся актуальной научной задачей.

Связь исследования с программами (проектами) и научной тематикой. Работа соответствует приоритетам Стратегии Республики Таджикистан в области науки и техники на 2011 - 2020 годы и Государственной программы развития фармацевтической промышленности Республики Таджикистан на 2021 - 2025 годы, направленных на развитие научно-технологического потенциала и создание отечественных лекарственных средств. Исследование выполнено в соответствии с планом НИР Института химии им. В.И. Никитина Национальной академии наук Таджикистана по теме “Создание носителей лекарственных веществ и пищевых ингредиентов на основе биополимеров” (№ ГР 0116TJ00543), а также в рамках реализации международных проектов Международного научно-технического центра (МНТЦ Т-1419, Т-1420).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Цель исследования. Целью настоящего исследования является теоретико-экспериментальное обоснование принципов создания систем доставки лекарственных средств на основе пектина и зеина, оценка их эффективности, изучение модулирующего влияния биополимеров на кишечную микробиоту и обоснование возможности оптимизации направленной терапии заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Задачи исследования. Для достижения этой цели необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать способ очистки пектина для получения стандартизированного (фармакопейного) продукта и определить его физико-химические характеристики.
2. Разработать технологию получения кукурузного белка зеина и определить его физико-химические характеристики.
3. Разработать технологию получения гидрогелевых микросфер на основе композита пектин–зеин и установить их способность к инкапсулированию лекарственного средства и обеспечению пролонгированного высвобождения.
4. Установить влияние состава пектин-зеиновой системы и условий её формирования на структурно-функциональные характеристики микросфер, степень инкапсуляции и кинетику высвобождения лекарственного вещества.
5. Провести фармакокинетические исследования разработанных пектин-зеиновых микросфер в системах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.
6. Выявить корреляционные зависимости между результатами *in vitro*-, *ex vivo*- и *in vivo*- исследований (IVIVC, EVIVC) и оценить возможность прогнозирования *in vivo* поведения лекарственного средства.
7. Сравнить одно- и трёхкамерные модели толстого кишечника по воспроизведению структуры и функциональной активности кишечной микробиоты. Оценить влияние уровня pH среды на структуру

микробного сообщества и продукцию короткоцепочечных жирных кислот.

8. Изучить воздействие пектина различной структуры на состав и метаболическую активность кишечной микробиоты.
9. Установить влияние пребиотических и пробиотических компонентов на структуру и функциональную активность кишечной микробиоты.
10. Исследовать эффективность комбинации “пектин–антибиотик” на клиническое течение заболевания и показатели выздоровления больных с инфекциями желудочно-кишечного тракта.

Объект исследования. Объектами исследования являются биополимеры (пектин, зеин), системы доставки лекарственных средств на их основе, а также пребиотические компоненты и пробиотические штаммы, влияющие на кишечную микробиоту.

Предмет исследования. Предметом исследования являются структурно-функциональные характеристики пектина, полученного различными способами технологической очистки, и закономерности получения зеина из кукурузы; механизмы формирования и стабилизации гидрогелевых микросфер “пектин–зеин”; влияние биополимеров, пребиотических и пробиотических компонентов на структуру и метаболическую активность кишечной микробиоты; фармакокинетические параметры и модели, основанные на данных *in vitro* -, *ex vivo* - и *in vivo* - исследований; клиническая эффективность пектинсодержащих композиций в комплексной терапии инфекционных заболеваний кишечника.

Научная новизна исследования

- Выявлены закономерности влияния методов технологической очистки пектина на его молекулярно-массовое распределение, структура, степень этерификации, определяющие способность биополимера формировать матричные системы контролируемого высвобождения лекарственных веществ.

- Научно обоснованы принципы формирования композиционных гидрогелевых систем на основе пектина и зеина; раскрыты механизмы их межмолекулярного взаимодействия при варьировании состава и природы сшивающих агентов, а также определены рациональные условия получения микросфер с регулируемой кинетикой высвобождения лекарственного вещества.
- Выявлены молекулярно-структурные характеристики пектина (молекулярная масса, степень этерификации), определяющие его влияние на метаболическую активность кишечной микробиоты; установлено влияние pH среды, пре- и пробиотических компонентов на структуру микробных сообществ и уровню короткоцепочечных жирных кислот.
- Разработан подход к фармакокинетической оценке биополимерных систем доставки лекарственных средств, объединяющий результаты *in vitro -, ex vivo -* и *in vivo -* исследований, что позволило установить взаимосвязь между структурными параметрами матрицы и фармакокинетическими параметрами лекарственного средства.
- Установлена взаимосвязь между молекулярной массой, степенью этерификации и функциональной активностью пектина, что позволяет прогнозировать его влияние на процессы формирования систем доставки лекарственных средств.
- Осуществлена клинико-экспериментальная оценка комбинации «пектин–антибиотик» и показано, что включение пектина терапию способствует улучшению клинического течения заболевания и изменяет фармакокинетический профиль антибиотика.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования. Теоретическая значимость работы состоит в научном обосновании применения пектина при создании систем доставки лекарственных средств с учётом его структуры и взаимодействия с кишечной микробиотой. В ходе исследования получены новые сведения о формировании пектин-зеиновых гидрогелевых матриц и особенностях высвобождения и абсорбции

лекарственного вещества, также показана роль молекулярной массы и степени этерификации пектина в изменении состава и метаболической активности кишечной микробиоты. Установленные корреляции *in vitro–in vivo* и *ex vivo–in vivo* могут быть использованы для прогнозирование поведение разработанных систем в организме и при разработке пектин-зеиновых матриц с другими лекарственными веществами.

Научно-практическая значимость исследования связана с разработкой способа очистки пектина и технологии получения пектин-зеиновых гидрогелевых микросфер, возможности регулировать высвобождение лекарственного вещества путём изменения состава и условий формирования микросфер. Разработанные системы доставки лекарственных средств представляет интерес для создания лекарственных форм пролонгированного действия, в том числе предназначенных для доставки лекарственных средств в толстый кишечник. Полученные данные могут использоваться при выборе состава полимерной матрицы и оценке их фармакокинетических характеристик, а результаты клинического исследования комбинации яблочного пектина с метронидазолом дают основание для дальнейшего изучения её применения в комплексной терапии кишечных инфекций.

Положения, выносимые на защиту

1. Влияние технологических способов очистки пектина на его химический состав, молекулярно-структурные характеристики и применимость в фармации для получения гидрогелевых систем доставки лекарственных средств.
2. Оптимальные технологические условия получения зеина из растительного сырья и особенности технологического процесса получения гидрогелевых микросфер, связанные с межмолекулярными взаимодействиями пектинов с зеином.
3. Зависимость свойств пектин-зеиновых микросфер, степени инкапсуляции и скорости высвобождения лекарственного вещества от соотношения и

характеристик исходных биополимеров, а также от природы сшивающего двухвалентного катиона.

4. Пролонгированное, контролируемое высвобождение пироксикама из пектин-зеиновых микросфер и корреляционные зависимости между результатами исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, разработка на их основе моделей IVIVC и EVIVC позволяющих прогнозировать *in vivo* фармакокинетические параметры инкапсулированного лекарственного вещества.
5. Влияние молекулярной массы и степени этерификации пектина, условий культивирования, растворимых и нерастворимых фракций полисахаридов и пробиотического штамма *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG на структуру и функцию микробного сообщества кишечника. Особенности воспроизведения региональных различий кишечной микробиоты в однокамерной и трёхкамерной моделях толстой кишки.
6. Влияние совместного применения пектина и метронидазола на течение кишечных инфекций, сроки клинического выздоровления пациентов и фармакокинетические показатели лекарственного средства.

Степень достоверности результатов. Достоверность и обоснованность полученных результатов обеспечены применением комплекса современных взаимодополняющих физико-химических, микробиологических и биоинформационных методов, адекватных поставленным задачам исследования, а также воспроизводимостью экспериментальных данных и их статистической обработкой.

В работе использованы методы ИК- и УФ-спектроскопии, реометрии, ВЭЖХ, ГХ-МС, двумерной ЯМР-спектроскопии и секвенирования следующего поколения (Illumina/Solexa), совокупное применение которых позволило достоверно подтвердить структурные характеристики биополимеров и особенности их взаимодействия.

Достоверность технологических и фармакокинетических результатов подтверждена воспроизводимостью экспериментов, контролем технологических параметров и согласованностью данных, полученных в системах *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*. Установленные корреляционные зависимости (IVIVC, EVIVC) подтверждают надёжность и сопоставимость полученных результатов.

Обработка данных микробиоты выполнена с использованием современных биоинформационных методов, обеспечивающих корректность таксономической и функциональной интерпретации. Статистическая значимость результатов подтверждена применением методов PERMANOVA, ANOVA и линейных моделей с коррекцией множественных сравнений.

Клиническая часть исследования проведена с использованием сопоставимых групп пациентов и стандартизированных критериев оценки эффективности терапии, что обеспечивает достоверность клинических результатов и их согласованность с экспериментальными данными.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа посвящена разработке биополимерных систем доставки лекарственных средств на основе пектина и зеина, а также исследованию их физико-химических, фармакокинетических и микробиологических свойств. Исследования затрагивают вопросы технологии получения лекарственных форм, биофармацевтических аспектов и фармакологической оценки эффективности лекарственных систем и соответствуют паспорту специальности ВАК при Президенте Республики Таджикистан по следующим научным специальностям.

По специальности 3.4.1. «Технология получения лекарств» работа соответствует разделу II, подпунктам: п. 3 – разработка технологий получения субстанций и готовых лекарственных форм, так как разработаны технологии получения биополимерных систем доставки на основе пектина и зеина и формирования гидрогелевых микросфер с пролонгированным высвобождением; п. 4 – исследование особенностей технологии получения

лекарственных форм, поскольку изучены физико-химические и структурные характеристики пектина, полученного различными методами очистки, и установлены особенности формирования композиционных систем пектин–зеин; п. 6 – исследование биофармацевтических аспектов, так как изучены процессы инкапсуляции, влияние сшивающих агентов и кинетика высвобождения лекарственного вещества; п. 8 – совершенствование технологии получения лекарственных средств, в рамках которого предложены технологические подходы получения микросфер с определенными характеристиками.

По специальности 3.4.5 «Фармакология, клиническая фармакология» работа соответствует разделу II, подпунктам: п. 3 – исследование механизмов действия фармакологических веществ, так как изучено влияние пектина на кишечную микробиоту и продукцию короткоцепочечных жирных кислот; п. 4 – исследование фармакокинетики и взаимодействия лекарственных средств с организмом, поскольку установлено влияние структуры биополимерных систем на фармакокинетические параметры лекарственного вещества; п. 11 – изучение клинической эффективности, так как проведена клиническая оценка применения пектина при кишечных инфекциях; п. 13 – разработка методов математического моделирования, в рамках которого применены подходы IVIVC и EVIVC для сопоставления результатов *in vitro* -, *ex vivo* - и *in vivo* - исследований и прогнозирования поведения лекарственных систем.

Содержание диссертации, полученные научные результаты, а также сформулированные выводы и практические рекомендации соответствуют указанным научным специальностям и их разделам.

Личный вклад соискателя учёной степени в исследования. Основная часть экспериментальных и аналитических исследований, представленных в диссертации, выполнена соискателем самостоятельно. При его непосредственном участии усовершенствованы способы получения и очистки пектина, а также технология выделения зеина, которые в дальнейшем

использовались при разработке композиционных систем доставки лекарственных средств.

Соискателем разработана технология получения гидрогелевых микросфер на основе пектина и зеина, подобраны условия их формирования, позволяющие получать устойчивые системы с регулируемым высвобождением лекарственного вещества. Проведены исследования *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, в том числе изучение фармакокинетики лекарственного вещества и установление корреляционных зависимостей между полученными результатами (IVIVC, EVIVC).

Значительная часть работы посвящена изучению кишечной микробиоты. Соискателем проведены микробиологические исследования влияния биополимеров и пробиотического компонента на состав микробных сообществ и их метаболическую активность. Для характеристики исследуемых образцов и оценки полученных результатов использованы физико-химические и инструментальные методы анализа, в частности ЯМР-спектроскопия, ВЭЖХ, ГХ-МС, секвенирование нового поколения и биоинформатическая обработка данных.

В рамках клинической части исследования соискатель участвовал в сборе и анализе данных, полученных при изучении комбинированного применения пектина и антибиотика у пациентов с кишечными инфекциями.

Обработка и обобщение экспериментальных результатов, их интерпретация, а также формулирование основных выводов и рекомендаций по практическому использованию выполнены соискателем самостоятельно.

Апробация и реализация результатов диссертации. Основные результаты диссертационного исследования были доложены и обсуждены на международных научных конференциях: «Фармация: современное состояние, достижения и перспективы», посвящённой 80-летию КазНМУ имени С.Д. Асфендиярова (Алматы, 2011); «Наука о полимерах» (Ташкент, 2011); The 3rd International Congress on Biohydrogels (Florence, Italy, 2011); International Conference and Exhibition on Pharmaceuticals, Nutraceutical and Cosmeceutical

Technology, PharmaTech–2012 (Kuala Lumpur, Malaysia, 2012); Book of Abstracts “Smithy of Idea”, International Conference (Rusne, Lithuania, 2013); Baltic Polymer Symposium (Trakai, Lithuania, 2013); 3rd EPNOE International Polysaccharide Conference (Nice, France, 2013); международной научно-практической конференции «Биофармацевтические аспекты разработки лекарственных препаратов» (Душанбе, 2024); ACS Fall 2021: Resilience of Chemistry (Atlanta, GA, USA; Virtual, 2021); ACS Fall 2022: Sustainability in a Changing World (Chicago, IL, USA; Virtual, 2022); 31st International Conference of FFC (Yerevan, Armenia, 2023); ACS Fall 2025 (Washington, DC, USA, 2025); научно-практической конференции учёных Таджикистана и Узбекистана (Ташкент, Узбекистан, 2026).

Публикации по теме диссертации. По теме диссертационного исследования опубликовано 27 научных работ, в том числе 11 статей в изданиях, индексируемых в международных базах данных Scopus и Web of Science, 2 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Президенте Республики Таджикистан, 12 работ в материалах международных научных конференций, 1 патент на изобретение, 1 монография и фармакопейная статья.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 279 страницах и включает введение, обзор литературы, главу «Материалы и методы исследования», шесть глав собственных исследований, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы, включающий 349 источников. Работа иллюстрирована 19 таблицами и 68 рисунками.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ БИОПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

1.1. Краткий обзор существующих традиционных лекарственных форм и их ограничения

«Введение новых технологий в фармацевтическую отрасль выходит за рамки простой оптимизации дозы и сроков хранения препарата. Современные требования к фармакотерапии предполагают разработку систем доставки лекарственных средств, способных обеспечивать целенаправленное действие на патологические очаги, снижать риск системных побочных эффектов и повышать приверженность пациентов к лечению» [21, 22]. Традиционные лекарственные формы широко применяются в клинической практике, однако имеют определённые ограничения.

«Жидкие лекарственные формы удобны для пациентов, испытывающих трудности при проглатывании таблеток и капсул. Они также позволяют изменять дозу лекарственного средства в зависимости от потребности пациента. К их недостаткам относятся ограниченная стабильность при хранении и возможные ошибки дозирования, особенно при использовании мерных ложек и чашек» [22]. Вместе с тем обычные формы с немедленным высвобождением не всегда обеспечивают защиту лекарственного вещества от воздействия желудочной среды и его доставку в нужный отдел желудочно-кишечного тракта.

Эти ограничения важны при длительном лечении хронических заболеваний, когда пациенту приходится одновременно принимать несколько препаратов. В таких случаях трудности индивидуального подбора дозы могут приводить к недостаточному терапевтическому эффекту или повышать риск нежелательных реакций. Это, в свою очередь, увеличивает вероятность развития нежелательных реакций, особенно при применении высокоактивных фармацевтических субстанций, включая противоопухолевые препараты.

Кроме того, традиционные лекарственные формы не позволяют контролировать место и скорость высвобождения действующего вещества, что приводить к колебаниям его концентрации в крови и тканях, как следствие, к снижению стабильности терапевтического эффекта. Появление новых классов лекарственных средств, в том числе биологических препаратов, пептидов и белков, определило необходимость разработки систем, способных обеспечивать их защиту и целенаправленную доставку. Это связано с тем, что данные соединения подвержены разрушению под действием ферментов и кислой среды желудка при использовании традиционных лекарственных форм.

«Поэтому в последние годы возникла интерес к полимерным системам адресной доставки, которые могут целенаправленно доставить активное вещество и регулировать его высвобождение в зависимости от условий конкретной среды (pH, наличие ферментов, температура)» [4, 23, 24]. Полимерные системы доставки ЛС позволяют снизить системную токсичность, высвобождая ЛС преимущественно в поражённой зоне. Следовательно, повышают эффективность поддерживая терапевтическую концентрацию в нужном месте и длительное время, улучшить комплаентность благодаря реже требуемым приёмам и меньшему риску побочных действий и обеспечить сохранность нестабильных или труднорастворимых веществ за счёт защитных или стимул-чувствительных оболочек.

Таким образом, переход к полимерным системам доставки меняет принципы производства и применения лекарственных средств, позволяет приблизить терапию к персонализированному подходу (с контролируемым высвобождением, минимальной токсичностью и максимальной эффективностью).

1.1.1. Традиционные пероральные формы

«Пероральный путь введения остаётся наиболее популярным благодаря удобству для пациента, простоте и относительно невысокой стоимости производства» [2, 25].

Таблетки. «Таблетированные формы в современной фармакотерапии распространены благодаря их компактности, стабильности и удобству дозирования» [26]. Развитие технологий грануляции (влажной, сухой), а также прямое прессование, позволили охватить широкий спектр действующих веществ. Однако для ряда субстанций (например, биологически активных пептидов и белков) таблетки могут быть неприменимы из-за их разрушения в агрессивной среде желудка или недостаточной биодоступности. Кроме того, необходимость частого приёма (2–3 раза в сутки) часто снижает комплаентность у пациентов [26].

Капсулы. Твёрдые и мягкие желатиновые капсулы позволяют инкапсулировать гидрофильные и гидрофобные вещества, в том числе масла и суспензии. Благодаря относительно хорошей герметичности, защите от кислорода и влаги, капсулы обеспечивают сохранность действующих веществ [27]. Тем не менее, процессы производства капсул (особенно мягких желатиновых) более сложны и дороги, чем таблеток. Помимо этого, «желатиновые оболочки чувствительны к колебаниям влажности и температуры, а при нарушении условий хранения могут терять механическую прочность и герметичность» [27].

Порошки и гранулы. «Порошки реже применяются как самостоятельная лекарственная форма, но широко используются при изготовлении других форм. Они удобны в случаях, когда требуется быстрое растворение или диспергирование в жидкой среде. Вместе с тем их применение может сопровождаться трудностями при дозировании и неприятными вкусовыми ощущениями» [28].

1.1.2. Трансдермальные системы

«Трансдермальные системы позволяют доставлять активные вещества через кожу с пролонгированным и контролируемым высвобождением» [29, 30]. «Ограничением является низкая проницаемость кожи для большинства лекарств, что требует применения усилителей доставки (например, диметилсульфоксида), которые могут вызывать раздражение» [30]. Несмотря

на это, пластыри (например, фентаниловые) доказали свою эффективность для контрацепции, обезболивающей терапии, что повышает комплаентность и исключает пероральный приём [29].

1.1.3. Ограничения и перспективы

Среди основных ограничений традиционных лекарственных форм можно выделить следующие:

1. Нецелевая доставка. «Большинство пероральных и парентеральных форм доставляют действующее вещество нецеленаправленно, а по всему организму, повышая риск побочных эффектов» [25].
2. Ограниченная продолжительность действия. «Многие лекарственные формы без специальных покрытий или полимерных матриц не обеспечивают длительного высвобождения действующего вещества. Это может требовать более частого приёма препарата, особенно при лечении хронических заболеваний» [4].
3. Стабильность. Некоторые субстанции разрушаются при хранении, требуют специальных условий (низкая температура, отсутствие света), что усложняет логистику [2].
4. Необходимость строгого соблюдения режима. Сложные курсы терапии затрудняют приверженность пациента и негативно сказываются на исходах лечения [22].

Новые направления в фармации, нанотехнологии, биополимерные системы, активно развиваются для решения данных ограничений. Поэтому концепции целенаправленной доставки, биораспадающих материалов и адресного высвобождения занимают основное место в современных исследованиях [1, 21, 23, 25, 31].

1.2. Перспективы применения систем доставки лекарств для повышения эффективности и снижения побочных эффектов лекарственных средств.

1.2.1. Историческая справка и становление концепции целенаправленной доставки

«Идея целенаправленной доставки ЛС к очагу патологии возникло во второй половине XX века учёные начали задумываться о способах селективного накопления лекарственных средств в опухолях и воспалённых тканях» [32, 33]. Однако «серьёзный толчок к развитию целенаправленной доставки произошёл с появлением нанотехнологий и методов контроля за нано- и микроструктурами носителей» [34]. Одним из пионерских направлений стало «создание липосом для доставки противоопухолевых антибиотиков (например, доксорубицина), что позволило уменьшить кардиотоксичность за счёт снижения концентрации свободного доксорубицина в крови» [35].

1.2.2. Ключевые аспекты целенаправленной доставки

1. Повышение селективности действия ЛС. «Главная цель – это увеличение доступа действовавшего вещества к поражённому органу или ткани, избегая при этом системных побочных эффектов» [31]. Например, для «лечения злокачественных опухолей важно, чтобы цитостатик в больших концентрациях накапливался непосредственно в раковых клетках, не затрагивая при этом здоровые ткани» [36].
2. Сокращение необходимых доз ЛС. «Благодаря высокой целенаправленной доставке к органам мишеням становится возможным использовать меньшие дозы ЛС, сохраняя терапевтическую эффективность» [21]. Это свойство актуально для лекарств с узким терапевтическим индексом, например химиопрепараты и антибиотики.
3. Снижение побочных эффектов ЛС. «Чем меньше количество ЛС циркулируется системно, тем меньше риск токсических проявлений (например гепатотоксичность, нефротоксичность и негативное влияние на желудочно-кишечный тракт)» [2].

4. Пролонгирование действия ЛС. «Известно, что некоторые полимерные системы доставки ЛС в форме липосом, полимерных микро- и наночастиц, способны удерживать активное вещество в кровотоке дольше, чем сама молекула удерживалась бы в свободном состоянии» [37]. Это обеспечивает длительный терапевтический эффект и в последствие снижается частота приёма или введения.

1.2.3. Механизмы целенаправленной доставки лекарственных средств

В основном различают следующие механизмы доставки лекарственных средств:

- Пассивная доставка. «Основана на сосудистой проницаемости и других особенностях гемодинамики в зоне патологии например, эффект повышенной проницаемости и задержки для опухолей» [3]. Особенно в тканях с повышенной сосудистой проницаемостью скапливаются частицы определённого размера и морфологии.
- Активная доставка. «Реализуется путём прикрепления к поверхности носителя лигандов (антител, фрагментов белков, олигосахаридов), специфически распознающих рецепторы патогенной клетки или ткани» [3]. Такой подход более селективен, однако требует сложных и дорогостоящих методов синтеза.
- Стимул чувствительные механизмы. «Включают доставку носителя, способного реагировать на внешние (нагрев, ультразвук, свет) или внутренние (pH, концентрация ферментов) стимулы, высвобождая лекарство только в заданном месте или при определённых условиях» [38].

1.2.4. Примеры реализации и перспективы

- «Препараты на основе антител (моноклональные антитела или конъюгаты “антитело–лекарственное вещество”) уже широко применяются в онкологии (например, трастузумаб–эмтанзин)» [39].
- Липосомальные препараты с доксорубицином, амфотерицином B и др. [40] успешно применяются для снижения токсичности.

- Полимерные «микрочастицы из биосовместимых материалов (например, поли(молочной-когликолевой) кислоты – PLGA) активно исследуются в контексте пролонгированной и адресной доставки» [41].

С дальнейшим «развитием молекулярной биологии, наноматериалов и методов химической модификации белков открываются новые горизонты для персонализированной медицины, где лекарственная терапия будет ещё более индивидуализирована и точна» [42].

Таким образом, необходимость целевой доставки лекарств диктуется задачей повышения эффективности лечения при одновременном снижении побочных эффектов и токсичности. Этот подход фундаментально изменяет парадигму в фармакотерапии большинства заболеваний – от инфекционных до онкологических.

1.3. Пектины и зеины в разработке биополимерных систем доставки лекарственных средств

1.3.1. Общие положения о роли биополимеров

В последние десятилетия «биополимерные носители получают всё большее признание благодаря своей биосовместимости, многообразию структур и возможности тонко настраивать параметры высвобождения лекарственного средства» [31, 43]. «Биополимеры могут выступать в качестве матриксных основ (гидрогели, плёнки), микрочастиц, наночастиц, покрытий для таблеток и капсул, а также компонентом для имплантов и трансдермальных систем» [23, 24, 29, 44]. К их преимуществам относят:

1. Безопасность. Как правило, низкая токсичность и отсутствие иммуногенности при соответствующей очистке.
2. Биоразлагаемость. Возможность последующего расщепления в организме до безопасных метаболитов.
3. Динамичность свойств. Широкий выбор природных и химически модифицированных полимеров позволяет менять

гидрофильность/гидрофобность, скорость гелеобразования, устойчивость к pH.

В контексте данной диссертационной работы особый интерес представляют «полисахариды (в частности, пектины) и белковые носители (зеины), которые уже продемонстрировали значительный потенциал для целевой доставки лекарств» [14, 45, 46, 47, 48, 49].

1.3.1.1. Полисахариды (пектины)

Структура и функциональные особенности. Пектины являются гетероструктурными полисахаридами, содержащимися в первичных клеточных стенках наземных растений. Впервые он был выделен и описан Heneri Bracannot в 1825 году. Присутствуют во всех высших растениях, особенно много во фруктах и в некоторых водорослях.

Структура пектиновых полисахаридов (ПП) зависит от многих параметров и может существенно изменяться в процессе роста и развития растения. Установлено, что «основную часть пектина составляют: гомогалактуронан (ГГ), рамногалактуронан I (RG-I) и рамногалактуронан II (RG-II)» (Рисунок 1.1.) [50, 51, 52]. Гомогалактуронан представляет собой линейную макромолекулу, связанную (α-1,4)-остатками D-галактозилуроновых кислот, в которых часть карбоксильных групп метилэтерифицирована. ГГ с высоким содержанием метоксильных групп относят к “пектину”, а с низким содержанием метоксильных групп – к “пектовой кислоте”.

В зависимости от источника получения ГГ может быть частично O-ацетилированным. ГГ составляет до 60% пектиновых полисахаридов первичной клеточной стенки растений. Предполагают, что многие свойства и биологические функции ГГ, определяются ионным взаимодействием карбоксильных групп.

Разветвлённая область «ПП состоит из трёх субъединиц: RG-I, RG-II и арабиногалактана» [53] (Рисунок 1.1.), которые могут «присутствовать в

различных соотношениях, как это показано для пектина из яблок, цитрусовых [52, 54, 55, 56], а также пектинов персика, лука и картофеля» [57, 58].

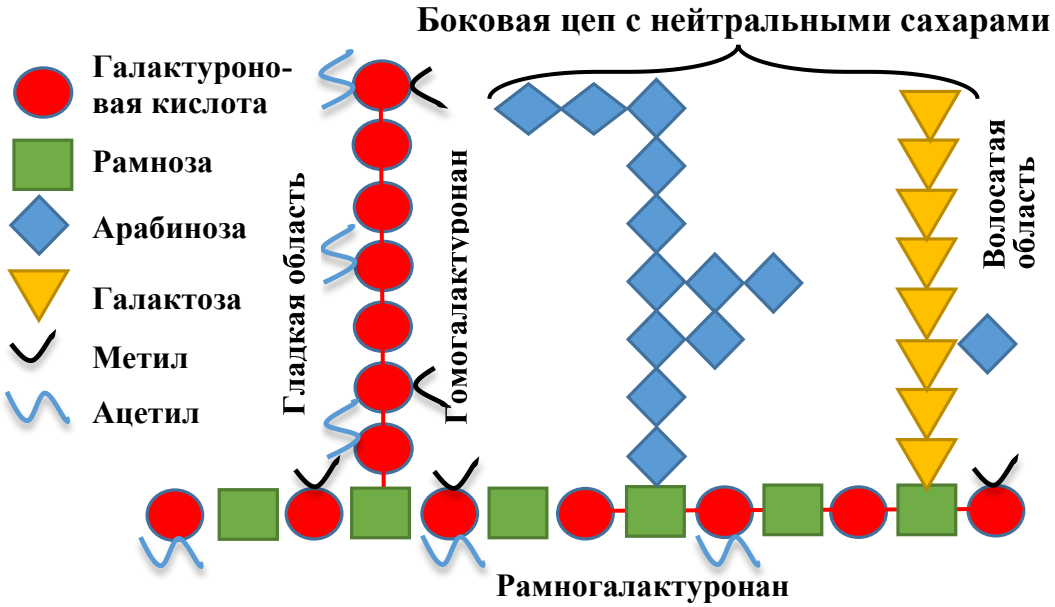


Рисунок 1.1. - Схематическое изображение различных компонентов молекулы пектинов

Таким образом, «ПП остаются сложным комплексным полисахаридом КС. Этот комплекс содержит, по меньшей мере, восемь различных типов ПП, из которых ГГ, RG-I и RG-II являются наиболее распространёнными, а XGA встречается в меньшей степени. Структурные элементы различных ПП их расположение в нативной комплексной структуре по-прежнему вызывает споры» [59].

Области, состоящие из гомогалактуронановых полимерных цепей, в литературе упоминаются как "гладкие" области, в то время как зоны, богатые остатками рамнозы, называют "волосатыми" областями, поскольку последний сахарный остаток несёт нейтральные боковые цепи из олигосахаридов, часто составленных из D-Galp, L-Araf, D-Xyl и других. Значительная часть карбоксильных групп остатков галактуроновых кислот главной цепи полисахарида метилэтерифицированы. Пектины, в которых СЭ галактуроновых остатков >50%, известны как высокометилированные (ВМ), а <50% как низкометилированные (НМ). Кроме того, ПП могут различаться по

молекулярной массе и физико-химическим свойствам. «В растениях пектины содержатся в межклеточном слое между первичными клеточными стенками, где они участвуют в регуляции движения воды и клеточных соков» [60]. «Будучи частью клеточной стенки и основным компонентом срединной пластинки, пектины осуществляют межклеточную адгезию в растительных тканях подобно коллагену в животных тканях [61], обеспечивают водно-солевой обмен, тургор и текстуру тканей, характеризуются высокой гелеобразующей способностью, повышают засухоустойчивость растений, устойчивость овощей и фруктов при хранении» [62].

Гелеобразующие свойства. «Под действием двухвалентных катионов (в особенности Ca^{2+}) пектин способен переходить в гелеобразное состояние. Данный механизм активно используется при создании медленно высвобождающих лекарственных форм» [48]. «При определённых условиях гель может “разбухать” и высвобождать активное вещество, что даёт возможность регулировать скорость высвобождения путём изменения концентрации пектина, степени метоксилирования и соотношения Ca^{2+}» [48].

СДЛ на основе пектинов. Недавние исследования показали, что бинарные полимерные матрицы являются хорошими носителями, поскольку они проявляют высокую селективность фармакологической активности за счёт фармокинетического контроля скорости высвобождения ЛВ. Преимущество данной системы заключается в транспорте ЛВ по механизму реакции нулевого порядка. В качестве носителей использованы пектин, алгинат и эфиры целлюлозы (Рисунок 1.2).

Пектиновые полисахариды и белки, как биоразрушающиеся и биосовместимые природные полимеры, широко используются в фармацевтической промышленности при создании СДЛ. Для успешной доставки лекарственного вещества в кишечное пространство, необходимо, чтобы полимерный носитель не разлагался в верхней части желудочно-кишечного тракта. Способность НМ-пектина образовывать гель в присутствии

ионов металлов явилось основой при создании СДЛ в виде микросфер, микрокапсул и композиций.

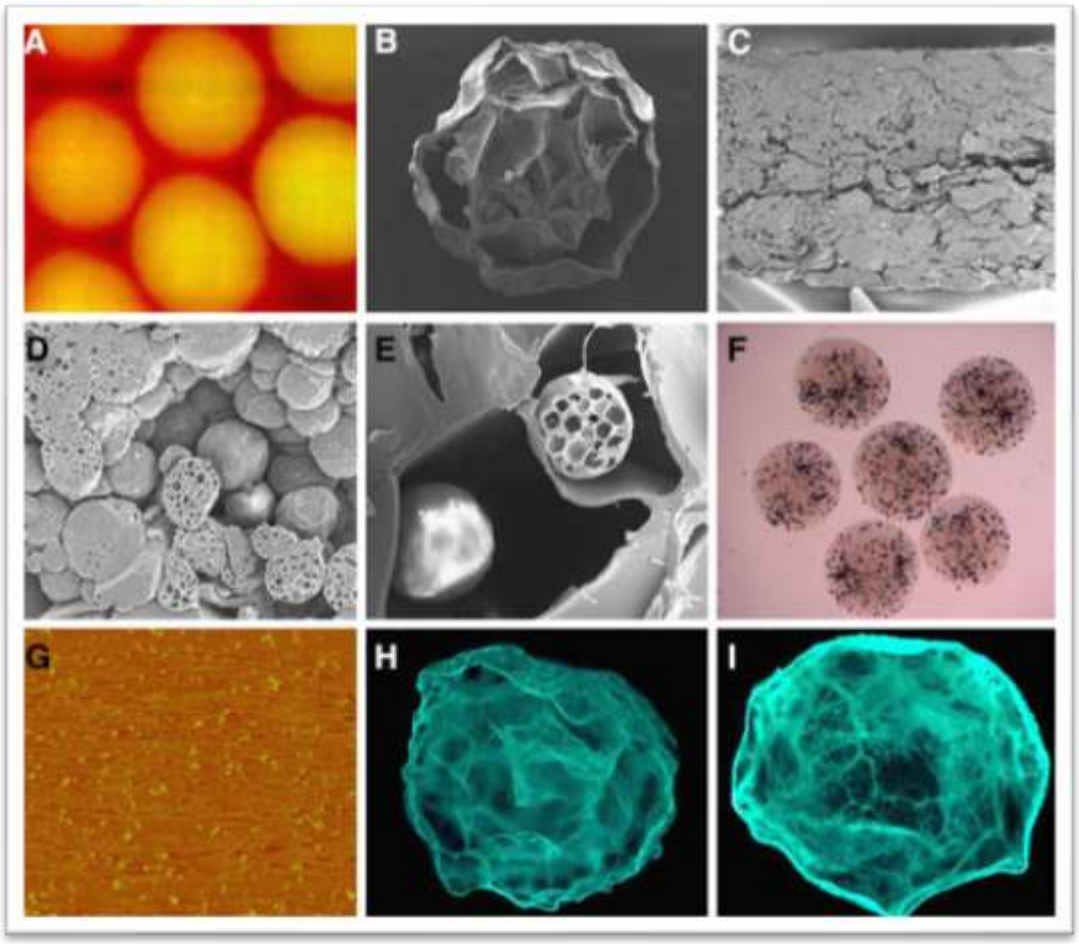


Рисунок 1.2. - СДЛ на основе пектина, разработанная в восточном региональном научно-исследовательском центре Госдепартамента США по сельскому хозяйству. (a) микросферы пектина, сшитые с ионами кальция; (b) гребнеобразная структура созданная путём лиофилизации; (c, d) таблетка в форме отдельных частиц; (e, f) шрапнельная композитная структура, состоит из пектинов и поли(лактид-со-гликолид); (g) пектиновый гель; (h) кальций-инициированные гидрогелевые шарики; (i) коацерват пектина с зеином [63]

Однако, высокая степень набухания пектинового геля в физиологических условиях способствует преждевременному высвобождению ЛВ, вследствие расширения размера его пор. Предотвратить данный процесс можно за счёт увеличения гидрофобности полисахаридной сетки включением в неё гидрофобного полимера посредством физической сшивки.

Использование пектиновых полимеров в качестве носителей ЛВ открывает новые перспективы в проектировании систем для целенаправленной доставки необходимых соединений.

Их специфические гидродинамические характеристики в водных средах определяются состоянием карбоксильных групп полигалактуроновых звеньев, наличием боковых цепей из нейтральных полисахаридов и способностью образовывать внутри- и межмолекулярные связи. Совокупность этих факторов делает пектины эффективной матрицей для носителей ЛВ.Они являются потенциальными носителями, так как устойчивы к действию ферментов верхней части ЖКТ и попадая в толстую кишку специфически распадаются на полезные для микрофлоры вещества – короткоцепочечные жирные кислоты» [64].

По существу, полимерные транспортные средства позволяют ЛВ быть переданными в течение длительного промежутка времени и к точному локальному участку действия. Они разработаны, чтобы увеличить безопасность и эффективность препарата, улучшить совместимость с организмом пациента. Использование полимеров позволяет поддержать терапевтические уровни ЛВ, уменьшить профили побочного эффекта, частоту дозировки и облегчить доставку ЛВ с коротким временем полураспада в *in vivo* условиях.

В настоящее время пектин имеет перспективные фармацевтические цели и рассматривается в качестве носителя ЛВ в толстый кишечник и может быть использован для системного действия или местного лечения заболеваний, таких как неспецифический язвенный колит, болезнь Крона, рака толстой кишки (Таблица 1.1.). «Авторами экспериментально было показано, что биополимерные комплексы на основе пектинов и зеинов кукурузы содержащие пироксикам замедляют высвобождение ЛС в верхней части ЖКТ и деградируются в толстом кишечнике» [64, 65, 66, 67].

Таблица 1.1. - Терапевтические системы на основе пектинов

Лекарственная форма	Применимость	Литература
Таблетки	Замедленное высвобождение ЛВ, таблетки получены путём прямого сжатия, гидрогелевая матричная система.	[68, 69, 70]
Гелевые шарики	Замедленное высвобождение лекарств, пектинат кальция или кальция альгинат-пектинат подготовлен методом ионотропного геля	[71, 72]
Частицы	Альгинат-пектин-полилизиновая система	[73]
Таблетки покрытый оболочкой	Покрытие с НМ-пектином или ВМ-пектином в сочетании с коммерческой водной дисперсией полимера	[74]
Капсулы с периодическим высвобождением	Прямое сжатие пектин/пектиназы	[75]
Капсулы с пульсирующим высвобождением ЛВ	Самопроизвольно образующаяся микроэмульсия для доставки ЛС	[76]
Нанокомпозитный трехмерно пористый каркас	СДЛ и инженерия костной ткани	[77, 78]
Микросферы	Доставки лекарств в толстый кишечник	[64, 65]
Микрокапсулы	Доставки лекарств в толстый кишечник	[79, 80, 81]

Применение и перспективы. Пектины находят широкое применение в медицине и фармации благодаря своим биологическим и физико-химическим свойствам. Они используются как активные компоненты и вспомогательные вещества в следующих направлениях:

1. Пребиотики и модуляция микробиоты кишечника. Пектины стимулируют рост полезных микроорганизмов (*Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*) и

синтез КЦЖК, что способствует восстановлению кишечного барьера и иммуномодуляции.

2. СДЛ. Низкометилированные и высокометилированные пектины применяются для создания СДЛ в виде гидрогелей, эмульсионных микрокапсул и наночастиц для контролируемого высвобождения ЛС, включая антибиотики и противоопухолевые препараты.
3. Антиоксидантное и противовоспалительное действие. Пектины, обогащенные полифенолами, демонстрируют защитный эффект против оксидативного стресса и воспалений.
4. Детоксикация организма. Благодаря способности связывать тяжелые металлы, радионуклиды и токсины, пектины используются в препаратах для выведения вредных веществ из организма.
5. Ранозаживляющие материалы. На основе пектинов создаются биополимерные губки и покрытия для лечения ран и ожогов, обладающие антимикробной активностью.

Таким образом, эти направления делают пектины перспективным материалом для создания инновационных препаратов и терапевтических подходов в медицине и фармации.

1.3.1.2. Белки (зеин)

Структура и происхождение. «Зеин - проламиновый белок, экстрагируемый из кукурузного глютена, отличающийся высокой долей гидрофобных аминокислот, что предопределяет его низкую растворимость в воде» [82]. «Именно гидрофобность и способность образовывать плотные плёнки делают зеин перспективным носителем для лекарственных веществ» [9].

Основные аспекты фармацевтического применение и их особенности следующие:

1. Образование микрочастиц и наночастиц. Поскольку «зеин растворим в спиртах и частично в щелочных растворах, возникает возможность

“самоорганизации” белка при возврате к водной среде, что даёт микроглобулы, способные инкапсулировать активные вещества» [83].

2. Защитные гели и покрытия. «Зеиновые плёнки можно наносить на гранулы или таблетки, чтобы замедлить их растворение в кислой среде желудка; таким образом достигается контролируемое высвобождение в тонком или толстом кишечнике» [8].
3. Совместимость с другими системами. «Для преодоления некоторых ограничений (например, избыточной гидрофобности) зеин комбинируют с гидрофильными полимерами (пектинами, целлюлозой, полиэтиленгликолем) или даже с другими белками (казеин, желатин)» [9, 14, 83].

Таким образом, композиты на основе зеина и пектинов открывают возможности для многокомпонентных систем, сочетающих целенаправленную доставку, минимизацию побочных эффектов и модуляцию микробиоты.

1.4. Микробиота кишечника и её влияние на фармакокинетику лекарств

1.4.1. Современное понимание микробиоты кишечника

«Человеческое тело не одиноко, внутри каждого человека живут триллионы микроорганизмов, таких как бактерии, вирусы, грибы и другие формы жизни, которые в совокупности известны как микробиом» [84]. Микробы живут в различных частях нашего тела, но микробиота кишечника привлекает исследователей в основном из-за наибольшей плотности и количества бактерий, метаболизма пищи, метаболизма лекарств и ксенобиотиков, иммуномодуляции и защиты хозяина от различных патогенов.

В последнее время микробиом кишечника стал предметом интенсивных исследований, поскольку он играет жизненно важную роль в состоянии здоровья человека. «Микробиота кишечника рассматривается как “орган внутри органа” [85], который коэволюционировал и имеет симбиотические отношения с человеком для контроля физиологического гомеостаза» [86]. «Хозяин обеспечивает питание микробиоте; микробиота, в свою очередь,

обеспечивает критически важные функции, которые хозяин не может выполнять самостоятельно, например, производство некоторых витаминов, переваривание сложных полисахаридов [87] и формирование иммунологической среды» [88, 89].

Согласно данным базы Scopus, количество научных публикаций, связанных с микробиотой кишечника, экспоненциально растёт. Например, от нескольких в 2000 году до увеличения более чем 500 раз в 2024 году (Рисунок 1.3.). «Этот рост связан с развитием новых “омик”-технологий и биоинформатики, дающих данные высокопроизводительного секвенирования и мощные инструменты биоинформатики для анализа массивных данных, используемых учёными для различения не только микробных сообществ, но и функционального и филогенетического профилирования целых микробных сообществ» [90, 91, 92, 93, 94].

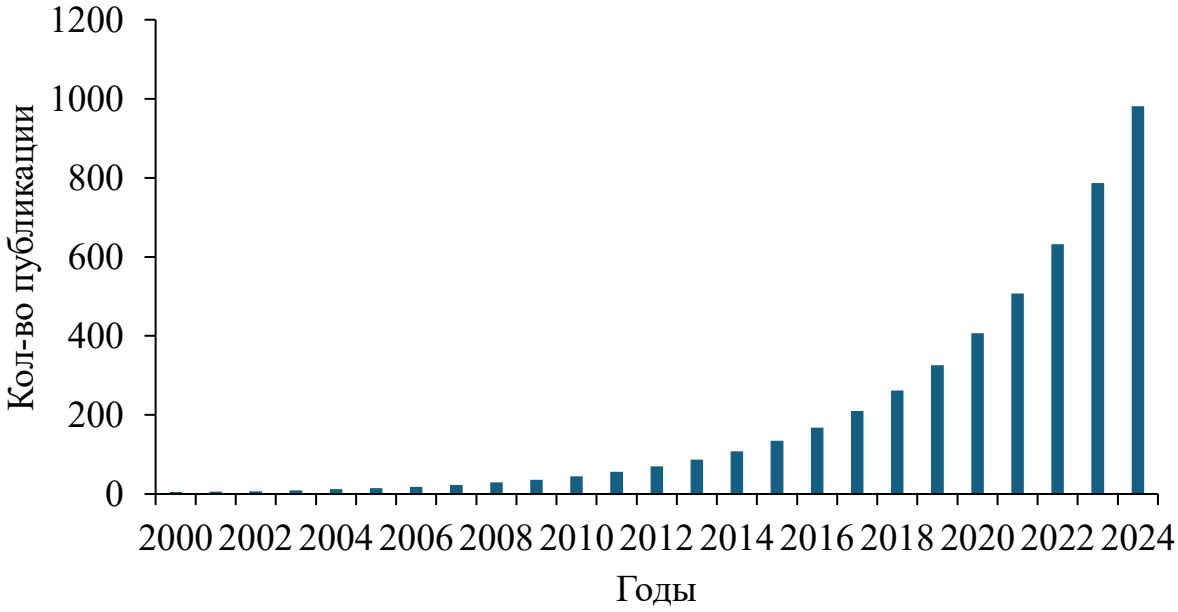


Рисунок 1.3. – Рост количества публикаций, связанных с микробиотой кишечника, по данным базы Scopus за 2000–2024 гг

Особенно секвенирование нового поколения (NGS) дает исследователям возможность глубоко изучать микробиом кишечника [95].

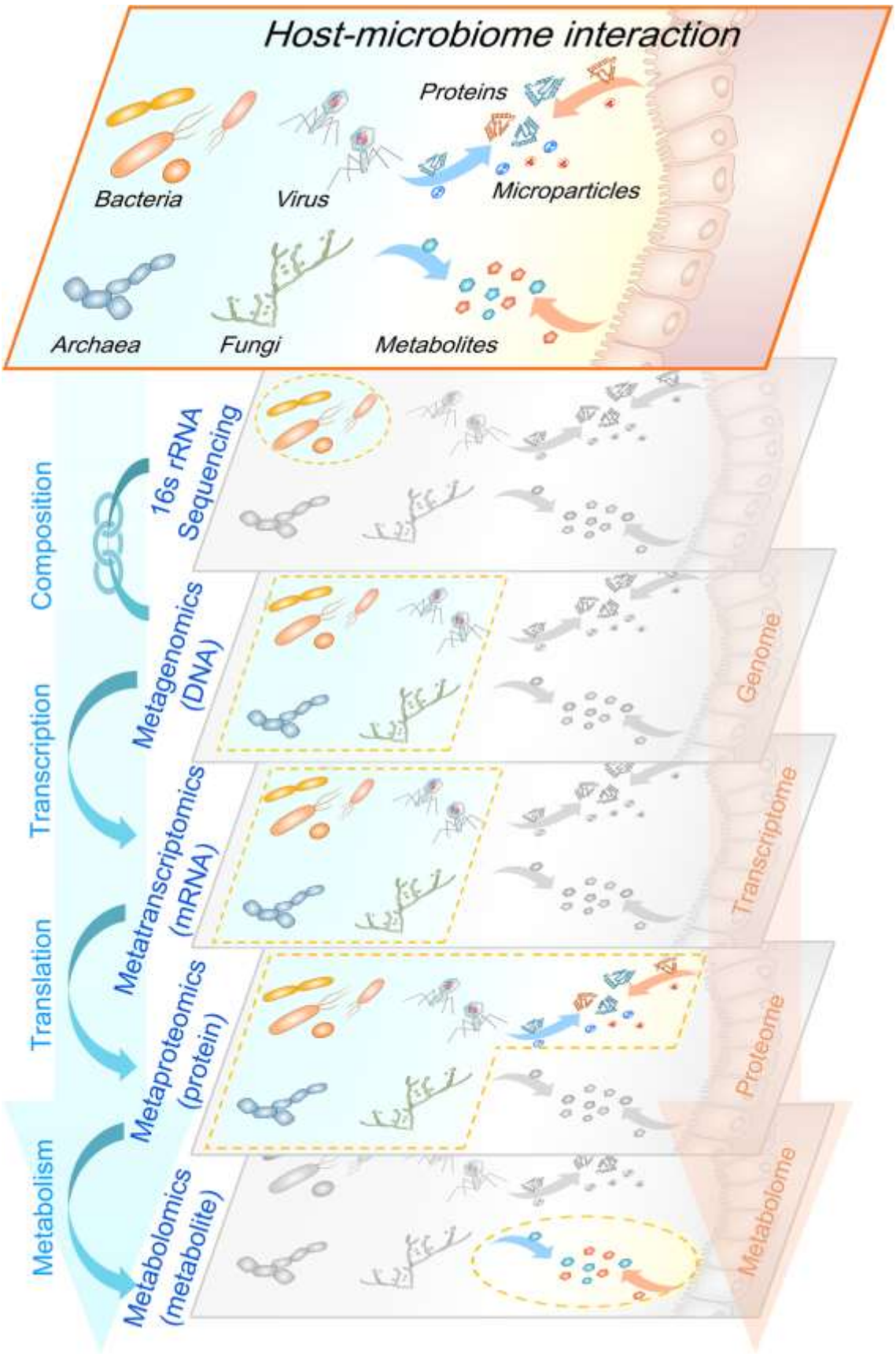


Рисунок 1.4. - Метаомные подходы к изучению микробиомов, ассоциированных с хозяином. Каждый метаомный подход раскрывает различные уровни информации в кишечных экосистемах [96]

«Исследователи вдохновлены этой возможностью, несколько исследовательских проектов, например, проект “Человеческий микробиом”, Meta-HIT, MyNewGut и Guangdong Gut Microbiome Project и другие, были начаты для изучения микробиома человека в целом и для разработки стратегии для улучшения здоровья через контроль состава микробиоты кишечника» [97]. «Количество научных доказательств, указывающих на то, что изменение структуры микробиоты кишечника человека влияет на состояние здоровья хозяина, увеличивается» [86]. Относительно легко получить свежие образцы кала. Однако информация, полученная из образцов кала, не представляет полной картины внутри кишечника, и ЖКТ по-прежнему остаётся сложной средой для описания и отбора проб. Это лишь мгновенный снимок разнообразия толстого кишечника» [94]. Большинство бактерий, живущих в нашем кишечнике, некультивируемы. Мы не можем сделать выводы об их функциях, используя только данные о составе. Поэтому цель метаомных технологий (секвенирование гена 16S рРНК, метагеномика, метатранскриптомика, метапротеомика и метаболомика) ответить на вопросы типа “Каков генетический потенциал некультивируемой бактериальной фракции микробиоты кишечника?” и ”Что на самом деле делают эти микробы?” (Рисунок 1.4.) [98].

1.4.1.1. Что мы знаем о микробиоте кишечника?

«Формирование микробиоты кишечника начинается после рождения с доминированием бифидобактерий и стабилизируется в течение первых 2–3 лет» [99, 100]. Состав микробиоты меняется в течение жизни по разнообразию и богатству (Рисунок 1.5.) [90, 100]. Кажется, что микробиота кишечника очень проста на уровне типа (филума) таксономии. Однако сложность увеличивается при переходе на уровень видов. Микробиота кишечника в основном содержит два доминирующих филума *Firmicutes* и *Bacteroidetes*. «Некоторые виды, кажется, находят свою среду обитания только в ЖКТ млекопитающих, например, *Bifidobacterium* и *Akkermansia spp*.» [101, 102]. «Максимальная сложность микробиоты достигается у взрослых с несколькими сотнями видов,

доминирующими в филумах *Bacteroidetes* и *Firmicutes»* [103]. «Состав микробиоты каждого человека достигает постоянного состояния, которое, как ожидается, остается довольно стабильным в течение большей части жизни взрослого человека» [90].

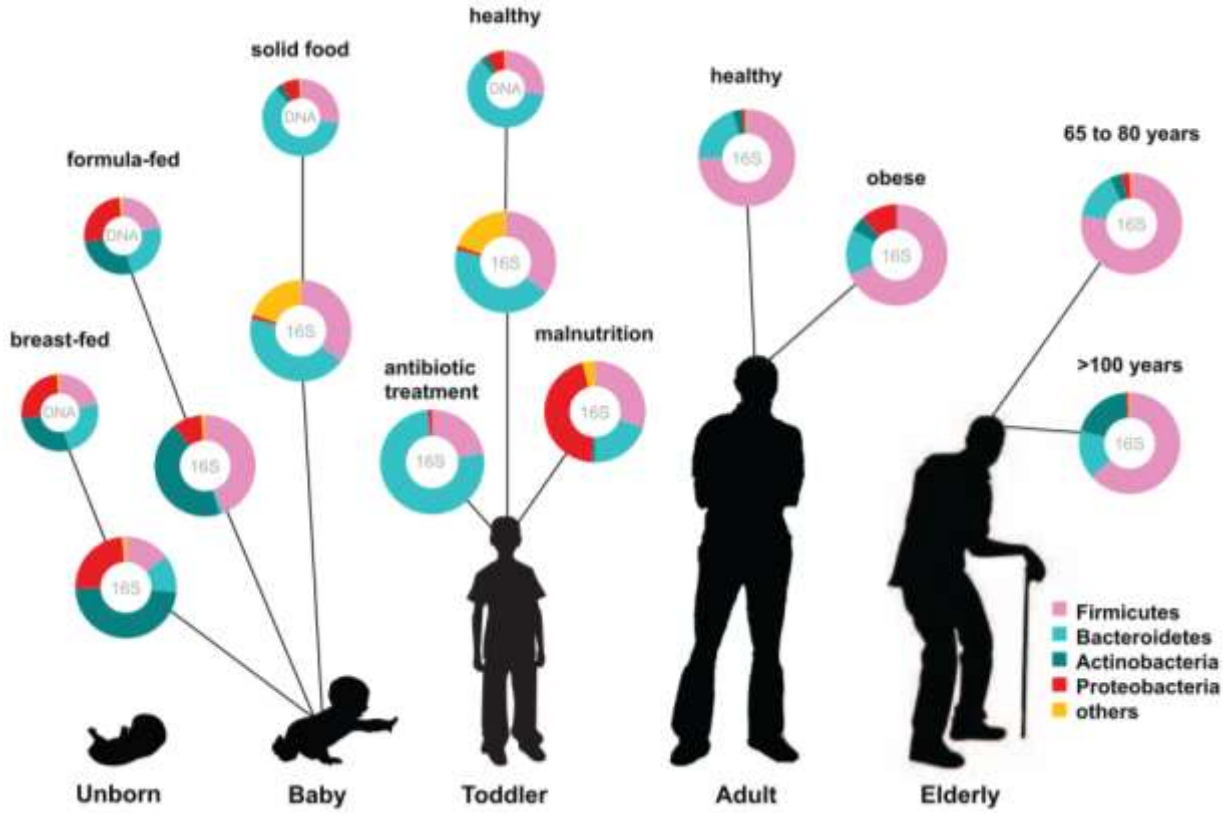


Рисунок 1.5. - Состав и относительная численность ключевых филумов микробиоты человека. Начало и изменение в различные стадии жизни и нарушение разными видами пищи. Данные получены с использованием подходов 16S рРНК или метагеномики (ДНК) [90]

1.4.1.2. Исследование микробиоты кишечника человека

Человеческий кишечник заселён разнообразным микробным сообществом. Состояние здоровья и болезни зависит от модуляции микробиоты кишечника. Наиболее точный способ исследования влияния диеты, пищи, лекарств и других химических веществ на микробиоту кишечника является проведение клинических испытаний на людях. Однако клинические испытания имеют ряд недостатков, например, дороговизна, сложный контроль и этические проблемы. Поэтому применение моделей *in vitro* полезно для скрининга перед клиническими испытаниями. Нужно

отметить, что все модели *in vitro* имеют свои преимущества и ограничения так как среда кишечника динамична и очень сложна.

«Микробиом кишечника участвует в несколько важных процессах, включая пищеварение, модуляция иммунитета и защиту от патогенов и имеет очень сложные симбиотические отношения с человеком» [104]. Также известно, что кишечник человека содержит примерно до 10^{14} микроорганизмов. Хотя человеческая клетка по сравнению с бактериальной содержит в 1000 раз больше ДНК, но коллективного микробного генома в человеческий геноме примерно в 100 раз меньше»» [105]. В целом, было хорошо аргументированно, что микробиом играет большую роль в поддержании здоровья хозяина. «Дисбаланс микробиоты приводит к многим заболеваниям, включая воспалительные заболевания кишечника, синдром раздражённого кишечника, диабет 2 типа, ожирение, инфекционные заболевания, заболевания печени, желудочно-кишечные раковые заболевания, метаболические заболевания, респираторные заболевания, психические и аутоиммунные заболевания» [106, 107]. Таким образом, идея модуляции микробиоты кишечника является важным направлением исследований, но из-за этических ограничений в клинических испытаниях на людей были разработаны модели *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* на животных для имитации и изучения ЖКТ человека.

Значение баланса микробиоты кишечника для здоровья человека было известно уже в XIX веке. «И.И. Мечников выдвинул теорию о том, что состояние здоровья можно улучшит, а старение можно замедлить, благодаря балансу микробиома кишечника с молочнокислыми бактериями, которые были обнаружены в йогурте» [108]. Получение знаний о составе кишечной микробиоты с помощью методов секвенирования следующего поколения значительно продвинуло разработку стратегий её модуляции. Эти технологии пришли на смену традиционным методам культивирования, которые были медленными и давали ограниченно объективную картину.

«Благодаря изучению микробиоты кишечника были выявлены сложные взаимодействия между микробиомом, иммунной системой хозяина и метаболическими процессами, имеющими важное значение для клинических приложений» [109, 110, 111]. «Известно, что бактерии играют важную роль во многих метаболических путях: например, в синтезе КЦЖК [112, 113], вторичных жёлчных кислот и лекарственных средств» [5]. «Более того, дисбаланс микробиома кишечника был ассоциирован с несколькими патологическими состояниями, включая ожирение» [114, 115, 116, 117], воспалительные заболевания кишечника [118, 119, 120, 121, 122], сахарный диабет II типа [123, 124, 125, 126], жировую болезнь печени [127, 128], респираторные заболевания [129, 130, 131], сердечно-сосудистые заболевания [132, 133, 134, 135] и многие другие нарушения» [136, 137, 138, 139]. «Бактерии, способные синтезировать КЦЖК, включая ацетат, бутират и пропионат, были признаны критически важными для гомеостаза колоноцитов» [140].

1.4.1.3. Полное метагеномное секвенирование методом дробовика

Идея секвенирования методом дробовика была предложена Стейденом в 1979 году; бактериальные векторы при этом использовались для клонирования случайных фрагментов длинной молекулы ДНК. Затем фрагменты секвенировались параллельно, и чтения собирались с использованием их перекрытий для сборки большого генома в более короткие сроки [141]. Шотган (случайное разбиение) мета- (секвенирование всего) геномное (микробные геномы) секвенирование завершается секвенированием генома всех микроорганизмов, присутствующих в образце (Рисунок 1.6.). Иначе говоря, это можно сделать путём секвенирования ампликонов ПЦР гена 16S рРНК, область которого ограничена бактериями и археями [142]. «В 1981 году Сенгер использовал этот метод для сборки полного 48 502 п.н. генома фага λ» [143]. Этот классический метод секвенирования (Метод дробовика), основанный на методе Сенгера, был передовой технологией секвенирования геномов до 2005 года. Он все ещё используется во многих лабораториях сегодня. Однако, новые

технологии, такие как секвенирование коротких чтений и длинных чтений, со временем заменяют его. «Секвенирование нового поколения» или «Высокопроизводительное секвенирование» использует стратегию более коротких чтений (около 25–500 п.н.) с несколькими сотнями тысяч или миллионами чтений за относительно короткое время [144]. В результате оно имеет высокое покрытие, однако процесс сборки генома требует мощного оборудования и программного обеспечения. «Благодаря высокопроизводительным данным и относительно короткому времени секвенирования эта технология намного превосходит классическое секвенирование Сенгера для секвенирования полного генома» [145].

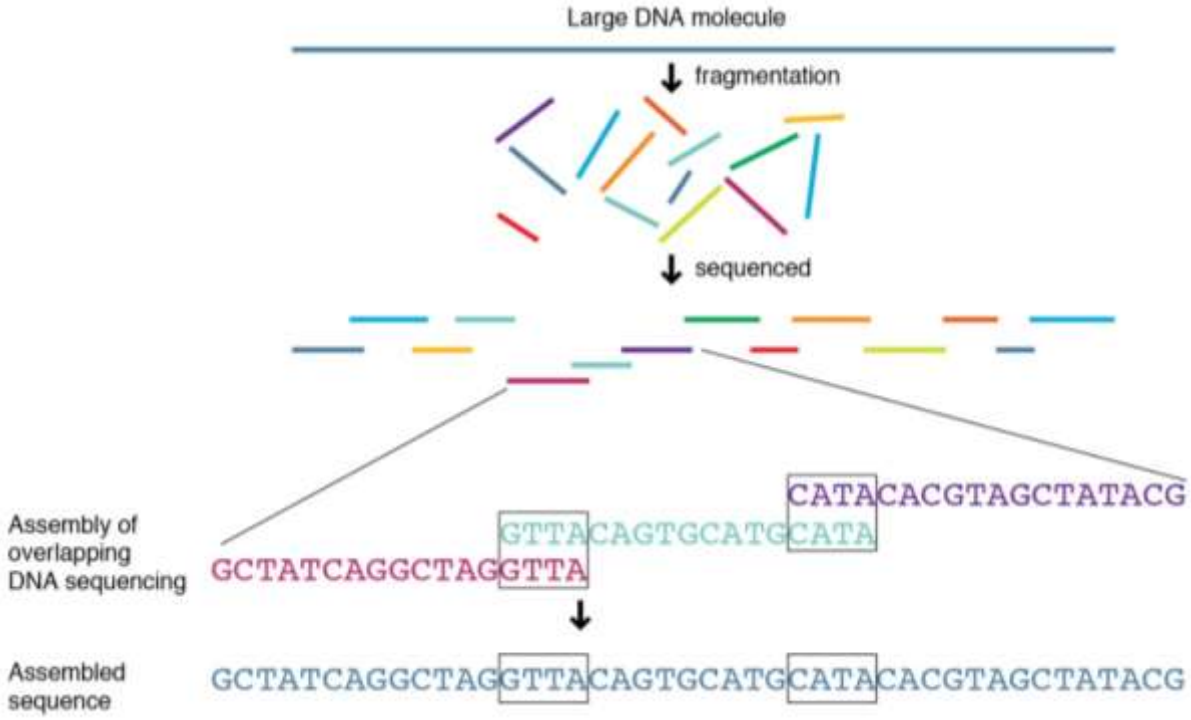


Рисунок 1.6. - Стратегия метода секвенирования методом дробовика [146]

Итак, какой метод лучше использовать для изучения микробиома кишечника: секвенирование 16S рРНК или метагеномное секвенирование методом дробовика? Многие исследователи задают этот вопрос при планировании своих исследований. Поскольку большинство учёных применяли эти методы в своих публикациях для определения микробов или метагеномных анализов, действительно, каждый метод имеет свои

преимущества и недостатки. «Сравнение этих двух методов показано в таблице 1.2. Данные, полученные от этих двух методов, требуют сложных биоинформатических методов и мощного оборудования для их анализа» [147].

Таблица 1.2. - Сравнение метагеномного секвенирования методом дробовика и секвенирования 16S рРНК[1]

Параметр	**16S рРНК**	**Метод дробовика - метагеномика**
Подготовка образцов	Сходная сложность	Сходная сложность
Покрытие бактериального состава	Высокое	Ограниченное
Междоменное покрытие	Нет	Да
Ложно-положительные результаты	Низкий риск	Высокий риск
Таксономическое покрытие	Бактерии и археи	Все таксоны, включая вирусы
Таксономическое разрешение	Род-вид	Вид-штамм
Интерференция с ДНК хозяина	Нет (но успех ПЦР зависит от отсутствия ингибиторов и наличия обнаруживаемой микробиоты)	Да, варьируется в зависимости от типа образца (может быть минимизировано за счет калибровки глубины секвенирования)
Минимальное количество ДНК	10 копий 16S	1 нг
Функциональный анализ	Нет (возможен “предсказанный” функциональный анализ)	Да (только информация о функциональном потенциале)

Это является вызовом для исследователей, заинтересованных в изучении разнообразия микробиоты. К счастью, благодаря сообществу с открытым исходным кодом, были разработаны несколько мощных биоинформатических

[1] https://www.genome.gov/genetics-glossary/Shotgun-Sequencing

инструментов. В основном в этом исследовании библиотеки микробиома секвенировались с использованием платформы Illumina MiSeq. Были использованы различные методы для проведения таксономической классификации последовательностей микробиоты, оценки бактериального разнообразия внутри и между образцами, а также влияния метаболических способностей, связанных с микробиотой. Обзор рабочего процесса метагеномного секвенирования методом дробовика показан на рисунке 1.7.

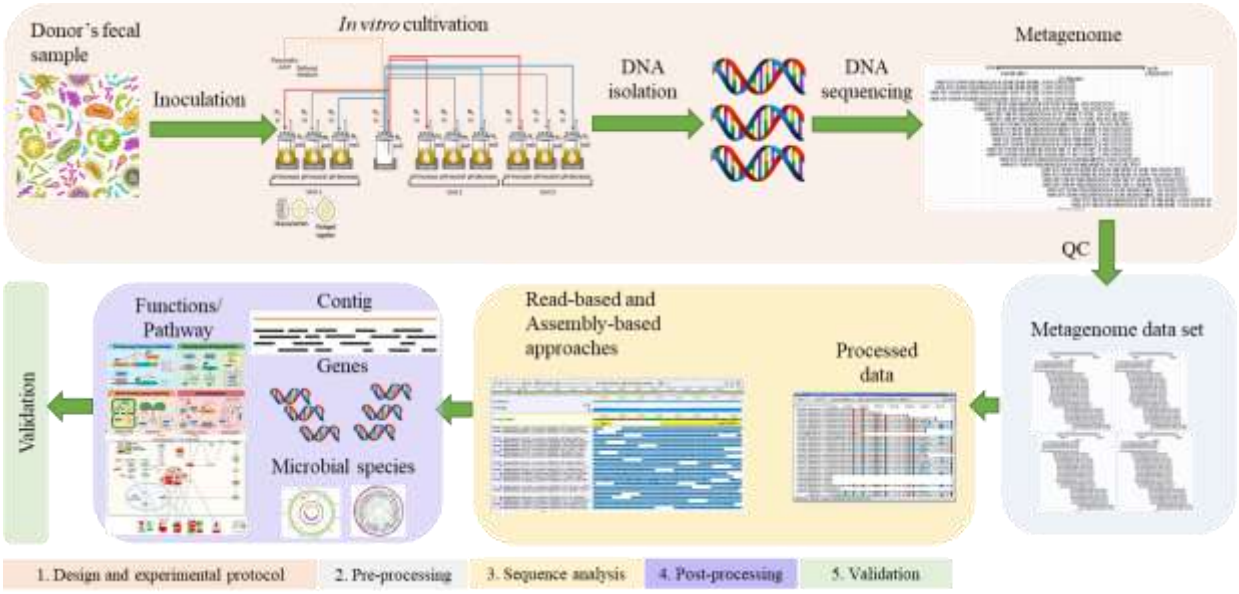


Рисунок 1.7. - Обзор рабочего процесса шотган-метагеномного секвенирования [146]

1.4.2. Модели ферментации *in vitro*

Весь желудочно-кишечный тракт колонизирован микроорганизмами и бактериальный состав варьируется в зависимости от анатомии и физиологических условий региона. «Например, желудок, из-за низкого pH, содержит до 10^3 КОЕ/г. Микробное сообщество желудка в основном состоит из лактобацилл, стрептококков и дрожжевых грибов» [148]. Двенадцатиперстная кишка содержит мало микробов из-за быстрого времени транзита, секреции жёлчных кислот и панкреатических ферментов. Однако, «количество и разнообразие видов микробиомного сообщества увеличивается в среднем и дистальном отделах тонкого кишечника (тощая и подвздошная кишки) примерно от 10^4 до 10^7; в дистальном отделе тонкого кишечника

(подвздошная кишка) микрофлора начинает напоминать таковую толстого кишечника – около 10^8 бактерий/мл кишечного содержимого» [149]. «Подвздошная кишка содержит более разнообразную микрофлору и более высокую популяцию бактерий, в основном факультативные грамм-отрицательные организмы и строгие анаэробы» [149]. «В толстом кишечнике содержится примерно 10^{11} $г^{-1}$ бактерий, преимущественно строгих анаэробов» [148].

Как упоминалось выше, проблема изучения *in vivo* влияния пищи, лекарств и химических веществ на микробиоту кишечника привела учёных к разработке различных моделей ферментации *in vitro* для изучения микробиоты кишечника. Мотивацией для моделей *in vitro* является культивирование и моделирование микробиома кишечника человека в контролируемых условиях и изучение его метаболизма, разнообразия и любых других изменений со временем. Для этой цели многие исследования используют донорские фекальные образцы, полученные от здоровых доноров. Однако основной проблемы этих моделей является отсутствие ответа хозяина. Так как сообщество изолированно, отсутствуют взаимодействия с эпителиальными и иммунными клетками хозяина. Ниже приведены «некоторые модели ферментации *in vitro*, которые бывают статическими (когда содержимое ферментёра не обновляется и не удаляется) или динамическими (в котором осуществляется постоянный приток свежего субстрата и отток продуктов метаболизма, благодаря чему точно поддерживается структура микробных сообществ и метаболические процессы)» [177].

Статические модели

Статические методы являются простыми и включают 2 или 3 стадии пищеварения: ротовая, желудочная и кишечная фазы. Продукты ферментации остаются внутри одного статического биореактора. «Статический метод может моделировать несколько параметров физиологического пищеварения» [150, 151]. Такие модели применяются для изучения отдельных этапов пищеварения, например процессов, протекающих в желудке или кишечнике.

Они не позволяют воспроизвести весь процесс пищеварения, однако дают возможность исследовать влияние состава пищи, химических соединений и лекарственных веществ на условия желудочно-кишечного тракта, а также оценивать влияние этих условий на исследуемые вещества [152].

«В литературе рассмотрены возможности применения методов *in vitro* в исследованиях, связанных с питанием, токсикологией, фармацевтикой и микробиологией» [153]. Применение моделей *in vitro* позволяет изучать отдельные процессы в контролируемых условиях и в таких экспериментах можно изменять параметры среды (например, pH, температура, субстрат и др.) и прослеживать их влияние на исследуемый объект. Это облегчает сравнение результатов между опытными группами и обеспечивает возможность повторного проведения исследований при одинаковых условиях. Поэтому *in vitro* модели, требуют меньших затрат времени и средств. Однако надо учитывать, что полученные *in vitro* данные не всегда можно непосредственно переносить на живой организм, поскольку лабораторные модели воспроизводят лишь отдельные стороны происходящих в нём процессов.

Таким образом, статические модели применяют для предварительного скрининга растворимости лекарственных веществ и оценки их потенциальной биодоступности. С их помощью можно, сравнить растворимость одного и того же лекарственного вещества в различных пищевых матрицах. Однако в статических моделях пищеварения непрерывное изменение pH, секреция пищеварительных соков, перистальтика и опорожнение желудка не воспроизводятся. Кроме того, у них имеется следующие ограничения: не позволяют оценивать всасывание лекарственных веществ через кишечный эпителий и кинетику их транспорта, в них отсутствуют клеточные и физиологические механизмы регуляции включая функции слизистого барьера, гормональный и нервный контроль. Поэтому при оценке полученных результатов необходимо учитывать, какие именно процессы воспроизводит выбранная модель и какие остаются за пределами исследования.

Динамические модели

Целью модели *in vitro* является воспроизведение условий различных отделах ЖКТ, в которых находится микробиота [154]. «Это предполагает: поддержание соответствующих значений pH и температуры (обычно 37 °C), поддержания уровня анаэробности характерного для толстого кишечника, поступлению питательных субстратов (углеводы, белки, жиры, пребиотики) в соответствии с заданным протоколом кормления» [17], мониторинг и контроль параметров таких как скорость транзита имитирующую перистальтику и время удерживания субстрата в каждом сегменте кишечника [155]. «В связи с этим использование динамических моделей кишечной микрофлоры, которые позволяют воссоздать ключевые физиологические параметры ЖКТ и динамику микробных сообществ в лабораторных условиях являются актуальными» [156].

Общие принципы *in vitro*-моделирования кишечной микрофлоры

Целью модели *in vitro* является воспроизведение различных условий отделах ЖКТ, в которых находится микробиота. «Для достижение этой цели необходимо поддержат соответствующих значений pH, температуры (37 °C), поддержания уровня анаэробности характерного для толстого кишечника, поступлению питательных субстратов (углеводы, белки, жиры, желчные кислоты и ферменты) в соответствии с заданным протоколом кормления» [17], мониторинг и контроль скорость транзита имитирующую перистальтику и время удерживания субстрата в каждом сегменте ЖКТ.

Многокамерные динамические модели (SHIME, TIM-2, SIMGI)

SHIME® (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), динамическая система, разработанная компанией “Prodigest” для имитации условий желудка, тонкого и толстого кишечника. «В нем входит несколько последовательно подключенные камеры, каждая из которых имитирует различные отделы ЖКТ (желудок, тонкий кишечник, проксимальный и дистальный отдел толстого кишечника)» [157].

SHIME обладает следующие преимущества: возможность моделировать пошаговое пищеварение и динамику микробиоты в каждом сегменте кишечника, изучать влияние субстратов на разные участки ЖКТ, анализировать метаболические продукты (КЦЖК, газы и т. д.). Но он в свою очередь имеет следующие ограничения: громоздкость, высокая стоимость оборудования, сложность валидации и воспроизводимости, необходимость специализированного обслуживания.

TIM-2 (TNO Intestinal Model 2), это динамическая модель, ориентированная преимущественно на толстый кишечник. «Позволяет имитировать условия проксимальных и дистальных отделов, обеспечивая анаэробную среду и контролируемый отток продуктов метаболизма» [158]. Преимущества его заключается в гибкости системы контроля за факторами внешней среды, возможностью непрерывной выборки образцов для анализа микробиоты и метаболитов. Ограничениями являются относительная сложность и высокая стоимость, необходимость точной настройки кормления и физико-химических параметров.

SIMGI (Simulator of the Gastrointestinal Microbial Ecosystem). «Это новая модель, разработанная с целью оптимизации работы в непрерывном режиме и поддержки более гибкого контроля за условиями ферментации» [159]. Имеет несколько функциональных секций, каждая из которых воспроизводит отдельный компартмент ЖКТ с учётом специфики микробиоты. «Динамические модели применяются в изучение влияния компонентов диеты и пребиотиков на популяцию бактерий и профиль метаболитов. Также, тестированию выживаемости пробиотиков и синбиотиков и их способность конкурировать с существующей микрофлорой и оказывать положительные эффекты. В нём можно изучить фармакокинетику и метаболизма лекарственных средств (влияние антибиотиков, противовоспалительных или цитостатических препаратов на кишечную микрофлору можно моделировать *in vitro*, снижая потребность в доклинических исследованиях *in vivo* на животных. Это особенно актуально для оценки риска дисбиоза или развития

резистентности» [160], «создание персонализированных стратегий питания и терапии так как нутригеномика и нутриомика требуют точных инструментов для оценки реакции кишечной микробиоты на персонализированных рационов.

В заключении «динамические модели позволяют тестировать различные сценарии (увеличение белка, снижение углеводов, включение специальных добавок) и наблюдать эффекты на уровне микробного сообщества» [161]. В отличие от исследований *in vivo*, динамические модели позволяют изучать влияние отдельных факторов при заранее заданных параметрах среды, а применение метагеномики, метатранскриптомики и метаболомики расширяет возможности исследования микробных сообществ в динамических системах. Сопоставляя эти данные можно установить, какие изменения микробного сообщества сопровождаются изменением его функциональной активности, что иметь значение для разработки персонализированных подходов к лечению заболеваний, связанных с нарушениями кишечной микробиоты.

1.4.2.1. Влияние микробиоты на метаболизм, биодоступность и трансформацию лекарственных средств.

«В состав кишечной микробиоты входят триллионы микроорганизмов, включая бактерии, археи, вирусы и грибы. Некоторые кишечные бактерии способны превращать лекарственные вещества в метаболиты с иной биологической активностью, влияют на их фармакокинетику и фармакодинамику. В зависимости от характера этих превращений терапевтическое действие препарата может усиливаться или ослабевать, или в некоторых случаях образуют токсины. Поэтому при разработке лекарственных форм, предназначенных для доставки действующих веществ в кишечник, необходимо учитывать возможное взаимодействие препарата с местной микробиотой» [162, 163].

Наиболее изученные механизмы взаимодействия кишечной микробиоты с лекарственными средствами является их ферментативная трансформация под действием таких ферментов, как гидролазы, редуктазы, β-глюкуронидазы,

сульфатазы и др. «В результате может изменяться химическая структура лекарственного вещества.

Некоторые бактериальные β-глюкуронидазы способны гидролизовать глюкуронидные конъюгаты лекарственных веществ, образующиеся в процессе их метаболизма в организме. Это приводит к повторному высвобождению активных соединений в просвете кишечника и сопровождается усилением токсических эффектов. Подобный механизм описан для ряда противоопухолевых препаратов, применение которых ассоциируется с развитием выраженных побочных реакций со стороны желудочно-кишечного тракта» [164]. Вместе с тем влияние кишечной микробиоты на действие лекарственных средств не всегда носит отрицательный характер. Для ряда препаратов микробные ферменты, напротив, играют важную роль в превращении неактивных предшественников в фармакологически активные соединения, что способствует реализации их терапевтического эффекта.

Кишечная микробиота может влиять не только на метаболизм лекарственных веществ, но и на их биодоступность. Микроорганизмы участвуют в поддержании барьерной функции кишечника, влияют на состояние эпителия и образуют короткоцепочечные жирные кислоты. Эти процессы могут изменять условия всасывания лекарственных веществ в желудочно-кишечном тракте.

«При нормальном состоянии кишечной микробиоты поддерживаются условия, необходимые для функционирования кишечного барьера и всасывания лекарственных веществ. При дисбиозе могут изменяться проницаемость эпителия, метаболическая активность микроорганизмов и свойства кишечной среды [165]. В зависимости от лекарственного вещества такие изменения способны как снижать, так и повышать его абсорбцию, что отражается на биодоступности и фармакокинетических характеристиках препарата» [166].

Поэтому «метаболизм лекарственных веществ под действием микробных ферментов не всегда приводит к желаемому результату, например,

некоторые антиаритмические и противоопухолевые препараты подвергаются микробной трансформации, которая в отдельных случаях сопровождается образованием токсичных метаболитов» [166]. «Такие превращения могут влиять на эффективность и безопасность лечения, а также вносить вклад в индивидуальные различия фармакокинетики лекарственных средств» [162].

«Кишечная микробиота расщепляют пептиды и другие соединения, чувствительные к действию бактериальных протеаз» [167]. «В результате их активность снижается, а для достижения необходимого терапевтического эффекта требуется изменение дозировки, что способно повысить риск побочных реакций» [168]. «Эти особенности необходимо учитывать при разработке систем доставки лекарственных средств в толстый кишечник, где действующее вещество непосредственно контактирует с многочисленными представителями кишечной микробиоты» [169].

В связи с этим пектин представляет интерес как материал для создания полимерных носителей лекарственных веществ и как компонент, способный модулировать кишечную микробиоту. В зависимости от структурных характеристик пектина его ферментация сопровождается изменениями состава микробных сообществ и образования короткоцепочечных жирных кислот. Одновременно взаимодействие пектина с кишечными микроорганизмами влияет на разрушение полимерной матрицы и высвобождение включённого в неё лекарственного вещества. Эти свойства необходимо учитывать при разработке пектиновых систем доставки, предназначенных для доставки ЛС в толстый кишечник.

1.4.2.2. Влияние микробиоты на эффективность и безопасность фармакотерапии.

«Исследования показали, что микробный состав ЖКТ прямо или косвенно влияет на эффективность лечения. Они определяют скорость всасывания, метаболизм, системное распределение ЛС и профиль его токсичности» [166]. Сложность заключается в том, что состав микробиоты индивидуален и меняется под влиянием возраста, диеты, болезни, приёма

антибиотиков. «Например, бактерия *Eggerthella lenta* превращает сердечный гликозид дигоксин в неактивные метаболиты, что снижает его эффективность» [170], а при повышенного содержания в кишечнике *E. lenta* происходит значимое снижение терапевтического ответа на дигоксин, что приводить к ухудшению контроля сердечных ритмов.

«По данным клинических наблюдений, состав микробиоты (высокая доля *Akkermansia muciniphila, Faecalibacterium prausnitzii*) ассоциирован с эффективным ответом на терапию ингибиторами PD-1/PD-L1 при лечении меланомы и рака лёгкого» [171]. Подобный эффект связывают с модуляцией иммунных путей и противовоспалительным действием некоторых из кишечных бактерий. Исследование показало, что терапевтический эффект метформина объясняется изменением микробного сообщества в сторону роста КЦЖК-продуцирующих бактерий (например, *Bifidobacterium*) при сахарном диабете 2-го типа. «Это улучшает барьерную функцию кишечника и повышает чувствительность к инсулину» [172]. Однако у пациентов с дисбиотическим составом микробиоты эффективность метформина ниже, что требует корректировки дозы или назначения дополнительных лекарственных препаратов (таблица 1.3).

Как видно из таблицы, «кишечная микробиота влияет на результаты фармакотерапии несколькими путями: участвует в регуляции экспрессии ферментов, связанных с метаболизмом лекарственных веществ; изменяет проницаемость кишечного эпителия и его барьерные свойства; регулирует иммунные реакции организма, что важно при применении противоопухолевых и иммуномодулирующих препаратов, действие которых связано с иммунным ответом. Метаболическая активность кишечной микробиоты зависит от взаимодействия между отдельными группами микроорганизмов, их конкуренция и совместная деятельность бактерий влияют на интенсивность биотрансформации лекарственных веществ, усиливают или ослабляют отдельные метаболические процессы» [162, 163, 168].

Таблица 1.3. - Примеры взаимодействий микробиоты и лекарственных средств

Лекарственное средство	Основной микроб	Влияние на фармакотерапию	Ссылка
Дигоксин	*Eggerthella lenta*	Инактивирует препарат, снижая эффект	[170]
Антиаритмические ЛС	*Bacteroides, Clostridium*	β-глюкуронидазы повышают токсичность	[162]
Метформин	КЦЖК-продуцирующие бактерии	Улучшают переносимость и эффективность	[172]
Ингибиторы PD-1/PD-L1	*Akkermansia muciniphila*	Улучшают иммунный ответ при онкотерапии	[171]
Антибиотик-пектиновая формула	Кишечная микробиота	Способствует восстановлению микробиоты и снижает токсичность антибиотиков	[173]

«Природные полисахариды способствуют восстановлению кишечной микробиоты и уменьшают нежелательные последствие антибиотикотерапии» [173]. Особое место среди них занимает пектин растительный полисахарид с пребиотическими свойствами, в частности его применение увеличивает относительную численность отдельных представителей типа *Bacteroidetes*, что имеет значение для поддержания микробного равновесия при нарушениях, связанных с приёмом антибиотиков [173].

1.4.2.3. Модуляция структуры и функции микробиоты кишечника двумя структурно различными пектинами

«Пектин является гетерополисахаридом, широко распространенный в клеточной стенке растений и срединной пластинке» [174, 175]. «Структура пектина изменчива и варьируется между растениями и фазами их развития, такими как созревание плодов» [175, 176]. «Пектин потребляется человеком в составе диеты, содержащей фрукты и овощи» [177]. «В желудочно-кишечном тракте человеческие ферменты не могут разрушать гликозидные связи

пектина» [6, 177]. «Таким образом, пектин попадает в толстую кишку и вступает в контакт с кишечной микробиотой» [6, 177, 178]. [178]. «Микробиота кишечника ферментирует пектин благодаря наличию у них ферментов, которые расщепляют молекулу пектина и используют его как источник углерода с последующим образованием КЦЖК» [178, 179]. «В толстом кишечнике микробиота защищает организм хозяина от колонизации патогенами через конкуренцию за питательные вещества и пространство, синтезирует витамины и продуцирует ряд метаболитов, таких как КЦЖК, способные модулировать иммунную систему»

«Пектин стимулирует рост полезных бактерий и улучшает микробную активность и положительного влияет на здоровье» [19, 180, 181]. «Применение пектина в качестве пребиотика связано с его способностью уменьшать воспаления, модуляцией иммунной системы, предотвращением ожирения и повышением барьерной функции клеток» [177, 181, 182, 183]. Однако из-за сложности микробиоты кишечника, включая многофакторные перекрёстные взаимодействия и перекрестное питание между таксонами, необходимо глубоко исследовать влияние пектина на здоровье человека через модуляцию кишечной микробиоты.

Предыдущие исследования показали пребиотические эффекты пектинов с различными СЭ и Mw. «Авторы показали, что пектины с меньшей Mw имеют более высокую скорость ферментации и повышают выработку КЦЖК [184], а снижение Mw в пектинах артишока и цитрусовых способствует росту *Bifidobacterium* и *Lactobacillus»* [185]. В другом исследовании установлено, что СЭ является важным параметром для модификации пектинов в кишечнике микробиотой. Пектин с высокой СЭ образует больше пропионата и КЦЖК по сравнению с пектином с низкой СЭ [18, 186].

«В настоящем исследовании была поставлена задача понять, как Mw и СЭ пектина влияют на его пребиотическую функцию в отношении микробиоты кишечника. Чтобы изолировать взаимодействие между пектином и микробиотой, использовался метод *in vitro*, исключающий сложные

взаимодействия между микробиотой кишечника и клетками млекопитающих, которые возникают в модели *in vivo»* [187]. «Изменения в структуре и функции микробиоты кишечника определялись с помощью секвенирования гена 16S рРНК и анализа КЦЖК» [187, 188]. Результаты этого исследования предоставили информацию о том, как пектины с различными химическими структурами модулируют микробиоту кишечника, что расширяет наше понимание о влияния Mw и СЭ и о применение пектина в качестве пребиотика.

1.4.2.4. Изменение профиля высвобождения лекарств в условиях, моделирующих отделы кишечника.

Несмотря на все преимущества новых разработанных биоразлагаемых систем с пролонгированным высвобождением, они должны быть протестированы в ходе *in vitro* экспериментов для получения дальнейшего понимания механизмов высвобождения лекарств и облегчения оптимизации устройств по состоянию матрицы (сухой или набухшей), чтобы состав лекарственной формы и характер высвобождения ЛС могли быть смоделированы. Моделирование высвобождения лекарств также может предоставить научные знания о механизмах массопереноса, участвующих в контролируемом высвобождении ЛС. «Были разработаны несколько математических моделей для прогнозирования высвобождения лекарств из биоразлагаемых полимерных систем доставки лекарств» [189, 190, 191].

«Основное расхождение при изучении высвобождения лекарств в условиях *in vitro* заключается в отсутствии реалистичных условий симуляции, в которых находятся СДЛ после введения *in vivo»* [192]. Например, после перорального введения СДЛ контактируют со слюной, ферменты ЖКТ, жёлчные кислоты и остатки пищи [192]. Деградация биополимерных систем, которые основаны на пектине/белке, зависит от соответствующих ферментов. Гидролиз белка зависит от протеаз, а гидролиз пектина от пектиназ [192]. Поэтому при *in vitro* исследованиях необходимо учитывать эти факторы.

«Модель корреляции *in vitro–in vivo* (IVIVC) применяется в исследованиях биоэквивалентности со стороны FDA и включен в Фармакопеи

США (USP)» [193, 194, 195, 196]. Модель IVIVC использует данные растворения и абсорбции ЛС из фармакокинетического исследования. «Методология IVIVC широко применяется при разработке лекарственных форм с контролируемым высвобождением и используется в качестве альтернативного подхода при оценке биоэквивалентности, что позволяет сократить объём исследований *in vivo*» [194].

В этой работе для установления взаимосвязи между результатами исследований *in vitro*, *ex vivo* и фармакокинетическим поведением пироксикама *in vivo* проводили корреляционный анализ с использованием подходов IVIVC и EVIVC. Особое значение имело сопоставление профилей высвобождения пироксикама в плазме крови, полученных в экспериментальных моделях после введения разработанной лекарственной формы.

1.5. Проблемы, перспективы и тенденции развития систем доставки лекарств

«При доставке ЛС в толстый кишечник одним из факторов, который влияет на его поведение в организме, является кишечная микробиота. В литературе описано её участие в метаболизме лекарственных соединений и изменении их биодоступности, что влияет на фармакокинетику и эффективность терапии» [167]. Однако степень такого влияния зависит от природы лекарственного вещества, состава микробного сообщества и условий его функционирования.

«Сложность изучения этих процессов заключается в том, что состав кишечной микробиоты существенно различается у отдельных людей и особенности микробного метаболизма различаются. Хотя существующие методы позволяют исследовать отдельные взаимодействия микроорганизмов с лекарственными веществами, но прогнозирование индивидуальной реакции организма по составу микробиоты пока остаётся сложной задачей» [165].

«Традиционные методы исследования не позволяют воспроизвести совокупность процессов, происходящих при взаимодействии лекарственного

вещества с микробиотой кишечника. Поэтому наряду с исследованиями *in vivo* применяют модели *in vitro* и *ex vivo*, с помощью которых изучают отдельные этапы высвобождения, транспорта и превращения лекарственных соединений» [49]. Так как ни одна лабораторная модель не воспроизводит всех физиологических условий кишечника, возникает необходимость сопоставлять с данными исследований на живом организме, чтобы сделать обоснованные заключение.

«Развитие омикс методов позволило изучить взаимодействия лекарственных веществ с кишечной микробиотой. Например, метагеномика позволяет характеризовать состав микробного сообщества и его генетический потенциал, тогда как метаболомные и протеомные исследования дают дополнительную информацию о функциональной активности микроорганизмов» [197]. «Совместное применение этих методов помогает установить связь между изменениями микробного сообщества и процессами метаболизма лекарственных веществ. Получаемые сведения о кишечной микробиоте рассматриваются в контексте персонализированной фармакотерапии с возможностью объединить данные о микробном сообществе с фармакогеномными характеристиками пациента» [198]. Однако для практического применения такого подхода необходимо установить, какие показатели микробиоты действительно позволяют прогнозировать фармакокинетические особенности и ответ на лечение.

Для полимерных систем доставки лекарственных средств особое значение имеет поведение матрицы в различных отделах желудочно-кишечного тракта, скорость набухания, проницаемость и устойчивость носителя в зависимости от pH среды, состава пищеварительных жидкостей и продолжительности воздействия. Если полимер биодеградируемый, то активность кишечных микроорганизмов имеет значение. Поэтому при выборе полимерной матрицы необходимо учитывать не только его способность удерживать лекарственное вещество, но и характер высвобождения в условиях, приближённых к кишечной среде.

В настоящей работе эти вопросы рассматриваются применительно к пектину и СДЛ на его основе. Пектин представляет интерес как полимерный компонент лекарственной формы и одновременно как субстрат, способный подвергаться ферментации кишечной микробиотой. Поэтому изучение его структурных характеристик, поведения в составе полимерной матрицы и взаимодействия с микробным сообществом позволяет рассмотреть различные стороны его применения в фармацевтической технологии.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Источники пектина и его гидролиз-экстракция

Пектин из сельскохозяйственных отходов извлекался методом паро-ассоциированной экстракции (SAFE) [199]. В результате был получен гидролизованный раствор, который концентрировался методом вакуумного выпаривания до половины начального объема. Затем пектин выделяли путем добавления этанола в соотношении 1:3. Осадок промывали трижды с использованием спирта и высушивали при 60 °C в печи с воздушной вентиляцией. Полученные таким образом образцы пектина далее именуются как “AP-VEAP” для яблочного пектина и “SP-VEAP” для подсолнечного пектина.

2.1.1. Проект пилотной установки для системы тангенциальной диультрафильтрации для очистки пектина

Система тангенциальной диультрафильтрации (TFDUF) была собрана (Рисунок 2.1) с использованием металлического каркаса, двух труб для ретенции и пермеата, изготовленных с использованием 24 соединительных муфт для труб, центробежного насоса (тангенциального потока), системы контроля давления, ультрафильтрационных модулей с полыми волокнами и двух емкостей объемом 100 и 550 литров. Как видно на схеме, представлена типичная мембранная фильтрационная установка с перекрестным потоком. Система фильтрации включает подачу, соединенную с насосом, обеспечивающим тангенциальный поток на мембрану из полых волокон. Пермеат затем собирается в приемный контейнер.

Система TFDUF позволяет использовать режим обратной промывки для регенерации мембраны посредством известного и простого метода подачи потока материала под высоким давлением через выход для пермеата в направлении, противоположном нормальному потоку пермеата. В зависимости от перепада трансмембранного давления после завершения

обратной промывки поток может автоматически возвращаться в нормальное направление.

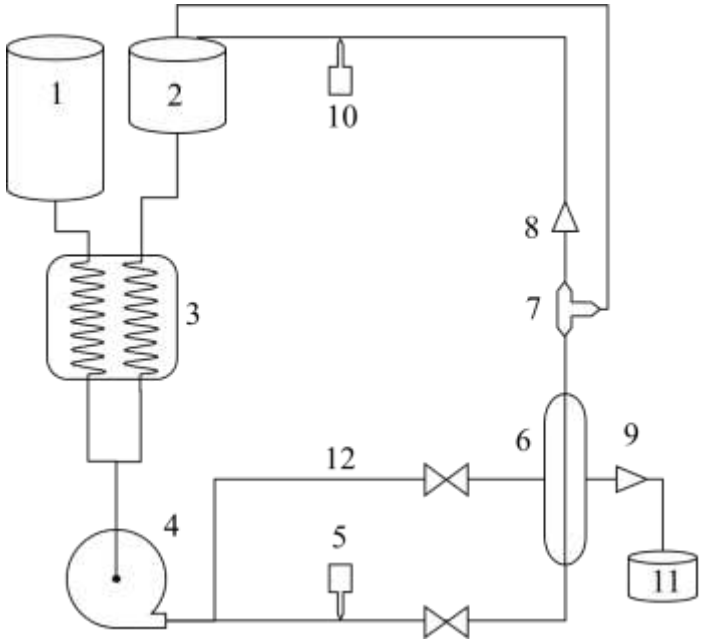


Рисунок 2.1. - Схема пилотной установки системы TFDUF: 1, 2 - резервуары для подачи объемом 550 и 100 литров, 3 - термостат, 4 - насос тангенциального потока, 5, 10 - манометры на входе и выходе, 6 - ультрафильтрационные мембраны с полыми волокнами, 7 - клапан регулировки давления и обводная линия, 8, 9 - расходомеры для ретентата и пермеата, 11 - приемная емкость для пермеата

С использованием процесса DUF было проведено несколько экспериментов с 26-28 литрами раствора гидролизата пектина. Применялись два ультрафильтрационных модуля с полыми волокнами, каждый с площадью фильтрации 2 м². Разница трансмембранного давления составляла 1,3-1,5 бар (20-22 psi), скорость жидкости – 1,2-2,6 м/с, а число Рейнольдса потока подачи было Re = 3000-6000. Для очистки и концентрирования раствора гидролизата использовались ультрафильтрационные мембранные модули: из полисульфона (PS-100, Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск, Беларусь) и полиамида (VPU-100, предприятие "Химволокно", Мытищи, Российская Федерация) с площадью фильтрации 2 м².

Процесс проводился при комнатной температуре (25-27 °C) и входном давлении 0,8-1,2 бар. Детали пилотного процесса очистки DUF описаны в

патенте [200]. Новизна метода заключается в использовании описанного выше процесса, который включает удаление агрегированных частиц (микрогеля – MG) путем центрифугирования, контроль температуры и разбавления, а также использование мембраны с MWCO 100 кДа впервые в процессе DUF-UF для очистки пектина.

После завершения процесса DUF 0,2 литра раствора отбиралось, и пектин выделялся с использованием распылительной сушилки. Полученные образцы пектина из традиционного и DUF процессов были проанализированы на содержание галактуроновой кислоты, СЭ, состав нейтральных сахаров (NS), содержание белка и средние молекулярные массы (Mw, Mn, Mz). Полученные очищенные пектины DUF впоследствии называются “AP-DUF” для яблочного пектина и “SP-DUF” для подсолнечного пектина.

2.1.2. Определение содержания ангидрогалактуроновой кислоты и степени метилэтерификации групп галактуроновой кислоты в пектине

«Образцы высушенного пектина, полученные в обоих процессах, были проанализированы на содержание AGA и СЭ. Содержание AGA определялось с использованием колориметрического метода сульфамата-3-фенилфенола с помощью УФ/Вид-спектрофотометра (Thermo Spectronic, Великобритания) при длине волны 520 нм» [201]. «Степень этерификации пектина анализировалась по методу, предложенному CP Kelco» [202]. Балластные вещества определялись как сумма извлеченных соединений (МГ, ПП, ПОС) за вычетом количества остатков клеточной стенки.

2.1.3. Анализ состава моносахаридов пектина

Сухие образцы пектина, полученные каждым методом очистки, использовались для определения состава моносахаридов. В пробирку из тёмного стекла, содержащую 10 мг пектина, добавляли 2 мл 2М трифторуксусной кислоты и гидролиз провели при 110 °C в течение 3 часов. Раствор выпаривалась до сухого состояния. Затем в пробирку добавляли 1,5 мл метанола, после чего снова выпаривали до сухого состояния, повторив процесс

3 раза для удаления остаточной трифторуксусной кислоты. В гидролизат добавляли 10 мг/мл гидроксиламина гидрохлорида в пиридине и нагревали 90 °C в течение 30 минут. После охлаждения в гидролизат добавляли 1,0 мл ангидрида уксусной кислоты для повторной реакции, нагревая при 90 °C в течение 30 минут. Гидролизаты непосредственно анализировали с помощью газовой хроматографии (GC-2010 Plus, Shimadzu). Стандартные моносахариды подвергались прямой дериватизации. Хроматографическая колонка: DB-5 кварцевая капиллярная колонка (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм), скорость потока газа носителья 1,0 мл/мин, детектор – ПИД, воздух:водород 300:30, температура испарителя 280 °C; температура детектора 260 °C; градиент температуры I 150-190 °C, скорость повышения температуры 7 °C/мин; градиент температуры II 190-250 °C, скорость повышения температуры: 15 °C/мин; объем вводимого образца 1 μл.

2.1.4. Исследования структуры биополимеров методом ядерно-магнитного резонанса

Спектры в растворе с использованием ЯМР регистрировались на спектрометре Agilent DD2 ЯМР с магнитным полем 14 Тесла (Санта-Клара, Калифорния) с использованием зонд-пробы OneNMR диаметром 5 мм и градиентами импульсного магнитного поля по оси z. Все спектры были получены при температуре 46 °C в D_2O с добавлением натриевой соли 3-(триметилсилил)-пропионовой кислоты (TSP) для внутренней калибровки химических сдвигов для ^{1}H и ^{13}C.

Спектры ^{1}H (протонные) при частоте 600 МГц регистрировались с шириной спектра 12 ppm, углом импульса 45° и временем релаксации 4 секунды. Спектры ^{13}C при частоте 150 МГц имели ширину спектра 250 ppm, угол импульса 45° и время релаксации 1 секунда, с использованием 50 000 транзиентов.

Был проведен эксперимент HSQC с градиентным усилением, чувствительным к мультиплетности, с использованием адиабатических импульсов. Ширина спектра составляла 12 ppm в измерении ^{1}H и 200 ppm в

измерении ^{13}C. Эксперимент выполнялся с использованием 4092 точек в измерении прямого детектирования, 400 инкрементов во втором измерении, 64 транзиентов на каждый цикл накопления и временем релаксации 2 секунды между сканами.

2.1.5. Определение молекулярной массы методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии

Анализ образцов проводился с использованием системы Waters Высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ) (Waters Inc., Milford, MA, USA), включающей 6-канальный вакуумный дегазатор, дифференциальный вискозиметр ViscoStar (Wyatt Technology, USA), дифференциальный рефрактометр Waters 2410 (RI) и две последовательно соединённые колонки эксклюзионной хроматографии PL-Aquagel (OH-60 и OH-40) и автосамплер (717 Plus Autoinjector, Waters).

Сухие образцы (2 мг/мл) растворяли в подвижной фазе (0,05 M $NaNO_3$), центрифугировали при 20 000 g в течение 30 минут и фильтровали через фильтр Millex HV с размером пор 0,22 мкм (Millipore Corp., Bedford, MA). Скорость потока составляла 0,8 мл/мин, а объём ввода образца – 100 мкл. Каждый образец анализировался в трех повторностях.

Элюаты колонок регистрировались последовательно вискозиметром ViscoStar и RI-детектором. Электронные сигналы с детекторов передавались на два отдельных порта компьютера, что позволило одновременно собирать и обрабатывать данные с использованием программ ASTRA 5.3.4.13 (Wyatt Technology) и Breez (Waters).

Калибровка колонок проводилась с использованием стандартизированных образцов пуллулана (Showa Denko K.K., Япония) с молекулярными массами Mw: 788KD; 667KD; 404KD; 112KD; 47.3KD и 22.8KD. Значения Mw и Mz рассчитывались методом универсальной калибровки [203]. Используемый инкремент показателя преломления (dn/dc) составлял 0,134 мл/г в растворе 0,05 M $NaNO_3$ [204].

2.1.6. Определение молекулярной массы и гидродинамических свойств методом многоуглового лазерного светорассеяния

Растворы образцов (2–5,0 мг/мл) готовили при перемешивании при комнатной температуре (20 °C) в течение ночи. Перед анализом каждый раствор фильтровали через шприцевой фильтр Millex HV с размером пор 0,45 мкм (PVDF, Millipore Corp., Billerica, MA).

Характеризация проводилась с использованием ВЭЭХ (1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Набор колонок нагревался в водяной бане до 35 °C и соединялся последовательно с УФ-спектрофотометром UV-1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA), фотометром DAWN HELEOS II для многоуглового лазерного светорассеяния (Wyatt Technology, Santa Barbara, CA) с возможностью измерения квазиупругого светорассеяния (QELS) при угле 120°, дифференциальным вискозиметром Model 255-V2 (Wyatt) и детектором рефракционного индекса Optilab rEX-495 (Wyatt).

«Сигналы от всех четырёх детекторов анализировались с помощью программного обеспечения ASTRA версии 7.1.2.5 (Wyatt). Все образцы анализировались при длине волны 280 нм. Используемый показатель рефракционного прироста (dn/dc) составлял 0,132 мл/г» [205].

2.2. Выделение зеина из кукурузы

2.2.1. Методики эксперимента обезжиривания семян кукурузы

Для исследований использовали семена кукурузы, выращенной в Таджикистане. Семена тонко измельчали на мельнице, просеивали через сито и обезжиривали. Для обезжиривания использовали серный эфир. Муку заливали эфиром при температуре 0–4 °C и оставляли на 3–4 ч. Экстракт, содержащий масло, сливали, осадок вновь заливали эфиром. Процедуру повторяли дважды. Обезжиренную муку сушили до постоянного веса на воздухе и использовали для дальнейших исследований.

2.2.2. Определение общего белка в обезжиренной муке кукурузы

Обезжиренную муку кукурузы заливали смесью этанола и 4% раствора щелочи в соотношении 1:1 в колбе с притёртой пробкой, во избежание испарения этанола. Смесь хорошо взбалтывали и оставляли на ночь при комнатной температуре. Затем центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 мин. В супернатанте белок определяли биуретовым методом. Для этого отбирали пробы по 1 мл раствора белка, добавляли 4 мл биуретового реактива и смесь оставляли на 30 мин. Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Содержание белка определяли по величине экстинкции с помощью калибровочного графика, для построения которого использовали сывороточный альбумин.

2.2.3. Выделение зеина из обезжиренной муки кукурузы.

Навеску муки заливали 5-кратным объёмом 75% водно-спиртового раствора и белок экстрагировали на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 2 ч. Экстракт центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость сливали, а осадок вновь ставили на экстракцию белка. Третью экстракцию проводили при 60 °С в течение 2 ч 3-кратным объёмом этанола. Полученные экстракты охлаждали, белок высаживали 0.1 М раствором хлорида натрия в холодильнике в течение ночи. Затем центрифугировали при 4000 об/мин 5 мин, осадок дважды промывали от ионов хлора и сушили в эксикаторе над КОН.

2.2.4. Выделение и характеристика зеина кукурузы методом Т. Б. Осборна.

Из муки кукурузы последовательной экстракцией извлекали вначале легкорастворимые белки – альбумины и глобулины (водой и 0.1 М NaCl), затем 75% этанолом – зеины и 0.05 н раствором щёлочи – глютелины. Электрофорез зеина, выделенного из муки кукурузы этанолом, проводили в вертикальном 7.5% ПААГ, содержащем 5% уксусную кислоту и 6 М мочевину (pH 3.1) в 0.026 М уксусной кислоте при напряжении 200 V в течение 1 ч и 580 V в течение 4.5 ч. Образцы белка растворяли в буфере, содержащем 6 М мочевину

и 6% акриламид. Гель после завершения электрофореза окрашивали в коллоидном растворе Кумасси G-250, затем отмывали водой для обесцвечивания фона и высушивали между слоями целлофана.

2.2.5. Статистический и биоинформатический анализ

В настоящей работе статистическая обработка и биоинформатический анализ микробиологических данных выполнялись по единым принципам, объединяющим подходы, описанные в нескольких статьях, включённых в диссертацию.

Для оценки α-разнообразия (богатство видов и индекс Шеннона) и для сравнения относительных таксономических обилий между различными значениями pH в разных фазах биореактора использовались линейные модели смешанных эффектов, где pH рассматривался как фиксированный фактор, а идентификатор биореактора – как случайный. Отдельные модели строились для просветной и слизистой фракций каждой фазы. Относительные обилия таксонов предварительно логит-преобразовали и тестировали в рамках тех же смешанных моделей. Глобальные различия в структуре сообществ между группами pH оценивались с помощью PERMANOVA на основе взвешенных и невзвешенных расстояний UniFrac. Для КЦЖК применяли однофакторный дисперсионный анализ, а в качестве апостериорного теста – t-критерий Стьюдента. При множественных сравнениях *p*-значения корректировали по методу Бенджамини–Хохберга.

Сырые пары чтений секвенирования 16S рРНК обрабатывали в пакете QIIME2: денойсинг и идентификацию ASV выполняли с помощью DADA2, таксономическую классификацию – на основе базы Greengenes с использованием наивного байесовского классификатора scikit-bio. Для построения филогенетического дерева применяли MAFFT, а FastTree использовали для получения корневого дерева, послужившего основой для расчёта показателей разнообразия и UniFrac-дистанций. Функциональный потенциал сообществ предсказывали в PICRUSt2.

Выходные файлы QIIME анализировали в среде R (v 4.1.3) с использованием разработанной библиотеки QIIMER; визуализацию глобальных различий выполняли методом координат главных осей. PERMANOVA применяли для проверки групповых различий на основе любых метрик расстояний (UniFrac, Брэй-Кёртис, индекс Жаккара). Дифференциальный анализ предсказанных ферментных активностей (EC-номера) проводили в MaAsLin2. Графики строили с пакетами tidyverse и ggplot2. Для сравнения концентраций отдельных КЦЖК между условиями и донорами проводили однофакторный ANOVA с последующим тестом Тьюки (HSD); различия считались значимыми при $p \leq 0{,}05$ с коррекцией Бенджамини–Хохберга.

В анализе шотган-метагеномики чтения обрезали программой sickle, таксономический профиль определяли MetaPhlAn3. Для каждой реплики наборы чтений ко-собирали в Megahit; бины выделяли Metabat2, их полноту и чистоту оценивали CheckM, таксономию – GTDB-tk. Поиск гомологов генов fldABC выполняли BLASTP. Визуализации и дополнительную статистику проводили в R с пакетами vegan, microViz, pheatmap, RColorBrewer и factoextra; поправку на множественное тестирование осуществляли по методу Бенджамини–Хохберга, а парные сравнения – тестом Tukey HSD.

Таким образом, объединённая методология включает стандартизированный конвейер обработки секвенционных данных (QIIME2/DADA2 → MAFFT → FastTree → UniFrac/PICRUSt2), комплексную статистическую проверку различий (линейные смешанные модели, PERMANOVA, ANOVA с апостериорными тестами) и коррекцию ложных открытий, что обеспечивает сопоставимость и достоверность результатов, представленных в диссертационной работе.

2.3. Технология получения гидрогелевых микросфер на основе пектина и зеина

В данной работе использовались пектины, выделенные из природных источников. Зеин, использованный в эксперименте, выделяли из

обезжиренной муки кукурузы. В качестве модельного лекарственного вещества применялся нестероидный противовоспалительный препарат пироксикам.

Формирование микросфер на основе пектина и зеина проводилось при добавлении раствора пектина объемом 12 мл к 75%-ному спиртовому раствору зеина объемом 15 мл. Этот раствор содержал пироксикам и хлорид кальция ($CaCl_2$) в концентрации, рассчитанной из пропорции 30 мг кальция на 1 г пектина. Процесс проводили при комнатной температуре с постоянным перемешиванием.

В экспериментах варьировались количественные соотношения компонентов. Содержание зеина изменялось от 50 до 1000 мг, пектина – от 200 до 350 мг, пироксикама – от 20 до 50 мг. В отдельных экспериментах, например при соотношении З/П = 1,4:1, пироксикам брали в значительном избытке, до 200 мг. Такой подход позволял моделировать различные условия для оптимизации структуры и свойств микросфер. После формирования микросфер проводилась их промывка для удаления несвязанных компонентов. Для этого использовали многократное промывание водой и 50%-ным раствором этанола. Контроль концентрации несвязанных веществ осуществляли спектрофотометрически при длине волны 334 нм. Это позволяло убедиться в высокой степени очистки и однородности образцов.

Таким образом, исследование охватывало целый комплекс операций, начиная от выбора сырья и его подготовки до получения и анализа микросфер. Применение разнообразных методов и условий позволило получить качественные данные о влиянии различных факторов на свойства микросфер, таких как их размер, степень инкапсуляции активного вещества и стабильность. После завершения процесса промывки образцы высушивали при температуре 25–30 °C до достижения постоянной массы. Такой метод позволял минимизировать содержание примесей и обеспечить получение стабильного продукта.

Для определения содержания пироксикама в микросферах, 15 мг сухого материала помещали в пробирку и добавляли 10 мл 75% этанола. Этанольный раствор содержал 0,4% NaOH по массе и 0,5% твина-20 по массе. Смесь термостатировали при температуре 37 °C в течение ночи для полного экстрагирования пироксикама из микросфер.

После экстракции раствор подвергали центрифугированию, чтобы отделить супернатант. Общее содержание пироксикама в супернатанте определяли спектрофотометрическим методом. Для этого использовали калибровочный график, построенный на основе растворов чистого пироксикама. Измерения проводились на спектрофотометре UV-1 Thermo Spectronic (Великобритания) при длине волны 355 нм. Этот метод обеспечивал точное количественное определение активного вещества в образцах.

2.4. Сравнительный анализ микробиоты кишечника, культивируемой *in vitro* с использованием однокамерного модуля по сравнению с трёхкамерным экспериментальным дизайном толстого кишечника

«Гомогенат фекалии от доноров, был приобретен у Openbiome® (Сомервиль, Массачусетс, США)» [206]. «Доноры были случайным образом выбраны из группы кандидатов, которые соответствовали следующим условиям: отсутствие антибиотиков в течение как минимум 1 года, нормальный индекс массы тела (ИМТ) и употребление типичной западной диеты (не веганской или вегетарианской)» [187]. Гомогенат кала от донора использовался в качестве инокулята как для экспериментов с однокамерным модулем (SC), так и для экспериментов с однокамерным модулем, имитирующим толстого кишечника (3C). Состав инокулята приведено на рисунке 2.2.

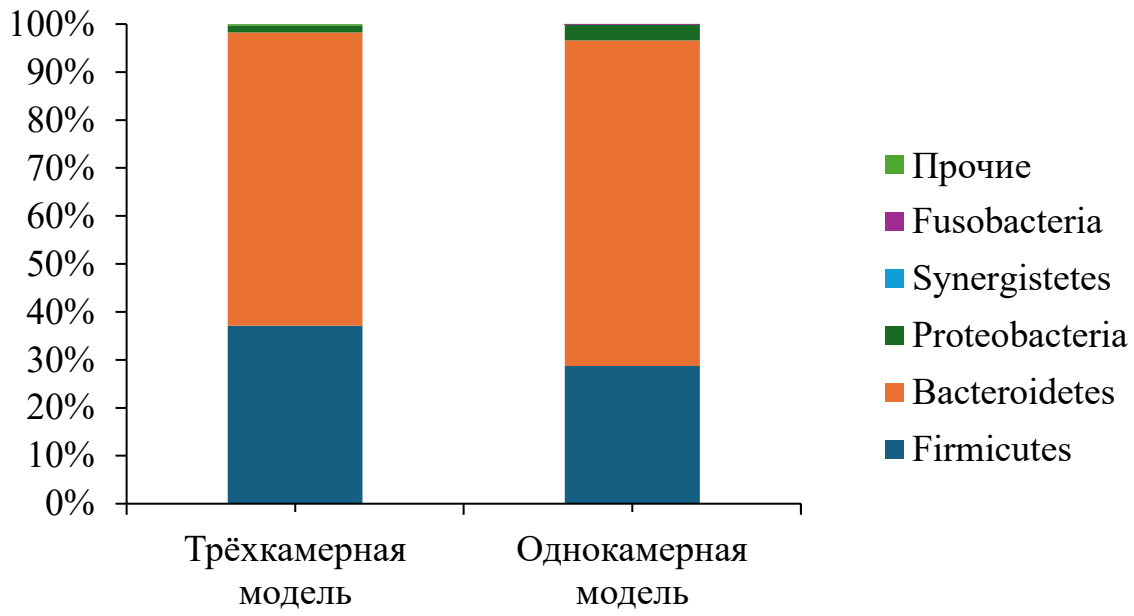


Рисунок 2.2. - Относительная численность инокулятов на уровне типа

Для эксперимента SC был использован аппарат TWINSHIME® (ProDigest, Гент, Бельгия) со следующими модификациями: один биореактор использовался для имитации пищеварения в желудке и тонкой кишке; два биореактора использовались для культивирования микробиоты кишечника, каждый из которых представлял одну толстую кишку. Каждое сосуд имело независимую линию подачи, удаления отходов и промывки азотом для поддержания автономности. «Два блока SC служили дубликатами. Каждый биореактор SC заполнялся до объема 500 мл, включая слизистые носители, чтобы развить как просветные, так и слизистые сообщества, как описано ранее» [187]. «В этом эксперименте один сосуд использовался для имитации желудка/тонкой кишки (ST/Si), который питался 3 раза в день (каждые 8 часов) 140 мл определенной среды (ProDigest, Гент, Бельгия) и 60 мл панкреатического сока, содержащего панкреатин и желчные кислоты, как описано ранее» [207]. «После 90-минутной инкубации 100 мл жидкости ST/Si перемещались перистальтическими насосами в каждый SC (Рисунок 2.3), в то время как избыточная жидкость одновременно удалялась в отходы» [187, 207]. «На протяжении всего эксперимента постоянно поддерживались следующие условия: анаэробиоз с использованием непрерывного потока азота (0,5–1 л/мин), 37 °C с использованием водяной рубашки, pH = 7,0 ± 0,1 с

использованием 0,5 M NaOH и 0,5 M HCl. Все времена удержания рассчитывались по следующему уравнению: $Rt = 24(500/300) = 40$ час. Эксперимент с трехступенчатой моделью толстой кишки (3C) использовал аппарат TWINSHIME® в соответствии со стандартными методами эксплуатации, описанными ранее» (Рисунок 2.4) [187, 207].

«Как и в эксперименте с SC модели, в 3C тоже два блока работали параллельно. Каждый блок состоял из биореакторов, представляющий желудок (ST), тонкую кишку (Si), восходящий (AC) отдел толстой кишки, поперечный (TC) отдел толстой кишки и нисходящий (DC) отдел толстой кишки. Биореакторы толстой кишки содержали слизистые носители, как описано ранее» [187, 207].

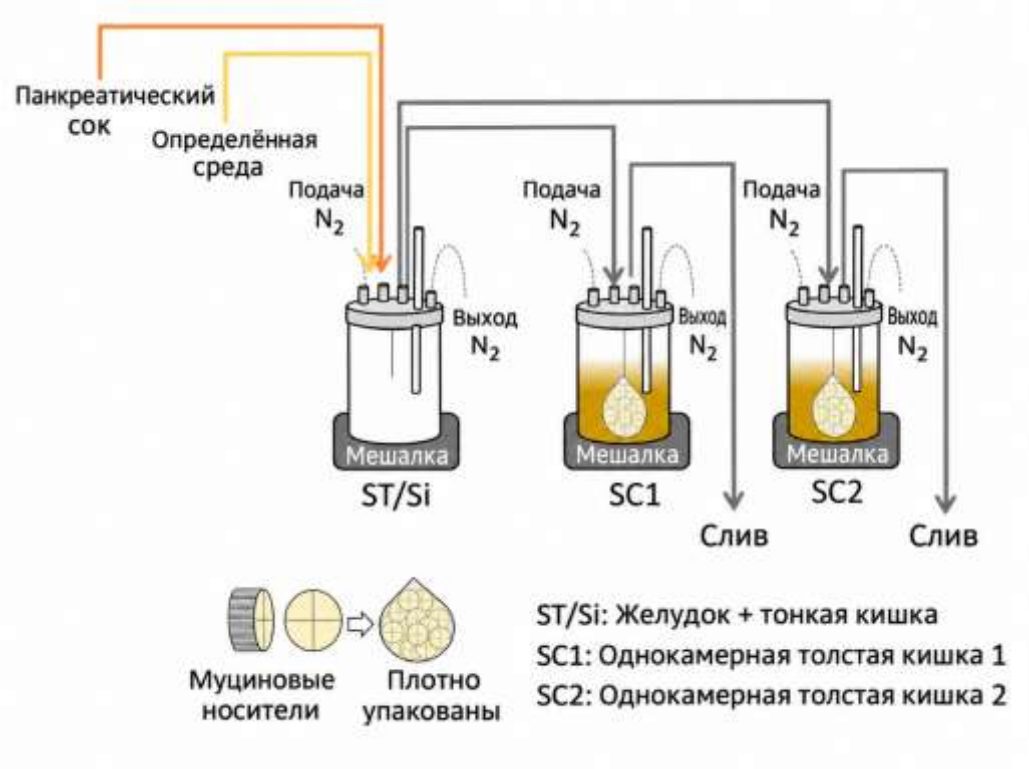


Рисунок 2.3. - Схема эксперимента с использованием одного сосуда для культивирования микробиоты кишечника

В каждый блок было добавлено 140 мл определённой питательной среды и 60 мл панкреатического сока три раза в день в отделы ST и Si. После 90-минутной инкубации 200 мл содержимого переносили последовательно: из ST/Si → в AC, из AC → в TC, из TC → в DC, а затем из DC → в отходы [187, 208].На протяжении всего эксперимента строго поддерживались следующие

условия: анаэробиоз путём подачи азота в течение 10 минут, 3 раза в день; температура 37 °C с использованием водяной рубашки; поддержание pH растворами 0,5 M NaOH и 0,5 M HCl (диапазоны pH: AC – 5,6–5,9; TC – 6,15–6,4; DC – 6,6–6,9).

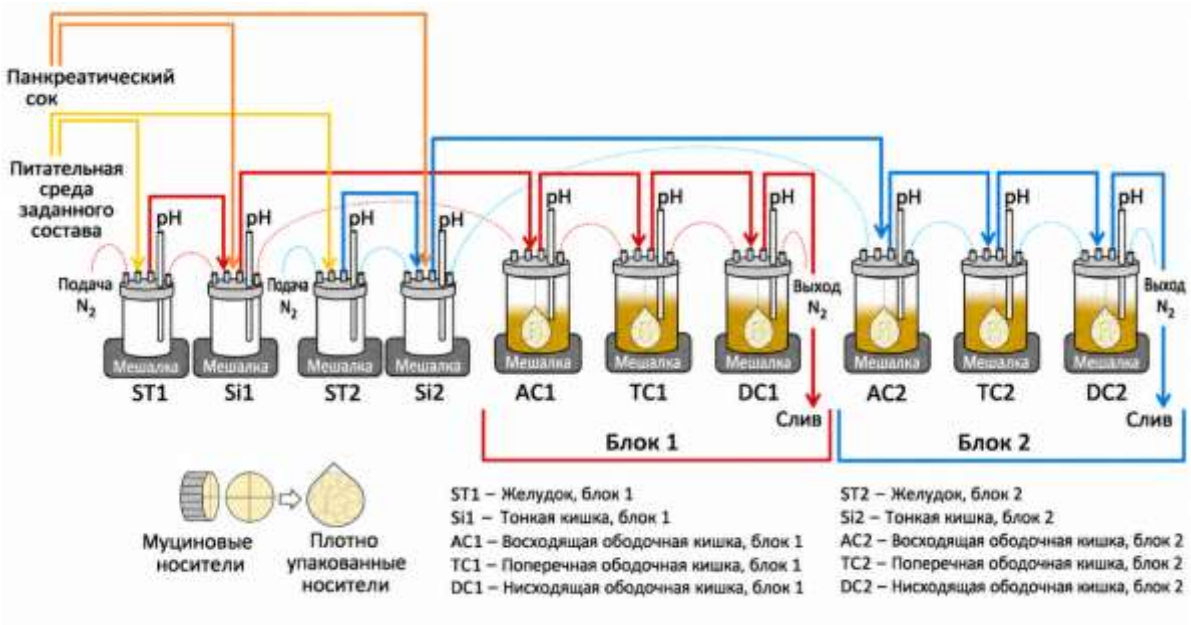


Рисунок 2.4. - Схематическое представление эксперимента с использованием TWINSHIME® для культивирования микробиоты кишечника

Для расчёта времени транзита содержимого из AC→TC→DC использовались следующие уравнения: $AC_{Rt} = 24(500/600) = 20$ час, $TC_{Rt} = 24(800/600) = 32$ час, $DC_{Rt} = 24(600/600) = 24$ час. Общее время транзита через всю систему вычислялось как:

$$Rt_t = [24(500/600)] + [24(800/600)] + [24(600/600)] = 72 \text{ час}$$

Во всех экспериментах, после инокуляции, сообщества поддерживали ежедневными циклами питания в течение 2 недель, чтобы достичь стабилизации, согласно ранее опубликованным рекомендациям [187, 207]. После стабилизации пробы отбирали на 22-й, 25-й и 27-й день для эксперимента с SC, и на 23-й, 25-й и 27-й день – для 3C; они служили в трёх повторностях (triplicates). Каждая проба рассматривалась отдельно, что давало N = 6 в каждом эксперименте. Отбор проб содержимого просветных образцов

осуществлялось следующим образом: 1 мл – для выделения ДНК и 5 мл – для анализа короткоцепочечных жирных кислот (SCFA).

Все просветные образцы центрифугировали при 5000 g в течение 10 минут при 4 °C. Для ДНК супернатант удаляли, бактериальный осадок замораживали при −80 °C. Для SCFA супернатант фильтровали через мембрану PES 0,2 мкм (Corning, NY, USA) и также замораживали при −80 °C. При каждом отборе половину слизистых носителей в биореакторе заменяли на свежие. Пробы слизи (0,25–0,5 г) из каждого биореактора отбирали и хранили при −80 °C для последующего выделения ДНК. Экстракцию ДНК проводили с помощью набора DNeasy PowerSoil (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

2.4.1. Обнаружение общих бактерий и *Bifidobacterium* с использованием qPCR

Уровни *Bifidobacterium* количественно определялись, как описано ранее, с использованием qPCR и следующих праймеров: прямой Bif243F 5′-TCGCGTCYGGTGTGAAAG-3′ и обратный Bif243R 5′-CCACATCCAGCRTCCAC-3′ [209]. Праймеры и стандартная кривая были заказаны в IDT.

2.4.2. Анализ короткоцепочечных жирных кислот

«Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) количественно определялись в свободной кислотной форме с использованием газового хроматографа/масс-спектрометра (GC/MS) Shimadzu QP2010 Ultra (Shimadzu, Columbia, MD, USA) с колонкой Stabilwax-DA 30 м x 0,25 мм x 0,25 мкм (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA)» [188, 210]. Все реагенты были заказаны у Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Каждая проба подготавливалась и обрабатывалась трижды. Целевые КЦЖК включали уксусную кислоту, пропановую кислоту, масляную кислоту, пентановую кислоту, гексановую кислоту, 2-метилмасляную кислоту, 3-метилмасляную кислоту и 2-метилпропионовую кислоту. Для анализа количественно определенные количества 2-метилмасляной кислоты, 3-метилмасляной кислоты и 2-

метилпропионовой кислоты объединялись и представлялись как общие разветвленные короткоцепочечные жирные кислоты (РКЦЖК).

Для начала 250 мкл каждой размороженной пробы добавляли в 2-мл центрифужную пробирку, содержащую 12,5 мкл внутреннего стандарта (1600 мг/л), 62,5 мкл 49% серной кислоты, 50 мг хлорида натрия и 1 мл диэтилового эфира. HulaMixer (Life Technologies, Waltham, MA) использовали для встряхивания пробирок в течение 3 минут. Затем пробирки центрифугировали при 664×g в течение 3 минут, и слой органического растворителя удаляли и переносили в виалу для GC. Виала загружалась в автосамплер GC, и КЦЖК количественно определялись с использованием газового хроматографа/масс-спектрометра (GC-MS). Объем вводимой пробы составлял 1 мкл в режиме сплит 1:20 при 260 °C, температура интерфейса и ионного источника 250 °C и 220 °C соответственно. Термостатирование были следующими: начальная температура 125 °C применялась и удерживалась в течение 1 минуты. Затем она повышалась до 170 °C со скоростью 30 °C/мин, затем дальше до 181,5 °C со скоростью 20 °C/мин, которая удерживалась в течение 0,5 минуты. Затем температура повышалась до 220 °C со скоростью 50 °C/мин и удерживалась в течение 2 минут. Для получения данных использовался режим полного сканирования с диапазоном масс от m/z 25 до 375, и газ-носитель был гелий со скоростью потока 1 мл/мин.

2.4.3. Общий метод извлечение ДНК и с использованием технологий на основе кремнезёма (набор DNeasy PowerSoil)

«Общие методы выделения ДНК включают органическую экстракцию, технологии на основе кремнезёма, магнитное разделение, анионообменные методы и другие подходы. Независимо от типа образца, любой метод выделения должен обеспечивать: (1) эффективный лизис и получение ДНК, (2) достаточный выход материала для дальнейших анализов, (3) удаление ингибиторов и загрязнений, (4) высокое качество и чистоту выделенной ДНК» [211]. При выборе набора для выделения ДНК учитывают такие факторы, как источник и тип образца, способ подготовки, предполагаемое применение (16S,

метагеномика, ПЦР), наличие гуминовых веществ, объём исходного материала, выход ДНК и удобство процедуры.

«Для выделения микробной геномной ДНК из образцов использовали набор Qiagen DNeasy PowerSoil (Qiagen, Hilden, Germany). Он имеет быстрый и простой протокол, позволяющий изолировать высококачественную ДНК из образцов за короткое время. Извлечение ДНК выполняли с использованием набора, следуя протоколу производителя» [212].

2.4.4. Амплификация гена 16S рРНК и секвенирование ампликонов

Общую ДНК извлекали из 1 мл просветной жидкости или 0,25–0,5 г мукозного агара с использованием набора DNeasy PowerSoil (Qiagen). Извлеченная ДНК использовалась для создания библиотек на основе регионов V1-V2 гена 16S рРНК с праймерами 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' и 338R 5'-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3' [213]. ПЦР-реакции проводились в четырех экземплярах с использованием AccuPrime High Fidelity Polymerase для эксперимента TWINSHIME и Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA) для эксперимента с одним реактором. Затем они объединялись и очищались с использованием 1:1 объема SPRI (GE HealthCare, Chicago, IL). Набор PowerClean Pro использовался для дополнительной очистки слизистых образцов. ДНК количественно определялась для каждого образца с использованием набора Quant-iT PicoGreen Assay Kit (Thermo Fisher). Образцы объединялись в равных молярных количествах. Затем библиотека секвенировалась с использованием прибора MiSeq (Illumina, San Diego, CA) и набора реагентов 2×250 п.н. Холостые экстракции и вода без ДНК подвергались той же процедуре амплификации и очистки для эмпирической оценки загрязнения окружающей среды и реагентов. Восемь искусственных фрагментов гена 16S, синтезированных в генблоках и объединенных в известных количествах, были включены в качестве положительных контролей.

2.4.5. Секвенирование гена 16S рРНК

Секвенирование ДНК проводилось в Центре микробиома Детской больницы Филадельфии (CHOP). Библиотеки гена 16S рРНК создавали из

экстрагированной ДНК с использованием баркодированных ПЦР-праймеров, нацеленных на регион V1–V2 бактериального гена 16S рРНК (27F: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ и 338R: 5′-TGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3′). ПЦР выполняли в четырёх повторностях: для эксперимента TWINSHIME 3C – с использованием полимеразы высокой точности AccuPrime, для эксперимента SC – полимеразы Q5 (New England Biolabs).

Ампликоны объединяли, очищали магнитными шариками SPRI (1:1, GE Healthcare); для слизистых образцов дополнительно применяли набор PowerClean Pro. Концентрацию ДНК определяли с использованием Quant-iT PicoGreen (Thermo Fisher). Все образцы нормировали по молярности, после чего объединённую библиотеку секвенировали на платформе Illumina MiSeq (2×250 п.н.). Отрицательные контроли (вода без ДНК и холостые экстракции) проходили полный цикл амплификации и очистки. В качестве положительного контроля использовали смесь синтетических фрагментов 16S рРНК известной концентрации.

«Обработка данных выполнялась в QIIME2 (v.2019.4). После демультиплексирования и удаления артефактов чтения объединяли с помощью DADA2 для получения высокоточных ASV» [214]. Таксономическую классификацию проводили с использованием базы Greengenes (v13.8) [215]. Выравнивание выполняли MAFFT» [216], «филогенетическое дерево строили FastTree] в среде R. Чтения с минимальным значением > Q20 объединялись для формирования операционных таксономических единиц (OTUs)» [215, 217]. На основе полученных ASV рассчитывали показатели альфа-разнообразия (богатство, индекс Шеннона, филогенетическое разнообразие Фейта) и бета-разнообразия (взвешанные и невзвешенные UniFrac). Статистические сравнения относительной численности таксонов выполняли с использованием двустороннего t-теста Стьюдента. Данные секвенирования депонированы в NCBI SRA: SRP290868 (Биопроект PRJNA673917).

2.5. Подготовка образцов, разделение и обнаружение метаболитов

Метаболиты можно анализировать в различных типах образцов, таких как биологические жидкости, ткани и среды биореакторов. В зависимости от типа матрицы подготовка образцов включает несколько этапов, таких как экстракция, очистка, удаление солей, осаждение белков, диализ и другие. В нашем исследовании для разделения метаболитов использовались методы хроматографии, а для их обнаружения – масс-спектрометрия.

2.5.1. Анализ короткоцепочечных жирных кислот с использованием газовой хроматографий с масс-спектрометрическим детектором

КЦЖК количественно определяли в форме свободных кислот с использованием ГХ/МС Shimadzu QP2010 Ultra (Shimadzu, Columbia, MD, USA), оснащенного колонкой Stabilwax-DA, 30 м, 0,25 мм ID, 0,25 μм (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA). Все реагенты заказывались у Sigma Aldrich (St. Louis, MO). Каждый образец готовили и обрабатывали в трех экземплярах. Целевыми КЦЖК были уксусная кислота, пропановая кислота, масляная кислота, пентановая кислота, гексановая кислота, 2-метилбутановая кислота, 3-метилбутановая кислота и 2-метилпропионовая кислота. Для анализа количественно определенные количества 2-метилбутановой кислоты, 3-метилбутановой кислоты и 2-метилпропионовой кислоты объединяли и представляли как общие разветвленные короткоцепочечные жирные кислоты (РКЦЖКs).

Для начала 250 μл каждого размороженного образца добавляли в 2 мл центрифужную пробирку, содержащую 12,5 μл внутреннего стандарта, 62,5 μл 49% серной кислоты, 50 мг хлорида натрия и 1 мл диэтилового эфира. Пробирки встряхивали на HulaMixer (Lifetechnologies, Waltham, MA) в течение 3 минут. Затем пробирки центрифугировали при 664 x g в течение 3 минут, органический слой удаляли и переносили в виалу для ГХ. Виалу загружали в автосамплер ГХ, и КЦЖК количественно определяли с помощью газового хроматографа-масс-спектрометра (ГХ-МС). Объем 1 μл образца вводили в

режиме разделения 1:20 при 260 °C, температура интерфейса и источника ионов составляли 250 °C и 220 °C соответственно. Настройки термостатирования прибора были следующими: начальная температура 125 °C применялась и удерживалась в течение 1 минуты. Затем она повышалась до 170 °C со скоростью 30 °C/мин, затем до 181,5 °C со скоростью 20 °C/мин и удерживалась в течение 0,5 минуты. Далее температура повышалась до 220 °C со скоростью 50 °C/мин и удерживалась в течение 2 минут. Режим полного сканирования с массовым диапазоном m/z 25–375 использовался для сбора данных, газ-носитель – гелий со скоростью потока 1 мл/мин.

2.6. Кинетика высвобождения пироксикама из разработанных биополимерных систем доставки лекарственных средств

2.6.1. Кинетика высвобождения пироксикама из микросфер

2.6.1.1. Эксперименты *in vitro*

Модель высвобождения Px *in vitro* проводилась путем загрузки P/Z НМ и суспензии Px в диализные мешки. Эти мешки помещали в стеклянные сосуды тестера растворения Erweka DT 600 (аппарат USP 2), содержащие 400 мл фосфатного буфера (PBS) pH 6,4 при 37°C и содержащие 0,04% NaN_3 (использовался как антимикробное средство только для исследования *in vitro*). Диализные мешки прикрепляли к лопастям для обеспечения хорошего перемешивания в среде высвобождения и минимизации риска агрегации частиц во время экспериментального теста. Высвобождение Px контролировали с помощью УФ-детектора UA-5 ISCO (США), соединенного с перистальтическим насосом (скорость потока 40 см/мин). Также образцы отбирались через определенные интервалы времени, и количество высвобожденного Px анализировали спектрофотометрически с использованием калибровочных кривых [218]. Каждый эксперимент проводился в трех экземплярах. Максимальная длина волны поглощения для Px была установлена на 335 нм для буфера pH 1,5 и 355 нм для pH 6,4.

2.6.1.2. Эксперименты *ex vivo*

Крысам вводили внутрижелудочно раствор пектина в течение трех дней. Потом крысы были подвергнуты эвтаназии с использованием CO_2. Содержимое кишечника суспендировали в среде растворения (PBS, pH 6,4), заполняли диализные мешки, содержащие P/Z НМ, и затем помещали в сосуды аппарата USP 2, содержащие 400 мл среды для растворения. Температура оставалась постоянной при 37 °C, а скорость перемешивания поддерживалась на уровне 50 об/мин. Фактическую загрузку лекарства определяли путем вычисления общего количества введенного в систему лекарства за вычетом промытого количества путем последующего УФ-обнаружения.

2.6.1.3. Эксперименты *in vivo*

Протокол использования крыс для экспериментов *in vivo* был одобрен ARS, USDA [219]. В ходе этих экспериментов изучалась фармакокинетика высвобождения Рх из P/Z НМ при оптимальном соотношении P/Z 1.30 [46] у крыс. Крысы (весом около 180–240 г) содержались в клетках с доступом к пище и воде по усмотрению. Во время введения крысы фиксировались на доске в положении лежа на спине. Суспензия Рх CF в воде для контрольных групп и P/Z НМ для экспериментальных групп крыс вводилась перорально с помощью канюли в разовой дозе 3,6 мг/кг.

«Метод ВЭЖХ для определения Рх обеспечивает высокую чувствительность. Однако этот метод является сложным и трудоемким. Клопас и др. предложили УФ-спектрофотометрический метод для определения Рх и его метаболита в плазме. Этот метод прост, быстр, точен, надежен и используется для анализа концентрации Рх в плазме и желудочно-кишечной жидкости» [220]. Желудочно-кишечные тракты животных были разделены на три сегмента (желудок, тонкая кишка и толстая кишка) и удалены. Содержимое каждого сегмента аккуратно удаляли и помещали в стеклянную трубку объемом 10 мл. В образцы добавляли 0,3 мл 1,0 М HCl и 5 мл чистого диэтилового эфира. Образцы перемешивали в течение 1 мин и водную и органическую фазы разделяли центрифугированием при 3000

об/мин в течение 10 мин. После замораживания образцов при -20°C органические слои помещали в стеклянные трубки объемом 10 мл и выпаривали досуха под слабым потоком азота. Остаток восстанавливали с использованием смеси 1,5 мл 1,0 М HCl-ацетонитрила (1:1, v/v). Концентрацию Px в смеси измеряли с помощью УФ-спектрофотометра при длине волны 343 нм.

Образцы крови отбирали из хвостов крыс непосредственно перед эвтаназии в гепаринизированные центрифужные пробирки через 1, 6, 8, 24, 48, 60 и 72 часа после введения P/Z НМ. Далее центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 мин, и образцы плазмы собирали. Концентрацию Px в образцах плазмы определяли на спектрофотометре Thermo UV1 (Великобритания) [220].

2.6.2. Математический анализ механизма транспорта лекарств

Для анализа экспериментальных данных и выяснения механизма транспорта пироксикама (Px) из пектин-зеиновых гидрогелей были использованы три кинетические модели диффузии.

Модель 1 – модель Хигучи. Она основана на предположении, что высвобождение регулируется диффузией действующего вещества и описывается уравнением:

$$\frac{Mt}{M\infty} = kH \times t^{\frac{1}{2}}$$

где Mt/M∞ – доля высвобожденного препарата в момент времени *t*, *kH* – константа Хигучи.

Модель 2 – кинетика нулевого порядка. Используется для систем, где вклад диффузии сочетается с релаксацией полимерной матрицы:

$$\frac{Mt}{M\infty} = kd \times t$$

где *kd*– константа высвобождения. Эта модель применима при линейной зависимости высвобождения от времени.

Модель 3 – модель Ритгера–Пеппаса. Применяется для описания смешанных механизмов транспорта и представлена уравнением:

$$\frac{Mt}{M\infty} = k1 \times t^n$$

где k1 – кинетическая константа, *n* – показатель диффузии, характеризующий механизм транспорта:

- n=0,5n – классическая диффузия Фика для тонких гидрогелей;
- 0,5<n<1 – аномальный (не-Фиковский) транспорт I типа, когда диффузия сочетается с релаксацией полимера;
- n=1 – транспорт II типа, соответствующий высвобождению нулевого порядка.

Применение этих моделей позволило количественно оценить вклад диффузионных и релаксационных процессов в механизм высвобождения пироксикама из полученных гидрогелей.

2.6.3. Разработка in vitro – in vivo и ex vivo – in vivo корреляции

Доля высвобожденного лекарственного вещества рассчитывалась на основании данных экспериментов *in vitro*. Фармакокинетика пироксикама (Px) была аппроксимирована двухкомпартментной моделью, в связи с чем доля абсорбированного *in vivo* вещества определялась методом деконволюции на основе плазменных концентраций с использованием метода Лоо–Ригельмана.

Применённый подход соответствует требованиям FDA к построению IVIVC для лекарственных форм пролонгированного высвобождения, где также используется двухэтапная деконволюция (FDA, Guidance for Industry, IVIVC) [193]. Для расчётов использовались данные внутривенного введения пироксикама, опубликованные ранее [221].

Анализ фармакокинетических параметров, а также построение моделей IVIVC и EVIVC выполнялись с применением программного обеспечения Phoenix WinNonlin 8.3 с модулем IVIVC Toolkit (Certara), а также пакета Pharmacokinetic Modeling Program (APL Analyst IT Solutions Pvt Ltd).

ГЛАВА 3. ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕКТИНА И ЗЕИНА, ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ СВОЙСТВ

3.1. Получения пектинов различными методами и их структурная характеристика.

«В работах З.К. Мухидинова и его соавторов приводятся различные методы получения пектина из растительного сырья и сельскохозяйственных отходов» [222, 223, 224, 225, 226]. Традиционно пектин получают кислотным гидролизом из сельскохозяйственных отходов (яблочные выжимки и корзинки подсолнечника). Гидролиз-экстракция проводится с применением кислот при температуре 80-90 °C, pH (1.2-1.8) и длительное время (1-2 часа). Полученный пектин осаждается этанолом и разделяется на три фракции: микрогель, пектиновые вещества и олигосахариды. Этот метод характеризуется длительностью и высокой энергоёмкостью, что ухудшает качество конечного продукта из-за деградации молекул полисахарида.

«В качестве альтернативы в лаборатории «Химии высокомолекулярных и биологически активных соединений» Института химии им. В.И. Никитина НАНТ был разработан метод быстрой экстракции пектина (флэш-гидролиз), позволяющий значительно сократить время обработки и сохранить структурные свойства пектина» [223, 225, 227]. Флеш-гидролиз проводилась в следующих условиях**:** температура 120 °C, давление до 2 атм и pH 2.0, длительность процесса от 3 до 20 минут. Метод позволил увеличить выход пектина и улучшить его молекулярные характеристики, что свидетельствует об его эффективности. «Полученный пектин по сравнению с традиционным методом имел узкое молекулярно-массовое распределение и высокое содержание звеньев галактуроновой кислоты» [223, 225, 227].

«Разработка математического моделирования процессов гидролиза и экстракции пектина важно при разработке технологий получения полисахаридов из сельскохозяйственных отходов. Авторами были предложены математические модели для описания динамики стадии технологического процесса, которые включали процессы замачивания, гидролиза, фильтрации,

нейтрализации и ультрафильтрации» [228]. Применение этих моделей позволял оптимизировать технологические параметры производства полисахаридов, оценить расход сырья и снизить потери на этапах технологического процесса. «Созданная модель, основана на алгоритмах нейро-нечёткой логики и методах авторегрессии, который помог контролировать качество продукта на всех стадиях обработки сырья» [229].

«Полученный пектин был очищен с использованием ультрафильтрации и высушен с помощью распылительной сушки» [11, 230]. Эти методы позволяли удалить примеси и получить высококачественный продукт с оптимальной степенью этерификации, молекулярной массой и другими ключевыми характеристиками. Применение таких подходов способствовало разработке эффективной технологии получения пектина, пригодного для использования в пищевой промышленности и биомедицине.

Пектин, ценный полисахарид, широко используемый в пищевой, фармацевтической и косметической промышленности. «Технологическая проблема с его получением традиционным методом связаны с высоким энергопотреблением, а его очистка с использованием воспламеняющего этанола» [222, 223, 230, 231]. В связи с этим, данная часть нашего исследования направлена на оценку, «может ли процесс DUF по сравнению с традиционным VEAP методом предложить эффективную, экономичную и экологически безопасную альтернативу, при этом сохраняя или улучшая качество экстрагированного пектина» [232].

Технологическая схема получения и очистки пектина представлена на рисунке 3.1. Предварительно подготовленное растительное сырьё подвергали кислотной экстракции при контролируемой температуре и значения pH. После стадии экстракции полученный пектиновый экстракт подвергали многостадийной очистке по двумя технологиями, методом тангенциальной диаультрафильтрации и VEAP методом. Метод диаультрафильтрация позволял удалить низкомолекулярные органические примеси, соли и сопутствующие компоненты из растительного сырья, а мембранная технология позволял

фракционировать пектин по молекулярной массе, обеспечивал мягкие условия очистки и предотвращал разрушение структуры пектина.

Другую часть раствора концентрировали методом вакуумного испарения экстрагента для уменьшения объёма раствора. После концентрирования осаждали пектин этанолом. Образовавшийся осадок отделяли от раствора, промывали этанолом для удаления остаточных примесей и затем высушивали.

Структуру очищенного пектина, полученного двумя методами и степень его очистки определили с использованием ИК-Фурье, ВЭЭЖХ и двумерной ЯМР-спектроскопией. Полученные результаты подтвердили сохранность структурной организации пектина после выделения и очистки методом тангенциальной диаультрафильтрации и высокую его эффективность.

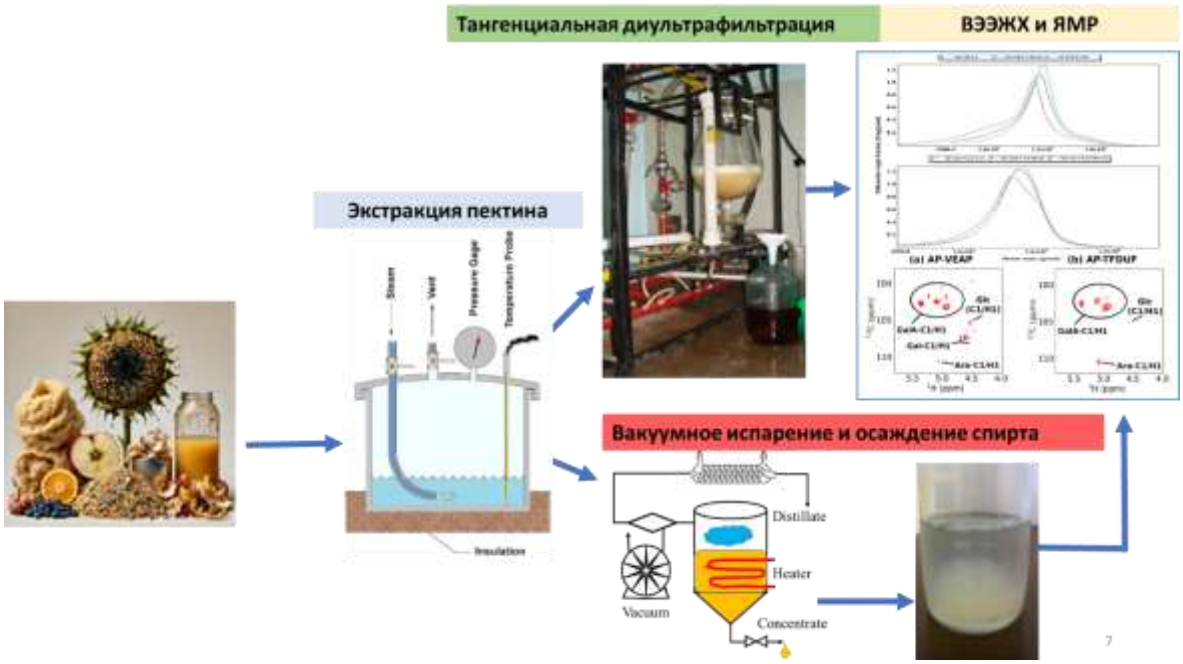


Рисунок 3.1. – Технологическая схема получения и очистки пектина методом тангенциальной диаультрафильтрации и традиционного метода со спиртовым осаждением.

Проведённые нами исследования показали, что применение диаультрафильтрации (DUF) позволяет получать пектин с более высоким содержанием галактуроновой кислоты по сравнению с традиционной очисткой методом VEAP [232]. В образцах яблочного пектина, очищенных методом

DUF, содержание галактуроновой кислоты составляло 64,8%, тогда как после VEAP 50,4%. Степень этерификации также различалась и составляла 71,4 и 68,6% соответственно.

Различия между методами очистки показано в ВЭЭЖХ хроматограмме при анализе молекулярно-массового распределения полученных образцов (рисунок 3.2). На графиках яблочного и подсолнечного пектинов наблюдается изменение положения максимумов и формы распределения после обработки образцов.

Различия между методами очистки исследовали по молекулярно-массовому распределению полученных данных методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭЖХ) (рисунок 7). На хроматограммах видно изменения формы и положения максимумов анализированных образцов, для яблочного пектина средневзвешенная молярная масса (Mw) увеличилась с 483 до 492 кДа ($p > 0,05$) и индекс полидисперсности (Mw/Mn) с 3,03 до 3,10. Таким образом, метод DUF по сравнению с традиционным позволил разделить низкомолекулярные компоненты без изменения молекулярно-массовых характеристик основной пектиновой фракции.

Для установления состав и структуры пектинов использовали одномерную и двумерную ЯМР-спектроскопия $^{1}H–^{13}C$ HSQC (рисунок 3.3). Результаты показали, что в аномерной области спектра яблочного пектина после очистки методом DUF наблюдается исчезли сигналы относящихся к остаткам β-Gal и β-Glc и к другим примесям без изменения сигналов α-GalA, характерные для галактуронановых участков пектиновой цепи. Эти результаты согласуются с данными химического анализа полученные методом ВЭЭЖХ и подтверждают чистоту пектина при сохранении основных структурных фрагментов его макромолекул очищенного методом DUF и удаления низкомолекулярных сахарсодержащих компонентов в процессе очистки этим методом.

Снижение потребности в этаноле и энергии (с 13,50 до 3,45 кВт·ч.) представляет практический интерес при выборе технологии получения очищенного пектина в фармации, особенно при масштабировании производства на заводах.

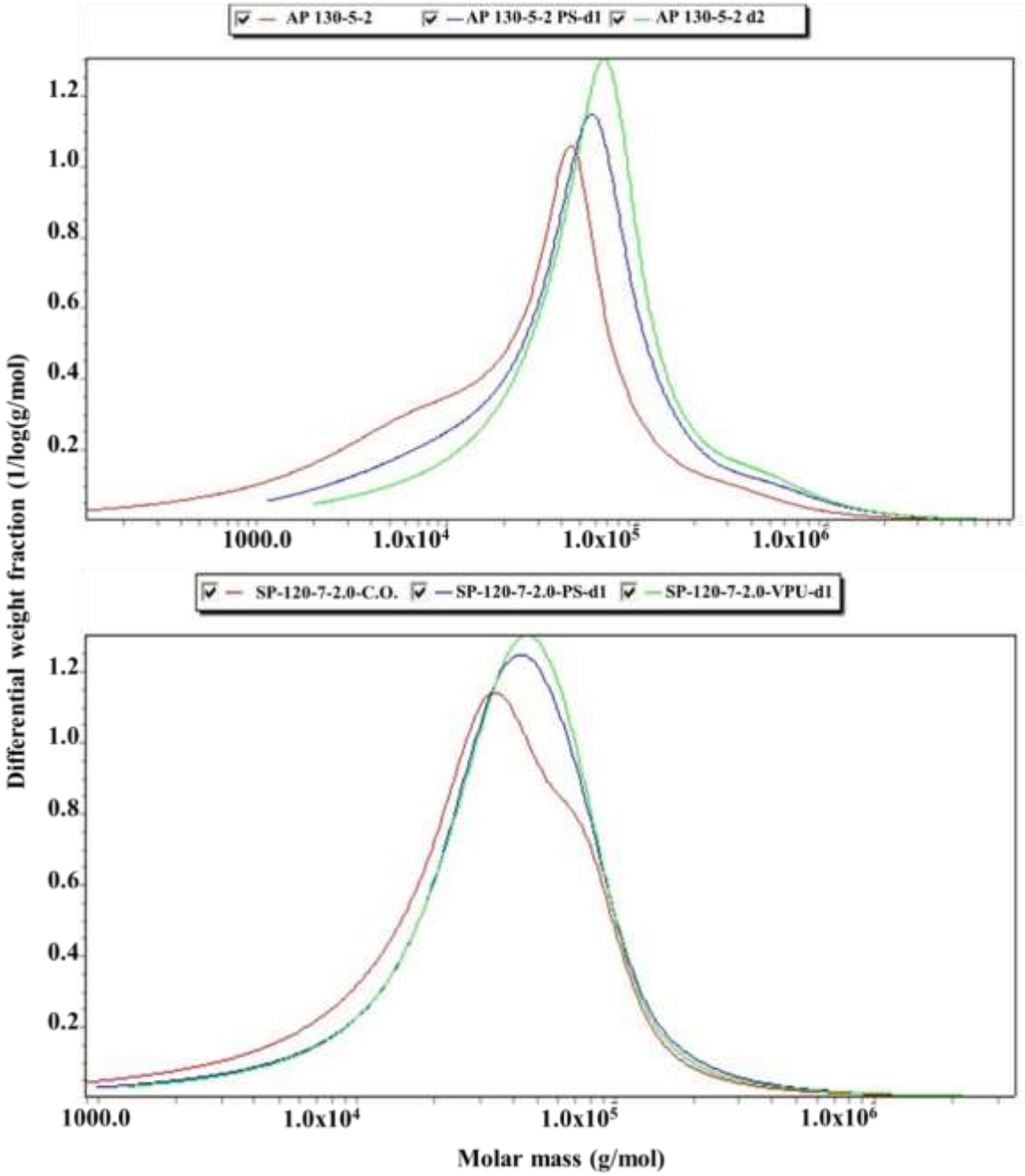


Рисунок 3.2. - Молекулярно-массовое распределение яблочного (вверху) и подсолнечного (внизу) пектинов до и после очистки методами VEAP и DUF.

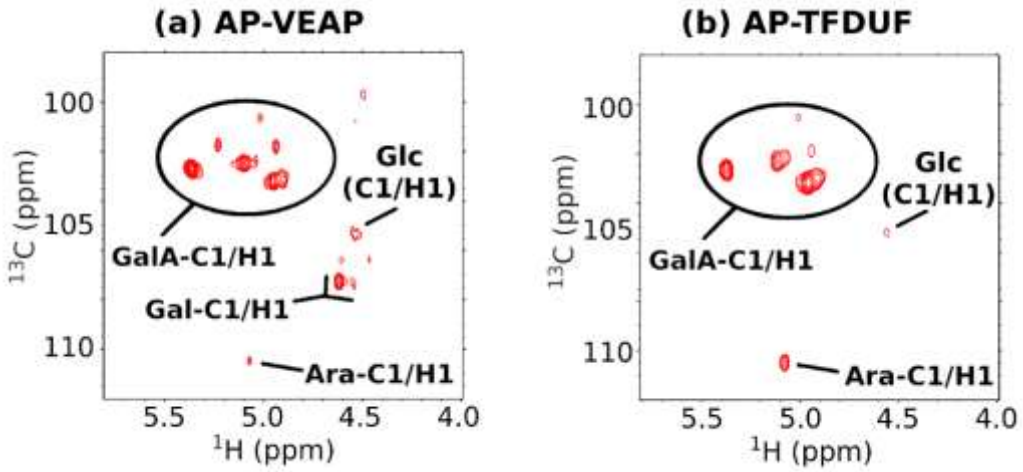


Рисунок 3.3. - Аномерные области двумерных спектров ЯМР ^{1}H–^{13}C HSQC образцов яблочного пектина AP-VEAP (a) и AP-DUF (b)

Изменение химического состава и молекулярно-массовых характеристик пектина имеет значение для его дальнейшего применения в полимерных системах доставки лекарственных средств. Содержание галактуроновой кислоты, степень этерификации и молекулярно-массовое распределение относятся к параметрам, влияющим на взаимодействие полимерных цепей, набухание и формирование гелевых структур, а в фармации для стандартизации пектина. Поэтому полученные при сравнении DUF и VEAP результаты необходимо учитывать при стандартизации пектина для получения гидрогелевых матриц и исследовании высвобождения инкапсулированных лекарственных веществ.

В заключении полученные результаты поддерживают необходимость внедрение DUF в промышленности для получения высокочистого пектина в фармацевтической промышленности. В будущем перспективы включают изучение применимости DUF к сельскохозяйственным отходам богатым пектином.

3.2. Технология получения и характеристика зеинов кукурузы, произрастающей в Таджикистане.

«Белки семян злаковых культур обладают высокой биологической ценностью и представляют интерес прежде всего как полноценный продукт

питания. Кроме того, они отличаются полиморфизмом и широко используются как эффективные белковые маркеры в генетике и селекции» [233]. «Благодаря уникальным физико-химическим, механическим и биологическим свойствам, спектр их применения в последние годы значительно возрос, в частности в области медико-биологических полимеров при создании лекарственных средств с целенаправленным транспортом» [9, 234].

В этом плане интерес представляют белки семян кукурузы, выращенной в условиях Таджикистана. Большую часть общих белков кукурузы составляют спирторастворимые белки – зеины. Это многокомпонентные белки с высоким содержанием таких аминокислот, как пролин и глютамин. За счёт высокого содержания лейцина, изолейцина, валина и фенилаланина имеют большое число гидрофобных групп. «Незначительное содержание основных аминокислот лизина и аргинина определяет низкий электростатический заряд молекул. За счёт гидрофобного взаимодействия и водородных связей зеины обладают большой агрегирующей способностью. Зеины, выделенные из муки семян кукурузы экстракцией этанолом, представляют смесь, состоящую из ковалентно связанных полимеров и высокомолекулярных агрегатов» [235].

Для отработки оптимальных условий выделения зеина нами были использованы три метода: первый – непосредственно из обезжиренной муки - экстракция водным этанолом различной концентрации (от 60 до 85%); второй – экстракция 6 М мочевиной и третий – по методу Т.Б. Осборна – последовательная экстракция из обезжиренной муки вначале легкорастворимых белков – альбуминов и глобулинов, затем зеинов и глютелинов (рисунок 3.4).



Рисунок 3.4. – Технологическая схема получения и очистки зеина из кукурузного сырья с последующим фракционированием и электрофоретическим контролем состава белков

На рисунке 3.4 представлена последовательность основных стадий технологической схемы получения зеина из кукурузной муки. Исходный белковый материал подвергали экстракции водно-спиртовым раствором при перемешивании. При этом спирторастворимые белки (зеини) переходили в жидкую фазу. После стадии экстракции проводили отделение нерастворимых компонентов и концентрирование белковой фракции. Полученный осадок зеина выделяли и очищали, после чего высушивали до получения порошкообразного продукта. Контроль чистоты и молекулярного состава полученного зеина осуществляли методом электрофореза, позволяющий оценить фракционный состав белков.

В таблице 3.1 представлен выход зеина, выделенного тремя методами. Результаты показывают, что выход зеина зависит от метода выделения и концентрации этанола. Оптимальными условиями является трёхкратная экстракция 75% этанолом, причём, когда первые две экстракции проводятся при комнатной температуре в течение 2 ч, а третья при 60 °C в течение 2 ч. Выход зеина при этом составляет более 3% (50% от общего содержания белков). При других соотношениях этанола и воды выход зеина не превышает 2.2–3.0%. Выделенные таким способом белки хорошо растворялись в 90% этаноле и не содержали примеси липидов и крахмала. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метод экстракции зеинов из обезжиренной муки

при температуре 20–25 °C позволяет частично предотвратить агрегацию белков и повысить растворимость в этаноле.

Таблица 3.1. - Выход зеина из обезжиренной муки кукурузы

Условия экстракции	Выход, %
60% этанол, 2-е экстракции при комн. температуре, 3-я при 60 °C, в течение 2 ч	2.0
70% этанол, при тех же условиях	2.2
75% этанол, при тех же условиях	3.3
80% этанол, при тех же условиях	3.0
85% этанол, при тех же условиях	2.3
75% этанол, по методу Осборна	3.0
6 М мочевина, экстракция при 0–4 °C в течение ночи	3.0

Зависимость выхода зеина от процентной концентрации этанола можно представить в виде следующей диаграммы (Рисунок 3.5).

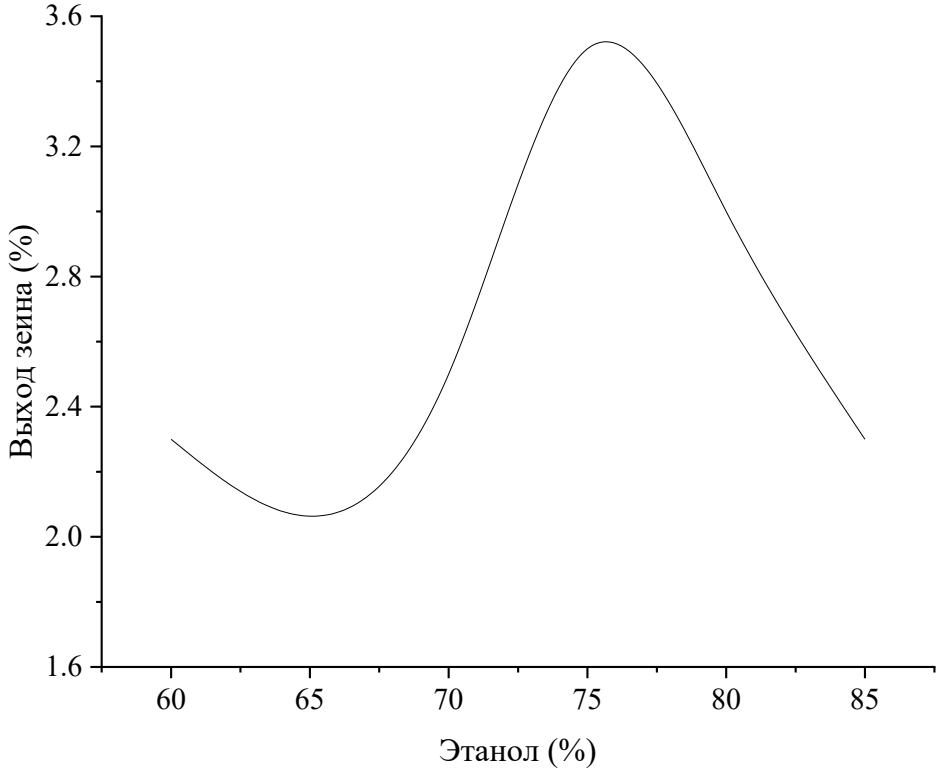


Рисунок 3.5. - Влияние концентрации этанола на выход зеина

Метод Т. Б. Осборна позволяет получить общую картину содержания широкого набора запасных белков семян кукурузы. Легкорастворимые белки в

семенах содержатся в незначительном количестве: альбумины – 0.1%, глобулины - 0.27%, зеины – 3.0% и глютелины 2.8% от общего содержания белка в зерне. Однако следует отметить, что зеины, выделенные 6 М мочевиной, как показали результаты электрофоретического анализа, содержат примеси сопутствующих компонентов и не полностью растворяются в этаноле.

На рисунке 3.6 представлена электрофореграмма зеинов, выделенных тремя способами: из обезжиренной муки этанолом различной концентрации (полосы 1-4), методом Т.Б. Осборна (полоса 5) и 75% этанолом из необезжиренной муки (полоса 6). Для предотвращения агрегации белков перед разделением в ПААГ белки растворяли в буфере, содержащем 2М мочевину с 6% акриламидом. Но поскольку образцы зеина плохо растворялись в буфере, концентрацию мочевины увеличили до 6 М.

Белковые спектры, как видно из электрофореграммы, содержат от девяти до 13 компонентов, отличающихся по интенсивности и электрофоретической подвижности в ПААГ. Из них пять являются главными компонентами с наибольшей интенсивностью, четыре – компонентами средней интенсивности и остальные минорные – компонентами слабой интенсивности.

Сравнительный анализ электрофореграмм показал, что в зависимости от метода выделения и концентрации этанола белковый состав зеина отличается. Так, в образце, выделенном по методу Т. Б. Осборна, отсутствует компонент с Rf 0.70, но присутствуют два интенсивных компонента - с Rf 0.78 и 0.89, которые полностью отсутствуют в других образцах. В зеине, выделенном из необезжиренной муки, присутствует редкий интенсивный компонент с Rf 0.72, который отсутствует в остальных образцах. Кроме того, обращают на себя внимание отличия, которые наблюдаются в спектрах образцов зеинов, выделенных из обезжиренной (1–5) и необезжиренной (6) муки. В случае необезжиренной муки возможно образование липопротеинов, которые оказывают влияние на миграцию белковых фракций, вследствие

уменьшения заряда молекул. При удалении жиров свободные от липидов фракции могут агрегировать, и при этом увеличивается плотность заряда молекул, их миграция в геле.



Рисунок 3.6. - Электрофорез в 7.5% ПААГ зеинов при pH 3.1, выделенных раствором этанола с различной концентрацией: полосы 1 и 7 - 70%; 2 и 8 – 75%; 3 и 9 – 80%; 4 и 10 - 85%; 5 и 11 - 75% этанолом по методу Т.Б. Осборна; 6 и 12 – 75% этанолом из необезжиренной муки семян кукурузы

Результаты проведённых исследований позволили установить оптимальные условия выделения зеинов кукурузы с удовлетворительным выходом и растворимых в этаноле. Показано, что высоковольтный электрофорез в ПААГ при pH 3,1 в присутствии мочевины даёт хорошее разрешение и может быть использован при исследовании компонентного состава зеинов кукурузы.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА БИОПОЛИМЕРНЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ВЕЩЕСТВ

4.1. Биополимерные системы доставки лекарств для пролонгированного высвобождения лекарственного вещества

При разработке систем доставки лекарственных средств на основе пектина представляет интерес его сочетание с зеином. Эти биополимеры различаются по своим физико-химическим свойствам. Зеин гидрофобный белок кукурузы, растворимый в водно-спиртовой среде и способный образовывать плёнки. Пектин, напротив, обладает гидрофильными свойствами, образует гели и подвергается ферментативному расщеплению под действием кишечной микробиоты. Сочетание пектина и зеина позволяет получать микросферы, свойства которых можно контролировать путём изменение состава полимерной матрицы.

Полученные микросферы стабилизировали путём ионной сшивки пектина с использованием ионов кальция (Ca^{2+}) или цинка (Zn^{2+}). Это повышало прочность и устойчивость полимерной матрицы (Рисунок 4.1). В зависимости от растворения лекарственное средство добавляли в соответствующую фазу, например, водорастворимые соединения вводили в раствор пектина, а вещества, растворимые в спирте, в раствор зеина, из которого формировалась внешняя оболочка микросферы.

Основной гипотезой при разработке микросфар было то, что гидрофобная зеиновая оболочка будет ограничивать набухание пектиновой матрицы и замедлять высвобождение пироксикама в верхних отделах желудочно-кишечного тракта. Пектин в свою очередь, обеспечивает чувствительность системы к действию ферментов кишечной микробиоты. Таким образом, сочетание этих полимеров позволяет регулировать устойчивость микросфер и высвобождение лекарственного средства.

Полученные данные показали, что важным фактором, влияющим на свойства полученных микросфер, является соотношение пектина и зеина, так как увеличение содержания зеина снижал набухание матрицы в условиях

желудка и тонкого кишечника и замедлял диффузию лекарственного вещества. Поэтому изменяя соотношение компонентов и условия формирования микросфер, можно регулировать скорость высвобождения лекарственного вещества.



Рисунок 4.1. – Технологический процесс получения пектин зеиновых микросфер

В целом, проведённые исследования показали, что разработанные пектин-зеиновые микросферы обеспечивали замедленное высвобождение пироксикама в условиях верхних отделов ЖКТ и его преимущественное высвобождение в толстом кишечнике. Это позволяет рассматривать полученные системы доставки лекарственных средств при разработке форм, предназначенных для модуляции микробиоты толстого кишечника, лечения его воспалительных и инфекционных заболеваний.

4.2. Разработка гидрогелевых микросфер из пектина и зеина

В ходе исследования проведена серия экспериментов по получению биополимерных микросфер на основе пектина и зеина. Использовали цитрусовые пектины с низкой и высокой степенью метоксилирования, а также яблочные пектины. Основной задачей было получение устойчивых и

биосовместимых микросфер, способных инкапсулировать лекарственные вещества, в частности пироксикам (Px) и обеспечивать его пролонгированное высвобождение в желудочно-кишечном тракте. При этом изучали влияние вида пектина, соотношения компонентов и условий гелеобразования на свойства получаемых микросфер.

4.3. Исходные соотношения компонентов и общая характеристика микросфер

Результаты исследования влияния соотношения зеина и пектина (З/П), количества сшивающего агента ($CaCl_2$) и содержания пироксикама (Px) на выход микросфер, степень их набухания и содержание инкапсулированного лекарственного средства приведены в таблице 4.1. Как видно из таблицы, выход микросфер составлял от 15,6 до 64,7%. Наибольшее содержание Px в комплексе (93,8%) получено при соотношении З/П 5:1, при этом степень набухания составляла 7,5. С увеличением доли зеина наблюдалось повышение выхода микросфер от 45,0–64,7% и содержания связанного пироксикама 51,7–93,8% при этом степень набухания снизилось от 33,25 до 7,5 соответственно.

Таблица 4.1. - Исходные соотношения компонентов для получения зеин-пектиновых микросфер и их характеристика

З/П	Зеин (мг)	Пектин (мг)	$CaCl_2$ (мг)	Px (мг)	Выход (мас. %)	Степень набухания	Px в комплексе (%)
1:1	250	250	20,6	20	37,0	49,0	37,0
1:3	100	300	24,8	20	15,6	56,1	9,8
1:6	50	300	24,8	20	16,5	68,0	12,4
1,4:1	500	350	20,6	20	45,0	33,25	57,0
1,4:1	500	350	20,6	200	55,6	13,91	51,7
2:1	500	250	20,6	20	55,6	19,45	72,6
5:1	1000	200	16,6	20	64,7	7,5	93,8

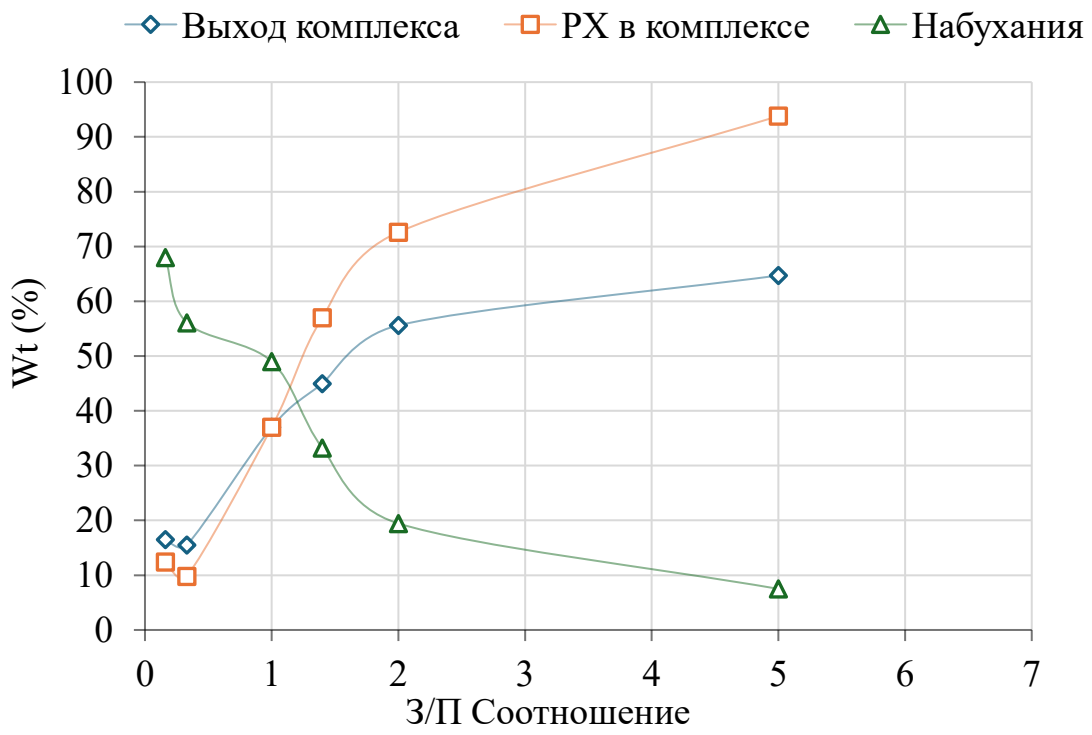


Рисунок 4.1. - Зависимость выхода микросфер, степени набухания и содержания РХ от соотношения З/П

На рисунке 4.1 представлены зависимости выхода микросфер, степени набухания и содержания пироксикама от соотношения зеина и пектина. При увеличении доли зеина в системе увеличивается выход микросфер и уменьшается степени их набухания. Вероятно, это связано с увеличением гидрофобности полимерной матрицы и более плотным расположением биополимеров, что ограничивает проникновение воды внутрь микросфер. Одновременно возрастает содержание инкапсулированного пироксикама. Полученные результаты показывают, что соотношение зеина и пектина существенно влияет на свойства формируемых микросфер.

4.4. Оптимизация состава и влияние концентрации пироксикама

Дополнительные эксперименты показали, что увеличение количества пироксикама в 10 раз (200 мг) при соотношении З/П = 1,4:1 не даёт ожидаемого роста эффективности инкапсулирования, так как степень связывания пироксикама снизилась до 51,7% по сравнению с 57,0% при таком же соотношении З/П. Вероятно, при слишком высокой загрузке пироксикама

полимерная матрица достигает критической насыщенности, при которой начинает снижаться плотность упаковки гидрофобных участков. Это указывает на важность оптимизации массы активного вещества и концентрации зеина. Предполагается, что определённую роль играют энтальпийные факторы, а при умеренном содержании зеина в системе возможно формирование достаточного числа ионных и водородных связей между пектином и белком.

4.5. Сравнение различных типов пектина и ионов-сшивателей

Данные о гидрогелевых микросферах на основе различных типов пектина и влиянии двухвалентных металлов (Ca^{2+}, Zn^{2+}) на характеристики микросфер приведены в таблице 4.2. Результаты экспериментов с различными пектинами и ионами двухвалентных металлов, приведённые в таблице 4.2, подтверждают полученные раннее результаты, что выход пектин-зеиновых микросфер, степень их набухания и содержание пироксикама зависят от соотношения биополимеров, природы двухвалентного катиона-сшивателя и количества вводимого пироксикам.

Максимальная эффективность инкапсуляции пироксикама 95,20% достигалась при массовом соотношении зеина и пектина от 1,0:1 до 1,5:1, так как выход микросфер, степень набухания и содержание пироксикама были 46,60%, 21,00 и 95,20% соответственно (таблица 4.2).

Как видно из таблицы 4.2 свойства микросфер зависели от природы сшивающего катиона. Так, при использовании ионов кальция (Ca^{2+}) полученные системы характеризовались степенью набухания от 10,33 до 29,10. В случае применение ионов цинка (Zn^{2+}) сопровождалась снижением этого показателя до 5,80 и изменением содержания пироксикама в комплексе до 86,00% (таблица 4.2), а при соотношении пектин/зеин 1:1 и использование ионов Zn^{2+} вместо Ca^{2+}, содержание пироксикама в микросферах достигало 71,50% (таблица 4.3). Такие различия, вероятно, связаны с особенностями взаимодействия двухвалентных катионов с карбоксильными группами пектина и формированием полимерной сетки. Также образование

дополнительных координационных связей, вероятно, способствует уплотнению полимерной матрицы и лучшему удержанию лекарственного средства.

Таблица 4.2. - З/П гидрогелевые микросферы и их характеристики

З/П (массовое соотношение)	M^{2+}, %		Рх, мг	Выход микросфер, %	Степень набухания	Содержание Рх, %
	Ca^{2+}	Zn^{2+}				
2:1	3,70		50	66,70	13,69	75,80
1:3	3,56		50	64,20	29,10	81,80
1,5:1	2,02		50	46,60	21,00	95,20
1:1	1,26		50	34,50	11,50	66,00
1:1	2,44		50	76,30	10,33	66,00
1:1	2,57		20	35,70	11,00	53,30
1:3		1,85	50	61,20	31,10	86,00
1:2		1,08	50	28,60	19,50	52,80
1,5:1		1,27	50	45,00	16,00	80,60
2:1		1,08	50	34,50	5,80	80,60

Влияние степени этерификации пектина изучали отдельно при содержании пироксикама 20 мг (таблица 4.3). При одинаковом соотношении пектина и зеина и сопоставимом количестве Ca^{2+} микросферы из низкометилированного яблочного пектина набухали значительно меньше, чем образцы на основе высокометилированного пектина. Это свидетельствует о влиянии степени этерификации на формирование и свойства гидрогелевой матрицы.

Так, при соотношении пектин/зеин 1:2 степень набухания микросфер на основе НМ-пектина составляла 5,25 %, тогда как для ВМ-пектина 26,14 % (таблица 4.3). Одновременно содержание пироксикама в микросферах на основе НМ-пектина было выше (66,00 % против 58,75 %), что свидетельствует об эффективном удержании лекарственного вещества.

Таблица 4.3. - З/П гидрогелевые микросферы на основе НМ и ВМ яблочных пектинов и их характеристика

З/П (массовое соотношение)	Тип пектина	M^{2+}, %		Рх, мг	Выход микросфер, %	Степень набухания	Содержание Рх, %
		Ca^{2+}	Zn^{2+}				
1:2	ВМ яблочный	1,78		20	26,50	26,14	58,75
1:1	–	2,57		20	36,30	27,74	32,50
6:1	–	3,52		20	43,90	30,16	39,00
1:2	НМ яблочный	1,78		20	30,90	5,25	66,00
1:1	–	2,57		20	33,90	8,94	61,10
1:1	–		1,62	20	25,00	16,71	71,50
6:1	–	3,52		20	29,30	22,70	70,20

Полученные различия связаны с содержанием свободных карбоксильных групп в структуре пектина. Учитывая, что содержание свободных карбоксильных групп в низкометилированном пектине больше, чем в высокометилированном, в результате сшивания двухвалентными катионами формируется плотная полимерная сеть (степень набухания от 5,25 до 22,70), которая ограничивает проникновение воды и уменьшает потери пироксикама при промывке микросфер. У высокометилированного пектина значительная часть карбоксильных групп этерифицирована, поэтому число участков, доступных для ионного сшивания, меньше. Это объясняет более высокую степень набухания полученных микросфер от 26,14 до 30,16%.

При соотношении пектин/зеин 6:1 содержание пироксикама также оставалось высоким и составляло 70,20%, однако степень набухания достигала 22,70%. Это показывает, что высокое содержание пироксикама не всегда сопровождается снижением способности микросфер к набуханию. Вероятно, при избытке пектина изменяется соотношение между гидрофильными и гидрофобными участками матрицы, что влияет на её взаимодействие с водой и удержание пироксикама.

Таким образом, результаты исследование показали, что свойства пектин-зеиновых микросфер зависят от соотношения полимеров, степени этерификации пектина, природы сшивающего катиона и количества вводимого пироксикама. Изменение состава и условий формирования полимерной матрицы позволяет регулировать свойства микросфер и соответственно выход лекарственного средства из них, что в свою очередь имеет значение для разработки систем доставки с контролируемым высвобождением ЛС в кишечнике. Фармакокинетические исследование высвобождения пироксикама в условиях *in vitro, ex vivo* и *in vivo* позволяют оценить поведение разработанных микросфер при прохождении через желудочно-кишечный тракт. Результаты этих исследований и анализ фармакокинетических параметров подробно рассмотрены в главе 6.

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЯ МОДУЛЯЦИИ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА

5.1. Исследование метаболизма микробиоты кишечника

В толстом кишечнике человека сосредоточено большое количество микроорганизмов, численность которых достигает 10^{11}–10^{12} клеток/мл [236, 237]. Кишечная микробиота участвует в расщеплении пищевых компонентов, которые не перевариваются собственными ферментами организма, в образовании ряда витаминов, превращении аминокислот и жёлчных кислот, а также в ферментации полисахаридов с образованием короткоцепочечных жирных кислот. Эти соединения участвуют в энергетическом обмене, поддержании функций кишечного эпителия и регуляции клеточных процессов, а другие продукты микробного метаболизма, в том числе производные триптофана, способны выполнять сигнальные функции и влиять на взаимодействие кишечной микробиоты с организмом человека [238, 239, 240, 241].

Образование микробных метаболитов зависит от структуры микробного сообщества и доступности питательных субстратов. Однако изучение этих процессов непосредственно в организме человека связано с определёнными трудностями, так как на состав кишечной микробиоты влияют питание, индивидуальные физиологические особенности и другие факторы, которые сложно контролировать независимо друг от друга. В лабораторных моделях *in vitro* поддерживается заданные условия культивирования, например состав питательной среды, pH, температура, отсутствие кислорода и продолжительность воздействия субстрата.

В настоящей работе для исследования влияния биополимеров на состав и метаболическую активность кишечной микробиоты использовали динамическую модель SHIME (Prodigest TWINSHIME) и биореакторы Eppendorf для изучения изменение микробного сообщества и образование КЦЖК при различных условиях культивирования. Особое внимание уделяли влиянию pH среды, сравнению однокамерных и трёхкамерных моделей

толстого кишечника, влияние пре– и пробиотиков, структурных характеристик пектинов на процессы микробной ферментации.

5.1.1. Сравнение альфа-разнообразия между однокамерной и трёхкамерной системами

Альфа-разнообразие определяли для просветных и слизистых микробных сообществ в однокамерном модуле толстого кишечника (SC), трёхкамерном модуле системы толстого кишечника толстой кишки (3C) и инокуляте. Использовали метрики разнообразия Шеннона для оценки равномерности, богатства таксонов для сравнения количества присутствующих таксонов и филогенетического разнообразия по Фейту (Faith's P.D.) для оценки биоразнообразия таксонов [242] (Рисунок 5.1).

«Результаты исследования показали расхождение во всех трёх метриках альфа-разнообразия между областями AC, TC и DC (восходящий, поперечный и нисходящий отделы) толстого кишечника в 3C системе, что было характерно как для просветных и для слизистых сообществ» [187]. Наименьший профиль разнообразия наблюдался в сообществах AC-области 3C системы (Рисунок 5.1). За исключением разнообразия по Шеннону для сообществ слизистой оболочки, сообщества DC демонстрировали наивысший профиль разнообразия в 3C системе, в то время как уровень разнообразия для сообществ TC-области занимал промежуточное положение между метриками AC и DC.

Сравнительно, сообщества в сосуде SC показывали уровень альфа-разнообразия, наиболее близкий к таковому у сообществ TC-области в 3C системе. Это лучше всего иллюстрируется просветными сообществами, где показатели SC и 3C статистически совпадали, то есть были значительно выше, чем в сообществах AC-области, и значительно ниже, чем в сообществах DC-области (Рисунок 5.1a). Аналогично, слизистые сообщества SC поддерживали уровень разнообразия по Шеннону и богатства таксонов, схожий с уровнями в слизистых сообществах TC и DC-областей 3C системы (Рисунок 5.1b).

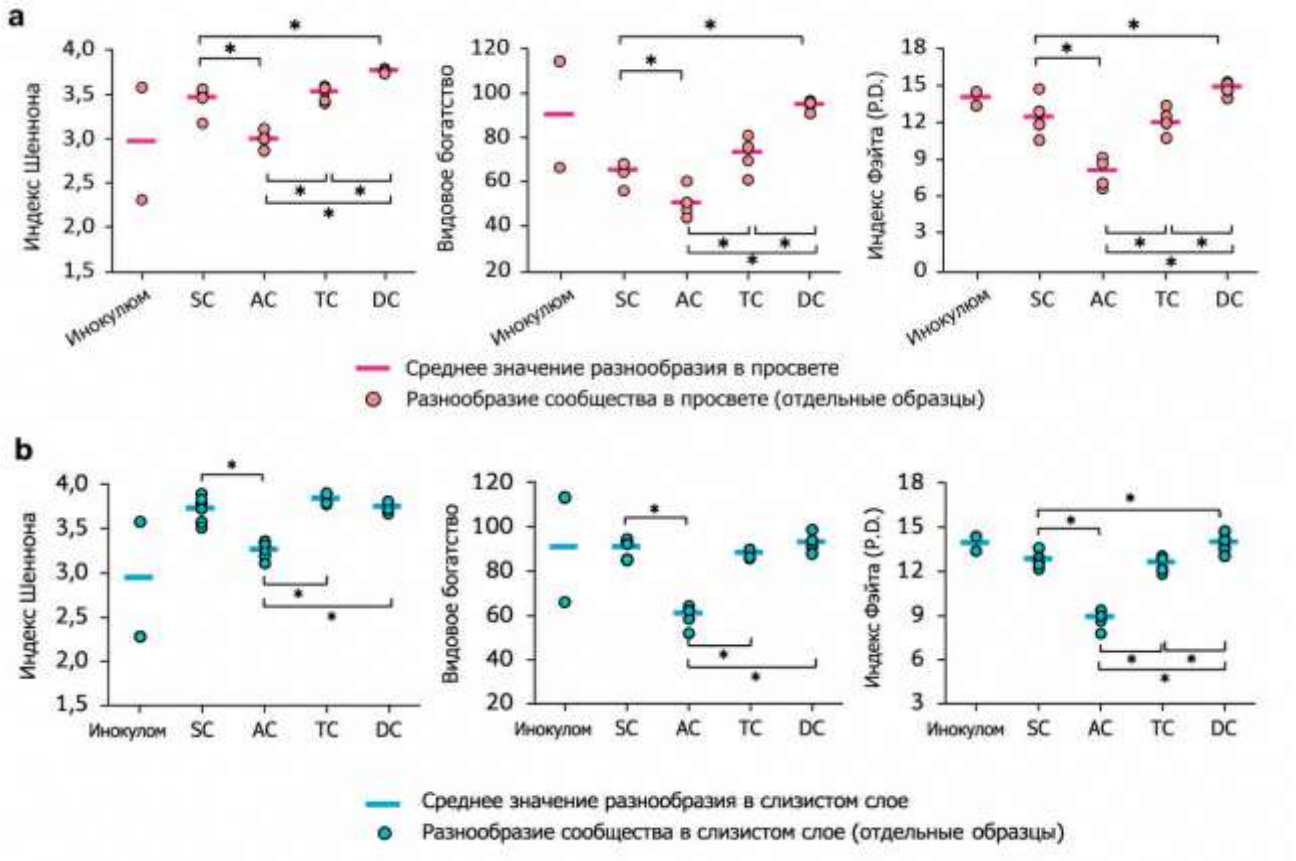


Рисунок 5.1. - Альфа-разнообразие для каждого сообщества, оценённое по показателям разнообразия Шеннона, богатства таксонов и филогенетического разнообразия по Фейту. Статистические различия между группами определялись с использованием ANOVA и t-теста Стьюдента. Значимыми считались только те различия, которые сохранялись после коррекции FDR методом Бонферрони и они отмечены символом *. a. Сообщества в просвете; b. Сообщества на слизистой оболочке

5.1.2. Отличие сообщества фекальной инокуляции внутри однокамерной и трёхкамерной модели толстого кишечника

Сообщества внутри 3C модели толстого кишечника были структурно схожи с фекальной инокуляцией и значительно отличались от SC модели толстого кишечника. Результаты анализа альфа-разнообразия показали, что сообщества, сформированные в SC и 3C-моделях, обладают сходными уровнями богатства таксонов, равномерности и биоразнообразия. Однако, этот анализ не предоставил информации о структурной гомологии этих сообществ.

Для сравнения филогенетической структуры сообществ и инокулята была проведена оценка с использованием PCoA на основе невзвешенных (количественных) и взвешенных (количественных и качественных) расстояний UniFrac (Рисунок 5.2).

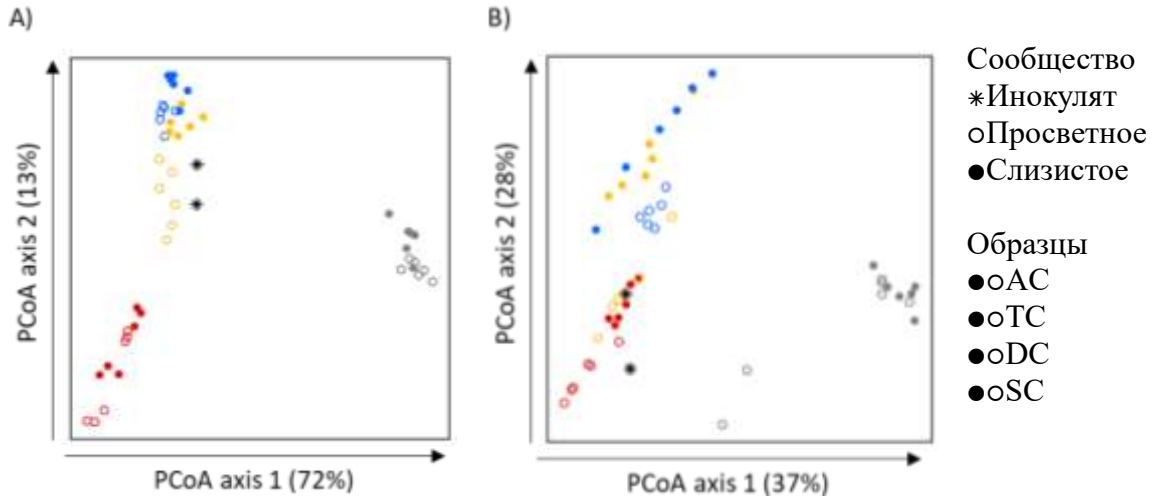
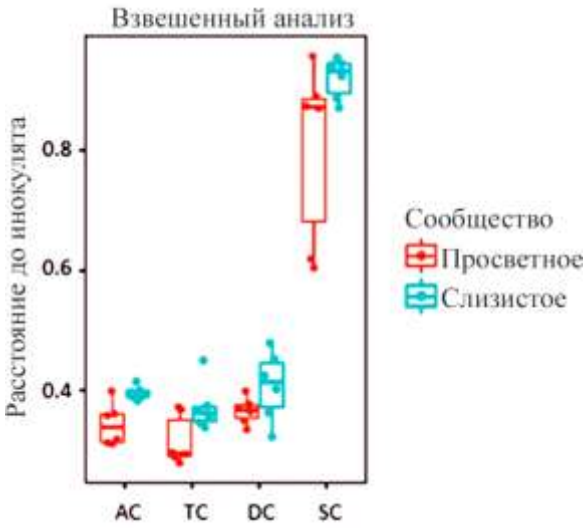


Рисунок 5.2. - Графики анализа главных координат, показывающие структуру сообществ на основе расстояний UniFrac. a. Невзвешенный анализ. b. Взвешенный анализ

Результаты показали значительное различие между сообществами в SC и 3C - системах, а также инокулятом. Различия составили 72% в невзвешенном анализе и 37% во взвешенном анализе по первой главной компоненте (Рисунок 5.2a и b). Ожидалось, что сообщества, сформированные из одного и того же исходного образца, будут более сходными, однако тест PERMANOVA на основе взвешенных расстояний UniFrac показал статистически значимые различия между сообществами SC и 3C – систем ($p = 0.002$).

Интересно, что во взвешенном анализе инокулят оказался ближе к сообществу AC в TC системе, чем к сообществам SC. Это было подтверждено сравнением взвешенных расстояний UniFrac для каждого сообщества относительно инокулята (Рисунок 5.3). Сообщества SC, как в просвете, так и на слизистой оболочке, статистически оказались значительно более удалёнными от инокулята, чем сообщества 3C (линейная модель, $p < 0.001$).



Тип образца	Сравнение	P-значение
Просветные	SC:AC	4,4e-09
	SC:TC	1,7e-09
	SC:DC	1,0e-08
Слизистые	SC:AC	7,3e-16
	SC:TC	3,1e-16
	SC:DC	1,1e-15

Рисунок 5.3. - Сравнение расстояний UniFrac между просветными и слизистыми сообществами для SC и 3C- системы относительно инокулята на основе взвешенного анализа. Значения p, полученные в результате анализа PERMANOVA, указаны в таблице ниже рисунка

Для сравнения состава *in vitro* сообществ с их инокулятами была составлена тепловая карта, отображающая средние значения для таксонов, присутствующих с относительной долей >0,001% хотя бы в одном сообществе (Таблица 5.1). Эта тепловая карта иллюстрировала сходства и различия между зрелыми просветными и слизистыми сообществами, развившимися *in vitro*, и фекальным инокулятом, что дает ключевую информацию о способности методов культивирования воспроизводить исходный материал.

Изменения между инокулятами и развившимися сообществами наиболее заметны в различной представленности трёх основных типов бактерий: *Bacteroidetes*, *Firmicutes* и *Proteobacteria*, а также доминирующих классов внутри каждого из них. В составе исходных инокулятов преобладали представители типа *Bacteroidetes* (класс *Bacteroidia*), относительная доля которых составляла 61,2 -67,9%. На *Firmicutes* (класс *Clostridia*) приходилось 28,6 - 35,4%, а содержание *Proteobacteria* (класс *β-Proteobacteria*) находилось в пределах 1,4-3,3%.

Таблица 5.1. - Тепловая карта, представляющая среднюю относительную численность на уровне типа (phylum) и класса (class) для каждого сообщества

		SC			3C							
Отдел	**Класс**	**Инокулюм**	**Просветные сообщества**	**Слизистые сообщества**	**Инокулюм**	**Просветные сообщества**			**Слизистые сообщества**			**Относительная распространённость**
						AC	**TC**	**DC**	**AC**	**TC**	**DC**	
Firmicutes	*Erysipelotrichi*	0.2	0.1	0.2	1.7	0.0	0.2	0.4	0.1	1.7	1.7	
	Clostridia	28.6	17.8	35.2	35.4	28.7	16.7	22.7	39.0	37.1	43.2	> 60
	Bacilli	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	0.2	0.1	0.1	50-60
Bacteroidetes	*Bacteroidia*	67.9	37.6	25.4	61.2	65.1	62.4	51.8	53.8	46.0	40.8	40-50
Proteobacteria	*BetaProteobacteria*	3.3	1.8	0.3	1.4	3.8	6.0	6.6	3.1	2.3	1.8	30-40
	DeltaProteobacteria	0.0	0.40	0.70	0.0	0.6	1.3	1.7	0.6	0.5	0.6	20-30
	GammaProteobacteria	0.0	23.8	11.4	0.0	1.6	1.0	1.5	0.7	0.1	0.2	10-20
Synergistetes	*Synergistia*	0.0	1.8	2.8	0.0	0.1	7.6	10.7	2.2	10.3	9.8	5-10
Fusobacteria	*Fusobacteriia*	0.0	16.6	23.7	0.0	0.0	4.5	3.9	0.1	1.6	1.7	1-5
Actinobacteria	*Coriobacteriia*	0.0	0.10	0.2	0.3	0.0	0.2	0.5	0.1	0.2	0.2	0.01-1
	Actinobacteria	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0-0.01
Verrucomicrobia	*Verrucomicrobiae*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Acidobacteria	*Acidobacteriia*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	

В просветных сообществах трёхкамерной системы (3С) в целом сохранялось преобладание тех же бактериальных групп, что и в исходном инокуляте. Доля *Bacteroidetes* (*Bacteroidia*) составляла 51,8-65,1%, а *Firmicutes* (*Clostridia*) - 16,7–28,7%. Вместе с тем относительное содержание отдельных таксонов различалось между отделами системы. Доля *Proteobacteria* в сообществах 3С была несколько выше, чем в исходном инокуляте, и составляла 3,8-6,6%. В поперечном (ТС) и нисходящем (DC) отделах увеличивалось содержание *Synergistetes* (класс *Synergistia*), достигая 7,6-10,7%. В этих отделах их относительная доля превышала содержание *Proteobacteria*. Здесь также отмечено увеличение численности *Fusobacteria* (класс *Fusobacteriia*), нехарактерное для исходного инокулята.

В однокамерной системе (SC) изменения состава микробного сообщества были более выраженными. Относительная доля *Bacteroidetes* (*Bacteroidia*) снижалась до 37,6%, а *Firmicutes* (*Clostridia*) - до 17,8%. Одновременно содержание *Proteobacteria* возрастало до 26,1%, а *Fusobacteria* - до 16,6%. При этом среди *Proteobacteria* преобладали представители класса *γ-Proteobacteria* (23,8%), тогда как в исходном инокуляте основную часть этого типа составляли *β-Proteobacteria*, доля которых достигала 3,3%. Это значительное различие в филогении соответствовало расхождению, наблюдаемому на графиках PCoA как для как невзвешенных, так и для взвешенных UniFrac-дистанций, представленных на рисунке 5.2.

Слизистые сообщества как в 3С-системе, так и в сосуде SC- системы продемонстрировали увеличение таксонов из группы *Firmicutes Clostridia* и уменьшение доли *Bacteroidetes Bacteroidia*, что было сходно с ранее опубликованными результатами [187]. Однако, эти сообщества в конечном итоге оставались различными друг от друга, как показано на рисунке 5.2; слизистое сообщество SC-системы имело меньше общего с инокулятом, что проиллюстрировано на рисунке 5.3. Наибольшие различия между слизистыми сообществами SC, 3С-системы и инокулятом, заключались в увеличении распространенности *Fusobacteria Fusobacteriia* в SC - системе и *Synergistetes*

Synergistia в областях TC и DC 3C-системы. Следует отметить, что увеличение *Fusobacteria* в слизистых сообществах по сравнению с просветными сообществами 3C-системы было ожидаемо, так как данный таксон является связанным со слизистой членом микробиоты кишечника [243, 244].

Результаты, представленные в таблице 5.1, были сходны с теми, которые наблюдались в других экспериментах, где применялось использование конструкции сосуда SC- и 3C-системы для культивирования микробиоты кишечника случайных доноров [206]. Применение конструкции сосуда SC на трёх случайных донорах также привело к уменьшению количества *Bacteroidia*, *Clostridia* и *β-Proteobacteria*, с резким увеличением *γ-Proteobacteria*, *Synergistia* и *Fusobacteriia* по сравнению с инокулятом [206]. Сообщества, развитые с использованием конструкции 3C системы для трёх случайных доноров, показали ярко выраженные региональные различия: уровень *Bacteroidia* был выше в AC и снижался в DC - области, а уровни *Proteobacteria* и *Verrucomicrobia*е систематически увеличивались по сравнению с инокулятом [206]. Эти изменения происходили независимо от состава фекального инокулята как для просветных, так и для слизистых образцов, что подтверждает предположение о том, что тип применяемой платформы культивирования играет определяющую роль в развитии сообщества.

5.1.3. Значимые различия в структуре сообществ между двумя методами культивирования

Семейства в сообществах SC- и 3C-систем с относительной численностью более 0,1 %, были подвергнуты сравнительному анализу и для них была определена статистическая значимость (Рисунок 5.4). Для просветных сообществ только семейства *Fusobacteriaceae*, *Alcaligenaceae* и *Xanthomonadaceae* показали значительные различия между сосудом SC и всеми тремя региональными сообществами системы 3C (Рисунок 5.4a) [242].

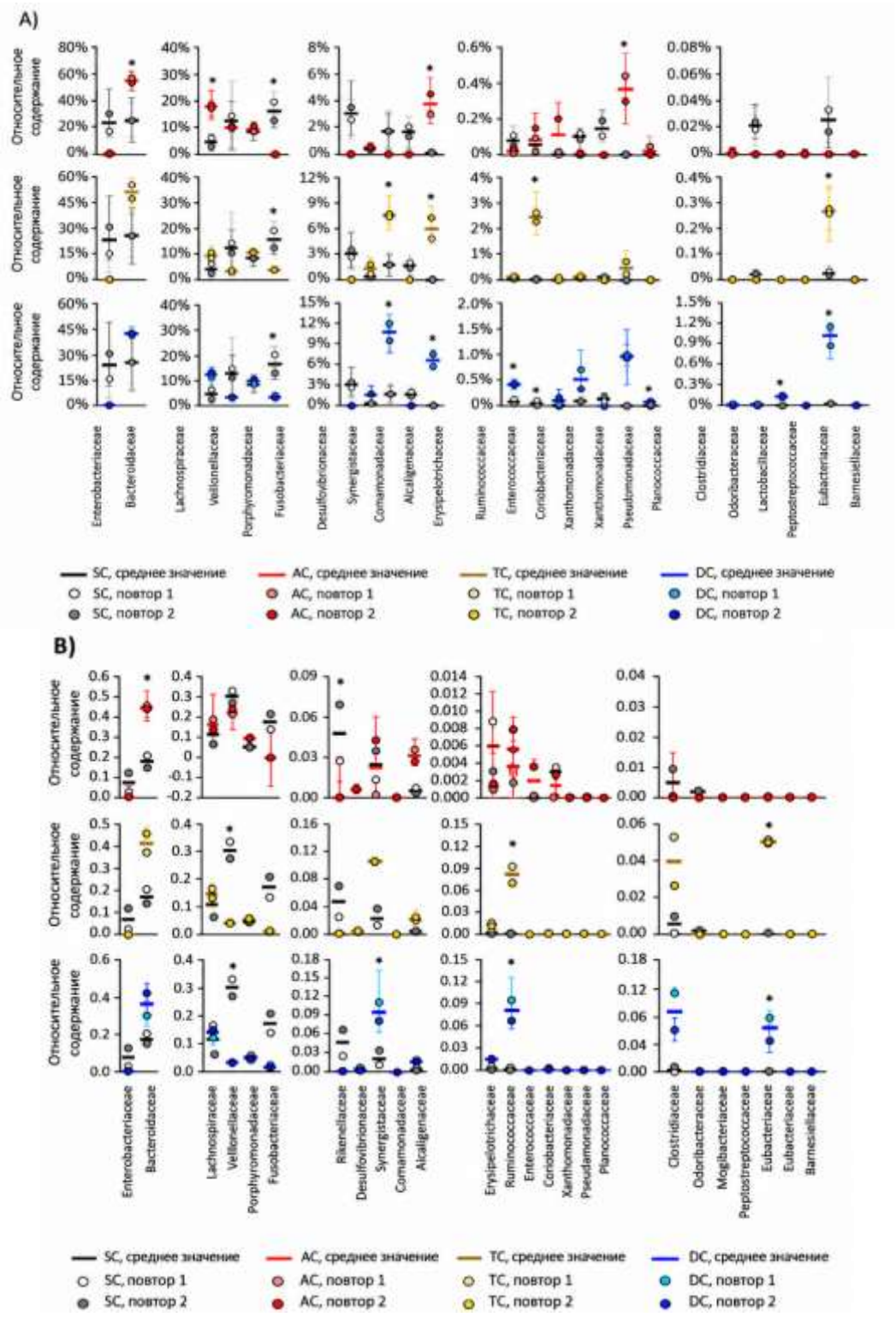


Рисунок 5.4. - Состав сообществ в SC и 3C на уровне семейств. Отображены семейства с относительной численностью 0,1 % или более. Различия между сообществами считались статистически значимыми при p< 0,05, рассчитанном с использованием t-теста Стьюдента с корректировкой по методу Бенджамини-Хохберга, и обозначены символом *. a – Просветные сообщества; b – Слизистые сообщества

По сравнению с просветными сообществами сосуда SC, семейства *Lachnospiraceae* и *Pseudomonadaceae* имели значимо более высокую численность только в области AC, семейства *Synergistaceae* и *Ruminococcaceae* были значимо выше в областях TC и DC, а семейства *Erysipelotrichaceae*, *Planococcaceae* и *Mogibacteriaceae* - только в области DC. Из всех этих значительных изменений только *Fusobacteriaceae* и *Xanthomonadaceae* были представлены в большем относительно большем количестве в сосуде SC по сравнению с сообществами системы 3C. Все остальные семейства имели более высокую численность в системе 3C.

Результаты, представленные в Таблице 5.1, показали, что в инокуляте и сообществах системы 3C доминирующим классом *Proteobacteria* был *β-Proteobacteria*, в то время как в сосуде SC крупнейшим классом *Proteobacteria* был *γ-Proteobacteria*. Это различие также наблюдалось на уровне семейств между просветными сообществами сосуда SC и системы 3C (Рисунок 5.4). В сосуде SC доминирующим семейством *γ-Proteobacteria* было *Enterobacteriaceae*, в то время как в системе 3C доминирующим семейством *β-Proteobacteria* было *Alcaligenaceae*. Однако из-за вариаций различие в содержании *Enterobacteriaceae* между группами не достигло статистической значимости. Аналогично просветным сообществам, между слизистыми сообществами в сосуде SC и системе 3C наблюдалось значительное количество различий.Семейства *Enterobacteriaceae*, Bacteroidaceae, *Fusobacteria*ceae, *Rikenellaceae* и *Alcaligenaceae* значительно различались между сосудом SC и всеми тремя областями толстого кишечника в системе 3C (Рисунок 5.4b). Семейство *Enterococcaceae* различалось только между сосудом SC и областью AC системы 3C, в то время как *Veillonellaceae, Erysipelotrichaceae, Ruminococcaceae* и *Eubacteriaceae* демонстрировали различия только между сосудом SC и областями TC и DC толстого кишечника. В отличие от просветных сообществ, в сосуде SC было обнаружено большее количество семейств, представленных более высокой, численностью по сравнению с системой 3C. К ним относятся *Enterobacteriaceae, Veillonellaceae, Fusobacteriaceae* и *Rikenellaceae.*

5.1.4. Сравнительный анализ метаболитов сообщества однокамерной и трёхкамерной модели

Функциональная активность сообществ оценивалась путём количественного анализа и сравнения КЦЖК, обнаруженных в однокамерной и трёхкамерной системах толстого кишечника (Рисунок 5.5) [242]. Следует отметить, что содержание КЦЖК в инокуляте не учитывалось, так как известно, что фекалии не точно отражает уровни КЦЖК в толстой кишке из-за их поглощения клетками млекопитающих и микробов [187, 245]. Согласно результатам данного анализа, уровни общих КЦЖК увеличивались последовательно в различных областях системы 3C (Рисунок 5.5a) [187, 207].

В сравнении с системой 3C, SC-система содержала значительно более низкие уровни общих КЦЖК (58,23 ммоль/л), что существенно меньше, чем в любой из областей системы 3C (82,35–110,39 ммоль/л). Соответственно, индивидуальные количества уксусной, пропионовой и масляной кислот были значительно ниже в SC- по сравнению с 3C-системой (Рисунок 5.5b).

При анализе соотношений этих трёх кислот в каждом из исследуемых сообществ оказалось, что доля уксусной кислоты была схожей для всех сообществ (0,63–0,65) (Рисунок 5.5c). Однако соотношение пропионовой кислоты было выше в SC - системе (0,24) по сравнению с 3C – системой (0,20–0,21), а доля масляной кислоты была выше в кислой области AC (0,16) в сравнении с TC- и DC- областями (0,15) и сосудом SC - системы 3C (0,12).

В SC было обнаружено интересное большое количество пентановой кислоты (2,51 ммоль/л); этот показатель значительно выше уровней, обнаруженных в любой из областей 3C (0,11–0,69 ммоль/л) (Рисунок 5.6a) [242]. Причина такого увеличения остаётся неизвестной, однако данное изменение повлияло на соотношение КЦЖК, найденных в каждой системе. У человека уксусная, масляная и пропионовая кислоты, как сообщается, составляют 90–95% от общего количества КЦЖК, выделяемых микробиотой кишечника [246].

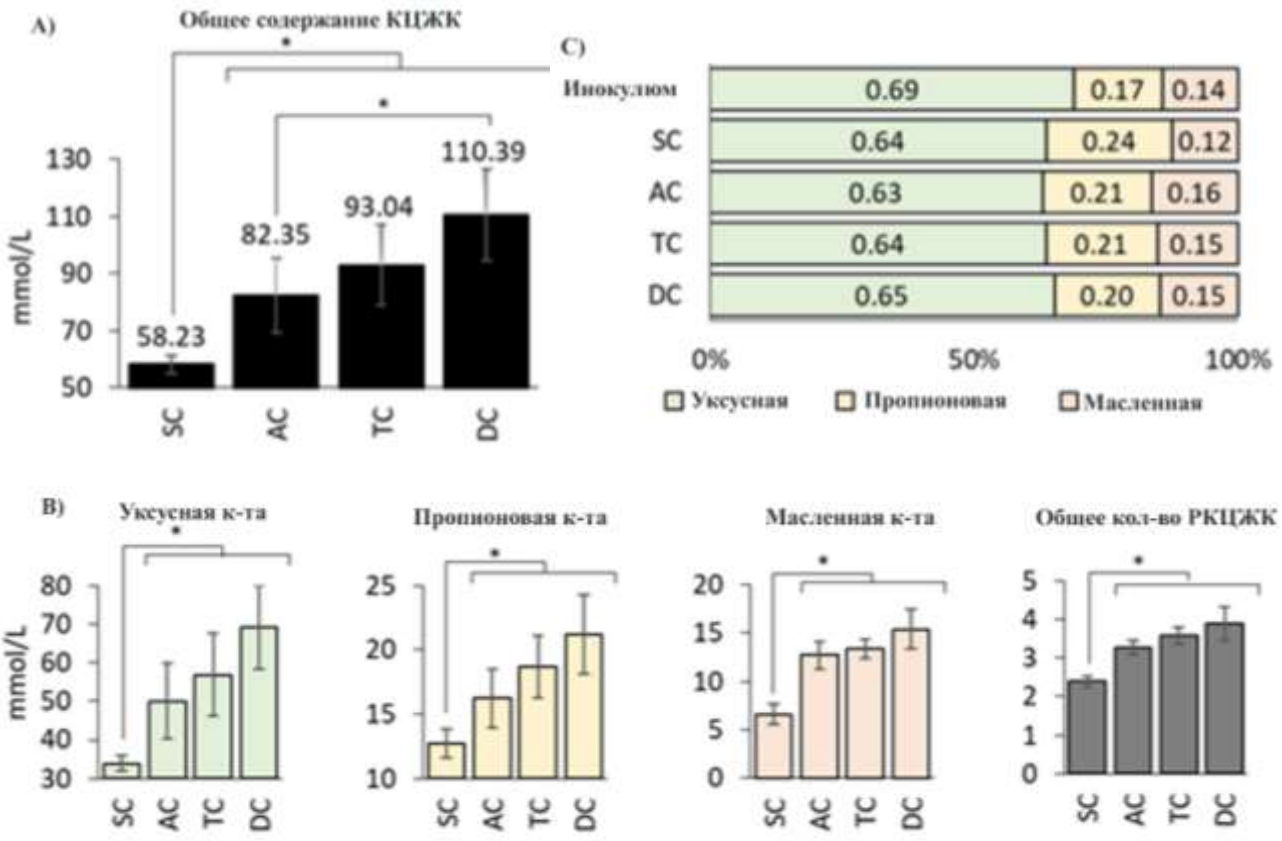


Рисунок 5.5. - Количественные уровни КЦЖК для каждого сообщества. Статистические различия между группами определялись с использованием ANOVA и t-критерия Стьюдента. Значимыми считались только те различия, которые прошли коррекцию FDR по методу Бонферрони и отмечены символом *. a. Общие количества КЦЖК. b. Уровни уксусной, пропионовой и масляной кислот. c. Соотношение уксусной: пропионовой: масляной кислот

В регионах AC, TC и DC системы 3C, уксусная, масляная и пропионовая кислоты составляли примерно 95,75 % от общего количества КЦЖК, в то время как РКЦЖК составляли 3,85 %, а пентановая кислота 0,40 % (Рисунок 5.6b). Напротив, в однокамерной системе уксусная, пропионовая и масляная кислоты составляли 91,51 % от общего количества КЦЖК, РКЦЖК составили 4,10 %, а пентановая кислота 4,31 %. Несмотря на то что общее содержание РКЦЖК в однокамерной системе (SC) было значительно ниже, чем в трёхкамерной (3C), их относительная доля в составе метаболитов исследуемых сообществ оставалась близкой.

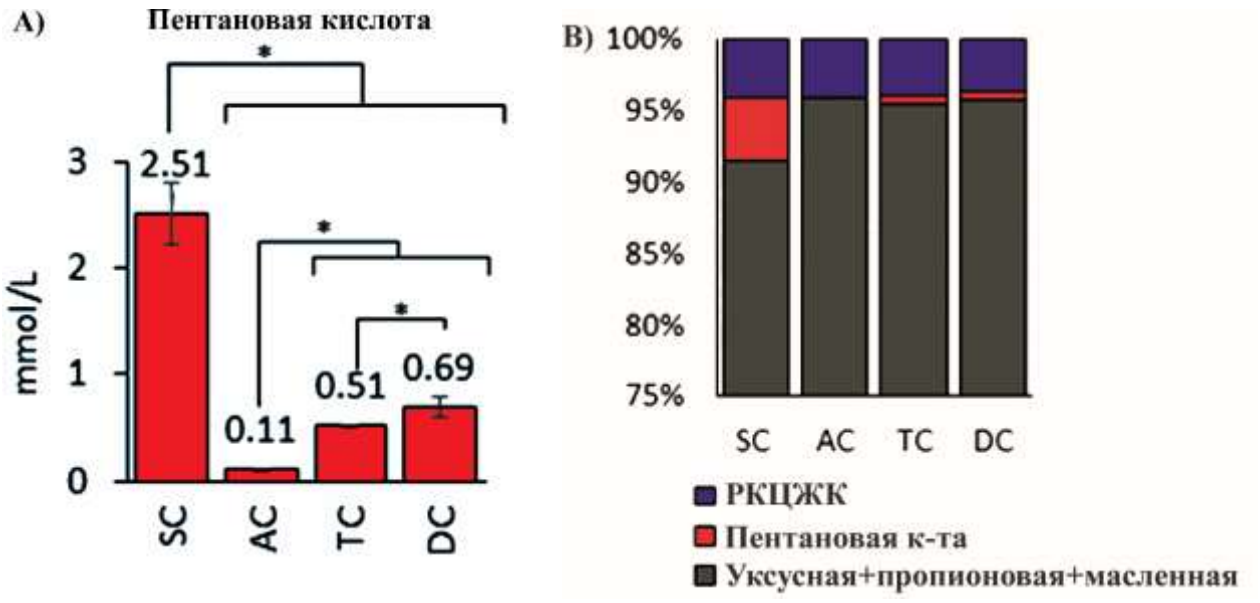


Рисунок 5.6. - Уровни пентановой кислоты и разветвлённых короткоцепочечных жирных кислот (РКЦЖК). Статистические различия между группами были определены с использованием ANOVA и t-тестов Стьюдента. Только различия, которые сохранили значимость после коррекции на уровень ложных открытий по методу Бонферрони, считались значимыми и отмечены символом * a) Уровень пентановой кислоты в каждом сообществе. b) Процентный состав уксусной + пропионовой + масляной кислот, пентановой кислоты и РКЦЖК

5.1.5. Ключевые факторы и различия в окружающих условиях, влияющие на дивергенции сообществ

В данной части исследования сравнивали две модели культивирования кишечной микробиоты, оценивая состав микробных сообществ и их метаболическую активность. В качестве первой модели использовали однокамерную систему Eppendorf (SC), а в качестве второй — трёхкамерную систему SHIME (3C), состоящую из отделов, моделирующих восходящую (AC), поперечную (TC) и нисходящую (DC) части толстой кишки.

Полученные результаты исследования показали, что условия культивирования влияют как на структуру микробных сообществ, так и на образование короткоцепочечных жирных кислот. Основные различия между

системами были связаны с уровнем pH и доступностью питательных веществ. В литературе известно, что эти факторы играют важную роль в формировании микробных сообществ в различных отделах кишечника *in vivo* [247, 248]. В трёхкамерной системе pH постепенно повышался от AC к TC и DC, тогда как количество доступных питательных веществ уменьшалось по мере их последовательного прохождения через камеры [187, 208]. В однокамерной системе градиент pH отсутствовал, а условия культивирования не предусматривали последовательного снижения доступности питательных веществ.

Связанным с доступностью питательных веществ, но также рассматриваемым как третье различие между этими экспериментальными установками, было транзитное время, или время задержки сообщества. Для 3C-системы общее время транзита, учитывающее все три секции кишечника, составляло 72 часа, тогда как в SC-модели это время составляло 40 часов [187, 249]. Результаты данного исследования показали, что следствием этих комбинированных различий стало формирование различных микробных сообществ кишечника.

С точки зрения метрик альфа-разнообразия, протестированных в данном исследовании, сообщества SC-модели поддерживали уровень разнообразия, схожий с таковым в TC- и DC-секциях 3C-системы (Рисунок 5.1).

Сходство показателей альфа-разнообразия между микробными сообществами однокамерной системы (SC) и нисходящего отдела (DC) трёхкамерной системы (3C), вероятно, связано с близкими значениями pH. В SC-системе pH поддерживался в пределах 6,9–7,1, а в DC-секции - 6,6–6,9. Оба диапазона близки к нейтральным значениям и сопоставимы с показателями, характерными для дистального отдела толстой кишки человека [250].

Несмотря на одинаковый состав поступавших питательных веществ, микробные сообщества SC-системы и восходящего отдела (AC) трёхкамерной модели существенно различались по всем исследованным показателям альфа-разнообразия. Это указывает на возможную роль pH в формировании микробных

сообществ. В исследованных условиях более высокие значения pH сопровождались увеличением альфа-разнообразия, хотя влияние доступности питательных веществ также нельзя исключать.

Показатели альфа-разнообразия SC-системы были сопоставимы с результатами, полученными для TC- и DC-секций трёхкамерной модели. Однако анализ невзвешенных и взвешенных расстояний UniFrac методом главных координат (PCoA) выявил различия в таксономическом составе сообществ и относительной численности микроорганизмов (рисунок 5.2). По результатам сравнения с исходным фекальным инокулятом наибольшие изменения наблюдались в сообществах SC-системы (рисунок 5.3).

В то же время микробные сообщества AC-секции по своему составу оказались ближе к исходному инокуляту, чем сообщества SC-системы. Это представляет интерес, поскольку в AC поддерживалась более кислая среда (pH 5,6–5,9) и отмечались самые низкие показатели альфа-разнообразия. В SC-системе при pH 6,9–7,1 альфа-разнообразие было сопоставимо с показателями TC, DC и исходного инокулята, несмотря на более выраженные различия в составе микробных сообществ.

Одним из возможных объяснений является различие условий культивирования, прежде всего времени пребывания содержимого в системе и доступности питательных веществ. Время транзита в SC составляло 40 часов, тогда как в AC-секции трёхкамерной системы 20 часов. Более продолжительное пребывание микробного сообщества в однокамерной системе могло повлиять на его состав и относительную численность отдельных бактериальных групп.

Возможно, увеличенное время прохождения в SC-модели позволило развиваться таксонам, которые не смогли бы закрепиться в AC-отделе 3C-системы из-за более быстрого потока, а те таксоны, которые не нашли своей ниши в AC-области, были вымыты [248]. Значительное расстояние, отображённое на графике PCoA невзвешенных UniFrac-дистанций между инокулятом и сообществом SC-модели, указывает на то, что вымытые таксоны в

АС-области 3С-системы находились ниже предела обнаружения в фекальном инокуляте.

Однако, рост таксонов в SC мог быть обусловлен доступностью питательных веществ. В условиях *in vivo* субстраты, которые не могут быть переварены и усвоены в тонком кишечнике, попадают в толстый кишечник и движутся продольно от проксимального к дистальному участку. Жизнеспособность питательных веществ была определена как важный фактор, ограничивающий рост микробов в толстом кишечнике [251]. В экспериментальном дизайне SC-сообщество получало питательные вещества, которые были недоступны или доступны только в небольших количествах в дистальном отделе кишечника. Возможно, этот приток питательных веществ обеспечил необходимые ресурсы для поддержки роста таксонов, присутствующих в невыявляемых количествах в фекальном инокуляте, которые не могли развиваться в кислой среде АС – отдела.

5.1.6. Исследование структуры сообщества в однокамерной и трёхкамерной моделях

Таксономическая оценка *in vitro* сообществ по сравнению с инокулятом предоставила информацию о том, какие таксоны сохранились из исходного материала при использовании альтернативных условий культивирования. Хотя не предполагалось, что любая из методик культивирования сможет полностью воспроизвести инокулят из-за отсутствия компонентов живого организма в *in vitro* модели [187, 207, 207], 3С-модель, на основании собранных данных, показала большую схожесть с инокулятом, чем SC-система. Это оказалось справедливым как для просветных, так и для слизистых сообществ 3С-системы, которые по своему составу были ближе к инокуляту, что наблюдалось на графиках PCoA (Рисунок 5.2), и состояли из таксонов, аналогичных инокуляту, как с точки зрения филогенетики, так и уровней относительной численности (Таблица 5.1).

Ожидалось, что слизистые сообщества не будут поддерживать значительное сходство с инокулятом, так как использованный инокулят был

обработан из фекальной пробы, которая состоит в основном из просветного содержимого, а не слизистого слоя толстой кишки [187]. Хотя представленные данные получены от одного донора, другие эксперименты, проводившиеся с использованием SC и 3C-моделей, инокулированных материалом от случайных доноров, показали аналогичные результаты [206].

Однако сравнение *in vitro* сообществ с инокулятом было несколько некорректным, так как инокулят не подвергался культивированию и, следовательно, являлся другим типом образца. В этом случае сравнение двух сообществ, сформировавшихся при разных методах культивирования *in vitro*, считалось более подходящим. Поэтому бета-разнообразие было дополнительно оценено путем сравнения зрелых сообществ, сформировавшихся в SC- и 3C-моделях, друг с другом с точки зрения относительной численности на основе секвенирования гена 16S рРНК.

Сравнительный анализ выявил различия в таксономическом составе микробных сообществ SC- и 3C-систем. В просветных сообществах статистически значимые различия отмечены для семейств *Fusobacteriaceae*, *Alcaligenaceae* и *Xanthomonadaceae*. В слизистых сообществах они наблюдались для *Enterobacteriaceae*, *Bacteroidaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Rikenellaceae* и *Alcaligenaceae* (рисунок 5.4b).

Наиболее выраженные различия между слизистыми сообществами двух систем обнаружены на уровне отдельных семейств. Относительная численность *Bacteroidaceae* была выше в 3C-системе, тогда как *Rikenellaceae* преобладали в SC. Оба семейства относятся к типу *Bacteroidetes*, классу *Bacteroidia*. Среди представителей типа *Firmicutes* (класс *Clostridia*) семейство *Veillonellaceae* было более многочисленным в слизистых сообществах SC по сравнению с TC- и DC-секциями трёхкамерной системы. Напротив, *Ruminococcaceae* и *Eubacteriaceae* имели более высокую относительную численность в TC и DC.

Полученные данные показывают, что при использовании разных способов культивирования сообщества сохраняли представителей одних и тех же крупных таксономических групп, но различались по составу и соотношению отдельных

семейств. Это согласуется с результатами анализа главных координат (PCoA), представленными на рисунке 5.2, где наблюдалось разделение микробных сообществ SC- и 3C-систем.

Наиболее существенные изменения в составе доминирующих таксонов отмечены при сравнении просветных сообществ SC с исходным фекальным инокулятом. Различия в относительной численности бактерий на уровне типов и классов свидетельствуют о том, что условия однокамерного культивирования не обеспечивали сохранения исходной таксономической структуры микробного сообщества.

Аналогично, для слизистых сообществ было заключено, что различия в доминирующих таксонах между слизистыми сообществами SC-системы и инокулятом, в частности появление *γ-Proteobacteria*, стали причиной дивергенции, показанной на рисунке 5.2.

5.1.7. Зависимость уровня короткоцепочечных жирных кислот от применяемой методики культивирования

Одной из основных функций кишечной микробиоты является ферментация неперевареных растительных полисахаридов с образованием короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), которые участвуют в регуляции ряда физиологических процессов [207, 245, 246]. В настоящем исследовании метаболическую активность микробных сообществ оценивали по содержанию КЦЖК. Установлено, что в однокамерной системе (SC) их образовывалось значительно меньше, чем в трёхкамерной (3C) (рисунок 5.5).

При этом SC-система и восходящий отдел (AC) трёхкамерной модели получали одинаковые питательные компоненты, но частота их поступления различалась. Для поддержания заданного времени транзита питательную среду в AC подавали в два раза чаще, чем в SC. Это могло повлиять на общее количество образующихся КЦЖК. Вместе с тем различия в их содержании, вероятно, были связаны не только с режимом питания, но и с составом сформировавшихся микробных сообществ.

В расщеплении растительных полисахаридов участвуют ферменты, относящиеся к семействам гликозид-гидролаз (GH) и полисахарид-лиаз (PL). Они входят в группу углевод-активных ферментов (CAZymes) и обеспечивают расщепление сложных углеводов до соединений, которые микроорганизмы используют в процессе ферментации с последующим образованием КЦЖК [246, 252]. Представители типа *Bacteroidetes*, особенно рода *Bacteroides* семейства *Bacteroidaceae*, обладают широким набором генов, кодирующих GH и PL [246]. Разнообразные гены CAZymes обнаружены также у представителей родов *Eubacterium* (*Eubacteriaceae*), *Ruminococcus* (*Ruminococcaceae*) и *Roseburia* (*Lachnospiraceae*) [252, 253].

В сообществах 3C-системы относительная численность этих бактериальных групп была выше, чем в SC, что связанно с активной ферментации полисахаридов и образованию КЦЖК. Подобная зависимость между составом микробных сообществ, их генетическим потенциалом и продукцией КЦЖК при сравнении AC, TC и DC отделов трёхкамерной модели кишечника была отмечена авторами [208].

По нашим данным, на образование отдельных КЦЖК влияло повышение или снижение pH. Основными продуктами бактериальной ферментации в обеих системах являлись уксусная, пропионовая и масляная кислоты [246]. Уксусная кислота образовался в широком диапазоне pH, а образование пропионовой кислоты было в близко к нейтральной pH. Для ряда бактерий, продуцирующих масляную кислоту, благоприятной была слабокислая среда, в частности при pH 5,5 [254]. При повышении pH усиливались процессы ферментации белковых субстратов, которые сопровождались образованием разветвлённых короткоцепочечных жирных кислот [255]. Влияние изменения уровня pH среды на структуру сообщества микробиоты кишечника и производство короткоцепочечных жирных кислот

5.1.8. Влияние изменения уровня pH среды на альфа-разнообразие

В данной части исследования кишечную микробиоту независимых трёх доноров культивировали *in vitro* в TWINSHIME. Для каждого донора

использовали три биореактора: с нейтральным значением pH 7,0, повышенное +0.5 и +1,0 или пониженное -0,5 и -1,0. Отобранные пробы через определенные промежутки времени анализировали на изменения состава микробных сообществ методом секвенирования гена 16S рРНК и методом ГХ-МС их метаболическую активность по содержанию КЦЖК в системе.

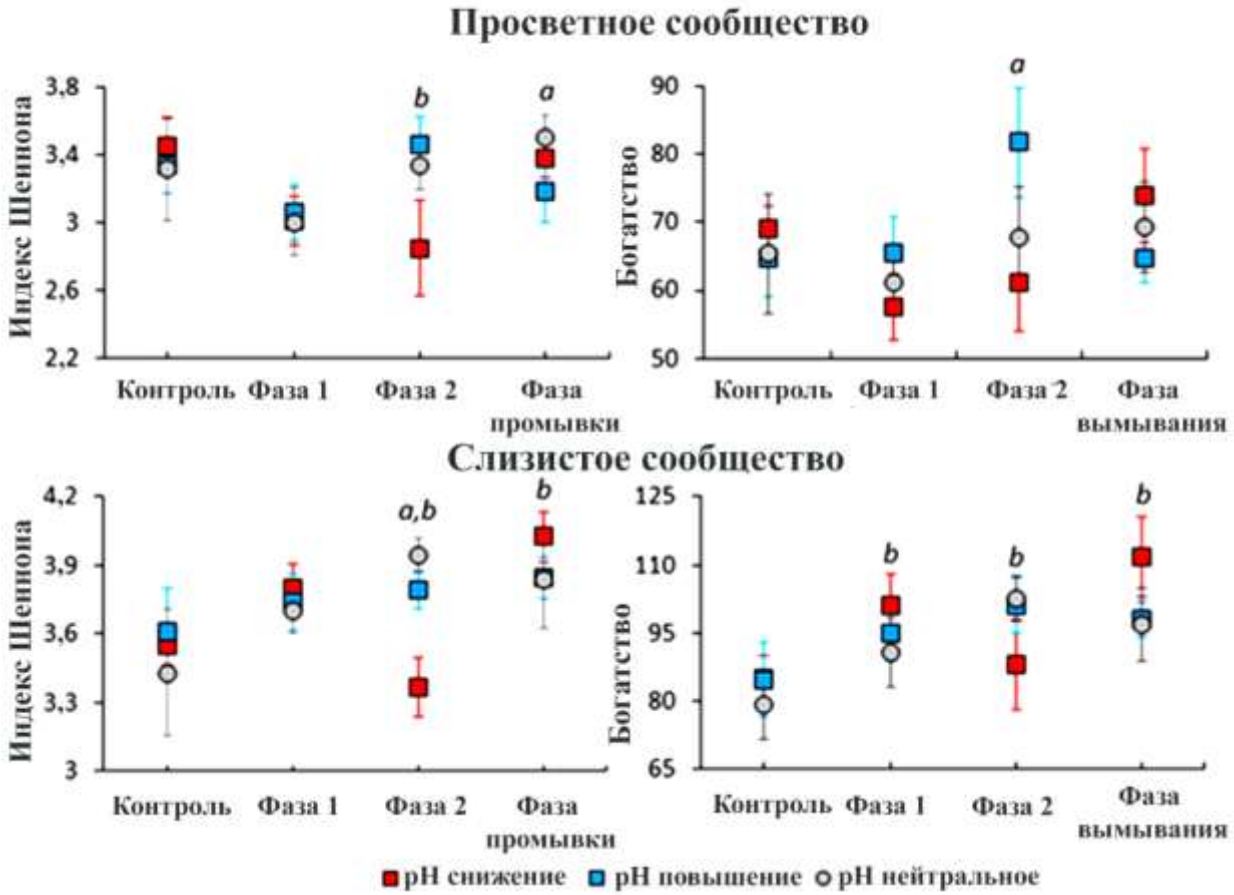


Рисунок 5.7. - α-разнообразие (A) просветных и слизистых (B) микробных сообществ по индексу Шеннона и видовому богатству. Значимые различия определены с помощью линейной модели со смешанными эффектами: a - повышенный pH и b - пониженный pH относительно нейтрального соответственно.

α-разнообразие просветных и слизистых микробных сообществ по видовому богатству и индексу Шеннона, статистическую значимость изменений с учётом индивидуальных различий между донорами приведены на рисунке 5.7. как видно из рисунка при изменении pH на ±0,5 единицы существенных изменений показателей α-разнообразия не наблюдалось. При снижении pH с 6,9–7,0 до 5,9–6,1 или повышение до 7,9–8,1, во второй фазе наблюдали

статистически значимые изменения в просветных сообществах. Например, повышение pH увеличило видовое богатства (q = 0,0059), снижение pH уменьшил индекс Шеннона (q = 0,0002). Слизистые сообщества реагировали на повышении pH снижением индекса Шеннона (q = 0,021), при понижении pH индекс Шеннона (q = 0,00001) и видовое богатство (q = 0,0002).

5.1.9. Влияние изменения pH на структуру сообщества и количество определенных таксонов в независимости от донора

Оценка α-разнообразия проводили по анализу главных координат PCoA с невзвешенным и взвешенным расстояниям UniFrac, а методом PERMANOVA статистическую значимость различий между группами, которые приведены на рисунке 5.8. По невзвешенному UniFrac обнаружили статистически значимые различия между группами в просветных и слизистых микробных сообществах в обеих экспериментальных фазах (рисунок 5.8A). В период восстановления различия в просветных сообществах исчезли, а в слизистых сообществах сохранялись до конца эксперимента. Стоит отметить, что независимо от направления изменения pH, в период восстановления значимые различия наблюдались в обеих экспериментальных фазах и в просветных сообществах результаты анализа взвешенного UniFrac отличались (рисунок 5.8B). В слизистых сообществах при повышении pH различия выявлялись только во второй фазе, а при понижении pH они присутствовали уже на контрольном этапе и сохранялись на протяжении обеих фаз эксперимента. Сопоставление двух вариантов UniFrac показывает, что изменения затрагивали присутствие отдельных филогенетических групп и их относительную представленность. При этом характер различий зависел от типа микробного сообщества, фазы эксперимента и направления изменения pH.

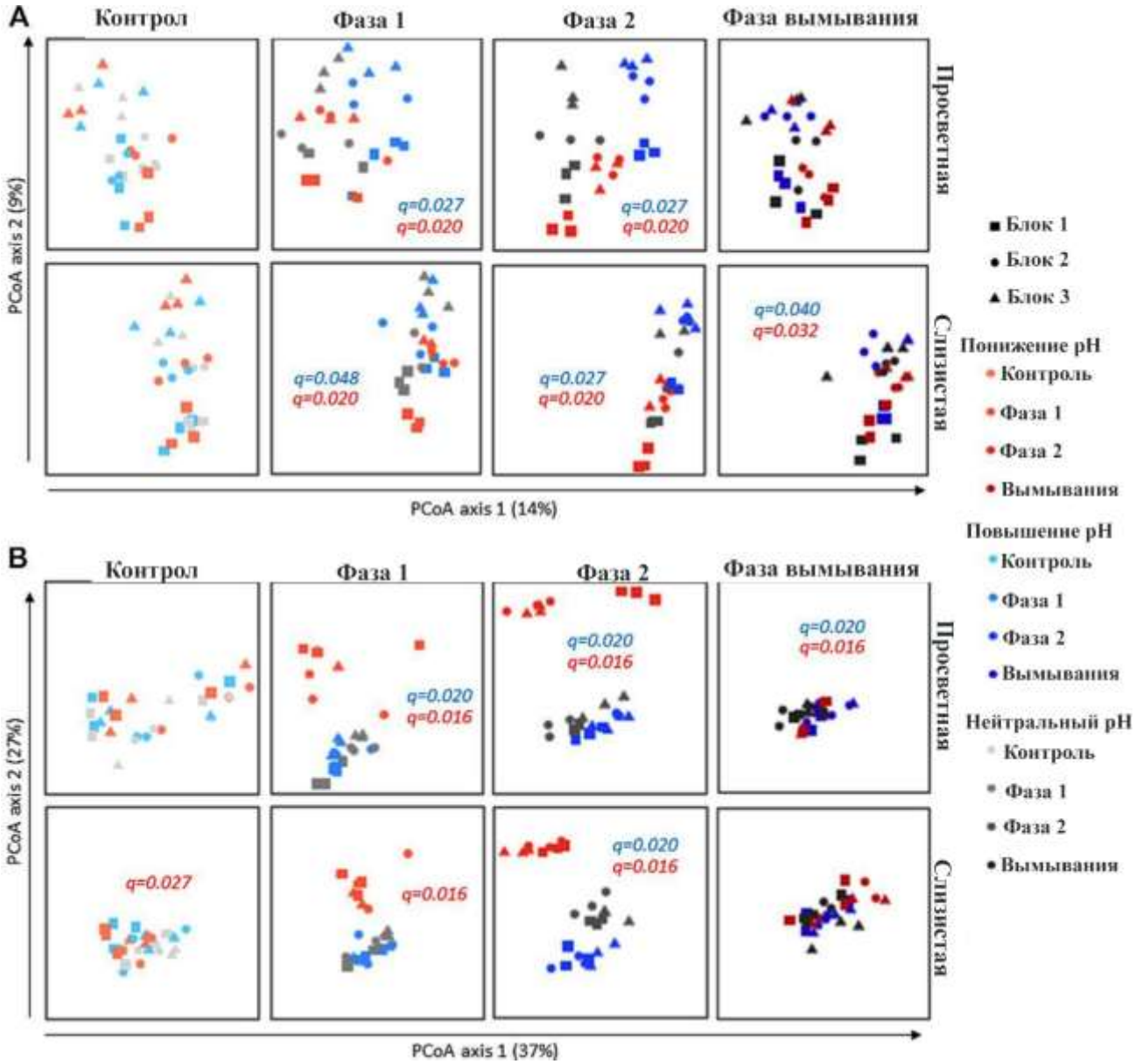


Рисунок 5.8. - Анализ главных координат (PCoA) просветных и мукозо-ассоциированных сообществ по невзвешенному (A) и взвешенному (B) UniFrac. Значимые различия по PERMANOVA (q): синий - пониженный pH, красный - повышенный pH относительно нейтрального.

Определения таксонов, численность которых изменялась при различных значениях pH, проводили с использованием результатов секвенирования гена 16S рРНК. Статистическую оценку проводили с помощью линейной модели со смешанными эффектами, учитывающей индивидуальные различия между донорами. Результаты для просветных и слизистых сообществ на контрольном этапе, в первой и второй фазах, а также в период восстановления представлены на рисунке 5.9.

Всего выявлено 27 таксонов, относящихся к типам *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Synergistetes*, *Verrucomicrobia* и *Proteobacteria*, относительная численность которых изменялась в ответ на повышение или снижение pH независимо от донора.

В просветных сообществах повышение pH сопровождалось изменением численности ряда представителей типа *Firmicutes* (рисунок 5.9А). В обеих фазах увеличивалось содержание *Enterocloster* и *Oscillospira*, относящихся к семейству *Lachnospiraceae*, а также *Erysipelatoclostridium* из семейства *Erysipelotrichaceae*. Во второй фазе дополнительно возрастала относительная численность *Clostridium* (*Clostridiaceae*), *Blautia* (*Lachnospiraceae*), *Ruminococcus* (*Ruminococcaceae*) и *Eubacterium* (*Erysipelotrichaceae*). Среди исследованных представителей *Firmicutes* снижение численности при повышенном pH отмечено только для *Megasphaera* (*Veillonellaceae*).

Во второй фазе эксперимента повышение pH также сопровождалось увеличением относительной численности *Alistipes* (*Rikenellaceae*) и *Bilophila* (*Desulfovibrionaceae*). Напротив, содержание *Collinsella* (*Coriobacteriaceae*), *Synergistes* (*Synergistaceae*) и *Shigella* (*Enterobacteriaceae*) снижалось.

При понижении pH изменения таксономического состава были более выраженными. Во второй фазе наблюдалось значительное снижение относительной численности нескольких представителей типа *Bacteroidetes*, включая *Butyricimonas* (*Odoribacteraceae*), *Alistipes* (*Rikenellaceae*) и *Parabacteroides* (*Porphyromonadaceae*).

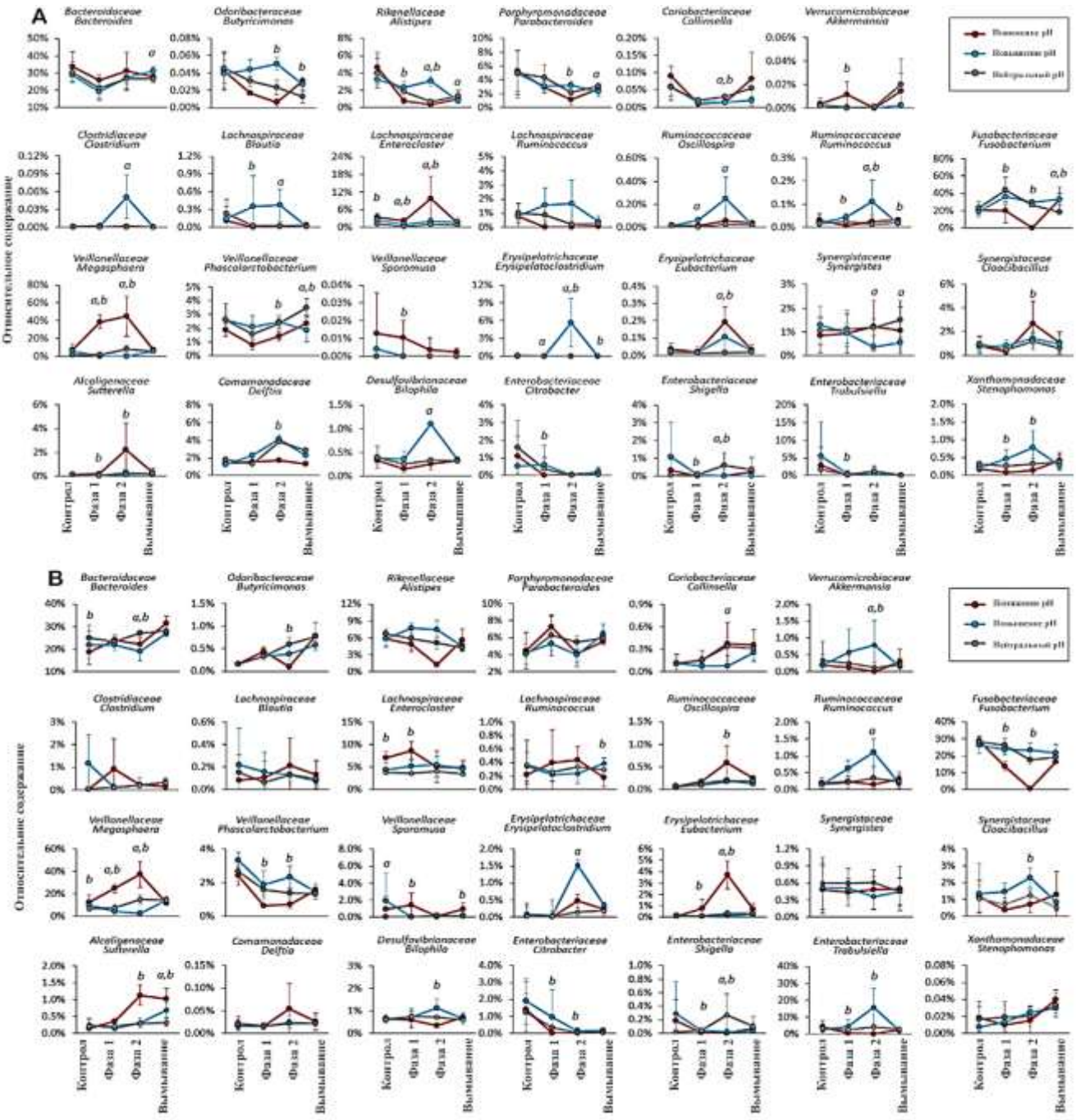


Рисунок 5.9. - Относительное количество таксонов, значительно изменившихся под влиянием уровня pH независимо от донора [188]. Статистические различия определялись с использованием линейной модели со смешанными эффектами. a = значительное различие между группами с повышением pH и нейтральным pH; b = значительное различие между понижением pH и нейтральным pH. (A) Просветные и (B) Слизистые образцы

Среди представителей типа *Firmicutes* снижение pH сопровождалось увеличением относительной численности *Enterocloster* (*Lachnospiraceae*) и *Megasphaera* (*Veillonellaceae*) в обеих фазах эксперимента. Для *Sporomusa* (*Veillonellaceae*) увеличение отмечалось только в первой фазе, а для *Erysipelatoclostridium* (*Erysipelotrichaceae*) и *Eubacterium* во второй. Одновременно снижалась численность *Blautia* (*Lachnospiraceae*) в первой фазе, *Phascolarctobacterium* (*Veillonellaceae*) во второй, а *Ruminococcus* (*Ruminococcaceae*) в обеих фазах.

5.1.10. Влияние pH среды на тип и уровни короткоцепочечных жирных кислот в системе

Влияние pH на метаболическую активность кишечной микробиоты показано на рисунке 5.10. Суммарная концентрация КЦЖК во второй фазе эксперимента при нейтральном pH составляла 62,0 ммоль/л, при повышенном увеличивалась до 67,8 ммоль/л, а при пониженном уменьшалась до 52,0 ммоль/л (рисунок 5.10А). Основной вклад в эти изменения, статистически значимо вносила уксусная кислота с концентрацией 37,3; 46,3 и 24,2 ммоль/л соответственно.

Для остальных кислот характер изменений был неодинаковым. При повышении pH содержание масляной кислоты в первой фазе снижалось, во второй фазе статистически значимых различий не выявлено, а в период восстановления наблюдалось его увеличение. При понижении pH концентрация масляной кислоты возрастала в обеих экспериментальных фазах и в период восстановления. Во второй фазе её содержание составляло 6,9 ммоль/л в контрольной группе и 11,9 ммоль/л при повышенном pH.

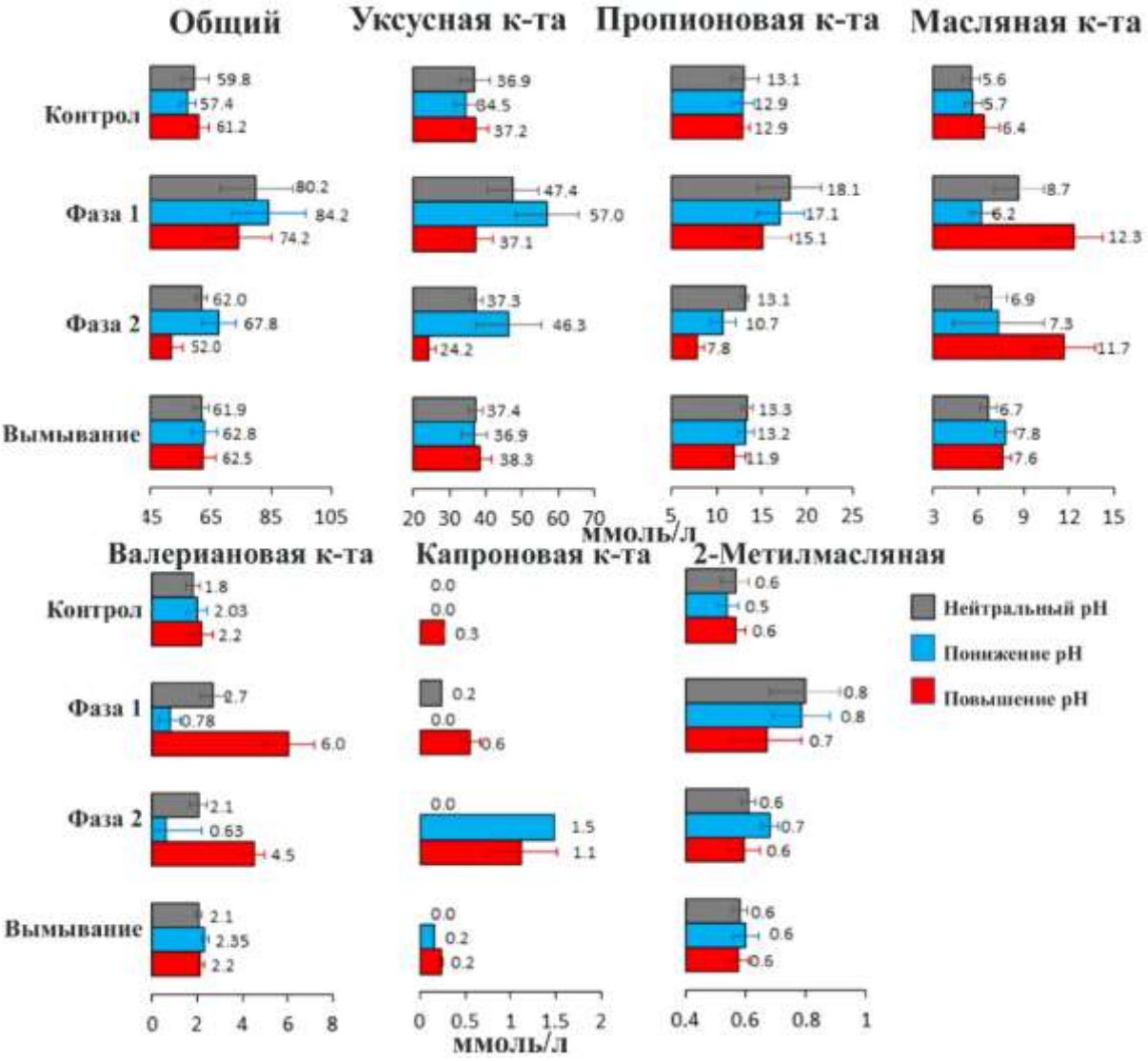


Рисунок 5.10. - Содержание КЦЖК при нейтральном, пониженном и повышенном pH в различные фазы эксперимента.

Концентрация валериановой кислоты при повышении pH снижалась, а при понижении возрастала в обеих экспериментальных фазах и во второй фазе её содержание составляло 2,08 ммоль/л при нейтральном pH, 0,63 ммоль/л при повышенном и 4,52 ммоль/л при пониженном pH. Изменения для 2-метилбутановой кислоты были 0,61; 0,68 и 0,60 ммоль/л соответственно. Содержание пропионовой кислоты уменьшалось при отклонении pH в обоих направлениях: с 13,14 ммоль/л в контроле до 10,67 ммоль/л при повышении pH и 7,79 ммоль/л при его снижении.

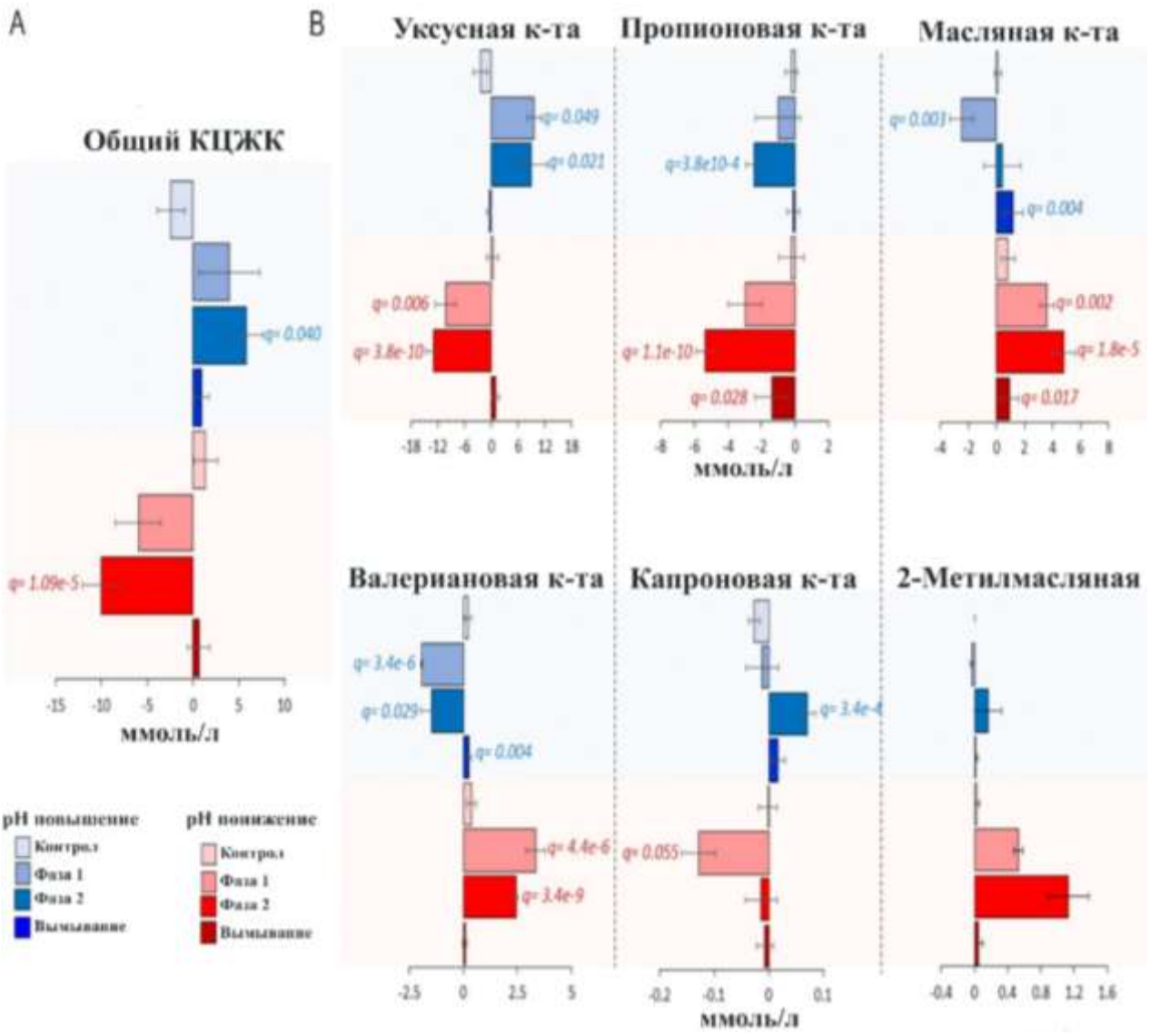


Рисунок 5.11. - Различия содержания КЦЖК между контрольной и экспериментальными группами: (A) суммарное содержание; (B) отдельные кислоты. Синий цвет - повышение pH, красный - понижение pH. Статистическую значимость определяли с помощью двустороннего t-критерия Стьюдента, для отдельных кислот - с коррекцией FDR [188]

Изменения содержания КЦЖК коррелируются различием в таксономическом составе кишечной микробиоты. Например, при повышении pH в просветных сообществах возрастала относительная численность представителей типа *Firmicutes*, включая бактерии семейств *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Erysipelotrichaceae* и рода *Clostridium* (*Clostridiaceae*), а при понижении pH уменьшалась численность ряда представителей *Bacteroidetes*, в частности *Butyricimonas* (*Odoribacteraceae*), *Alistipes* (*Rikenellaceae*) и

Parabacteroides (*Porphyromonadaceae*). Полученные результаты согласуются с литературными сведениями о чувствительности отдельных представителей *Bacteroides* к кислой среде и устойчивости некоторых бактерий типа *Firmicutes* к снижению pH [256]. Схожие изменения наблюдались в слизистых сообществах, хотя не все различия были статистически значимыми.

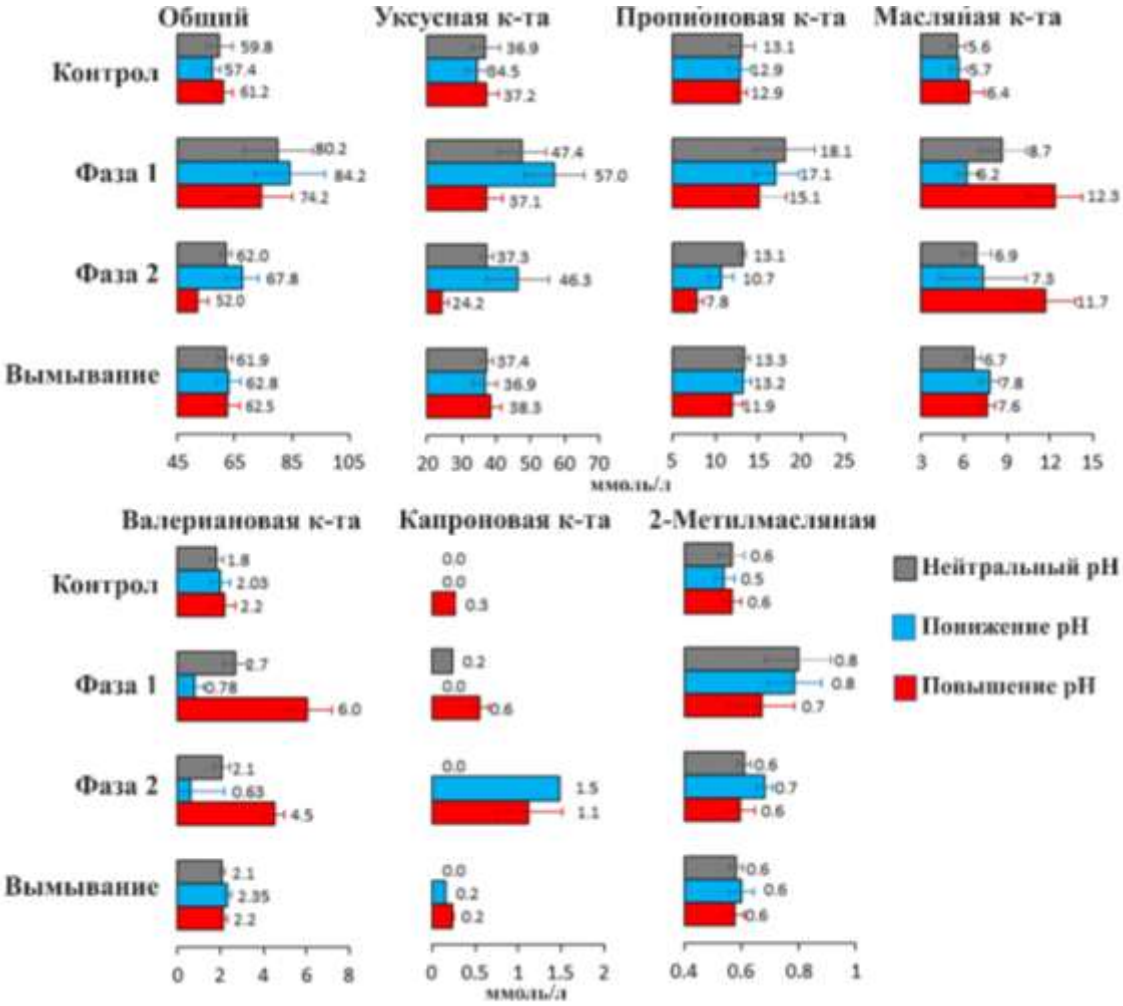


Рисунок 5.12. - Концентрации КЦЖК при различных значениях pH в каждую фазу эксперимента.

При снижении pH в кислую сторону, в просветных сообществах снижалась относительная численность *Delftia* (*Comamonadaceae*), *Citrobacter* и *Shigella* (*Enterobacteriaceae*), *Stenotrophomonas* (*Xanthomonadaceae*), а в слизистых сообществах уменьшалась *Bilophila* (*Desulfovibrionaceae*) и некоторых родов семейства *Enterobacteriaceae*, к которому относятся *Escherichia coli* и *Trabulsiella* [240, 257]. Хотя для *E. coli* известны механизмы устойчивости к кислотному

стрессу [258], в смешанном микробном сообществе её относительная численность зависит от pH и от взаимодействий с другими микроорганизмами.

В обеих исследованных фракциях микробиоты снижение pH сопровождалось уменьшением относительной численности *Fusobacterium* (*Fusobacteriaceae*) и увеличением представленности *Megasphaera* (*Veillonellaceae*). Изменения отдельных бактериальных групп были выраженными при уменьшение pH в кислую сторону, чем при повышении pH. Известно, что микроорганизмы различаются по устойчивости к кислотности среды: большинство кишечных бактерий относится к нейтрофильным формам, тогда как ацидофильные и алкалифильные микроорганизмы приспособлены к кислым или щелочным условиям [259]. Снижение численности *Fusobacterium* представляет интерес с учётом описанной в литературе связи отдельных представителей *Fusobacteria* с колоректальным раком [244, 256]. Сопоставление таксономического состава с концентрациями КЦЖК показал, что снижение численности представителей *Bacteroidetes* при понижении pH повлиял на ферментацию полисахаридов. Многие бактерии этой группы обладают гликозид-гидролазами и полисахарид-лиазами, участвующими в расщеплении растительных полисахаридов [246, 252]. При повышении pH, напротив, увеличивалась *Lachnospiraceae* и *Ruminococcaceae*, среди которых встречаются продуценты КЦЖК [260]. Вместе с тем надо учитывать, что по относительной численности этих групп невозможно определить их вклад в образование отдельных кислот [254].

В целом понижение pH сопровождалось снижением суммарной концентрации КЦЖК, несмотря на увеличение содержания масляной и валериановой кислот, а при повышении pH суммарная концентрация возрастала преимущественно за счёт уксусной кислоты. Полученные данные важны при оценке влияния условий культивирования на кишечную микробиоту в моделях *in vitro*.

5.2. Модуляция структуры и функции микробиоты кишечника двумя структурно различными пектинами

5.2.1. *In vitro*-культивирование микробиоты кишечника и экспериментальный дизайн

Набор из четырёх биореакторов Eppendorf Bioflow 320 использовался для культивирования микробиоты кишечника двух взрослых доноров в дупликатах (Рисунок 5.13).

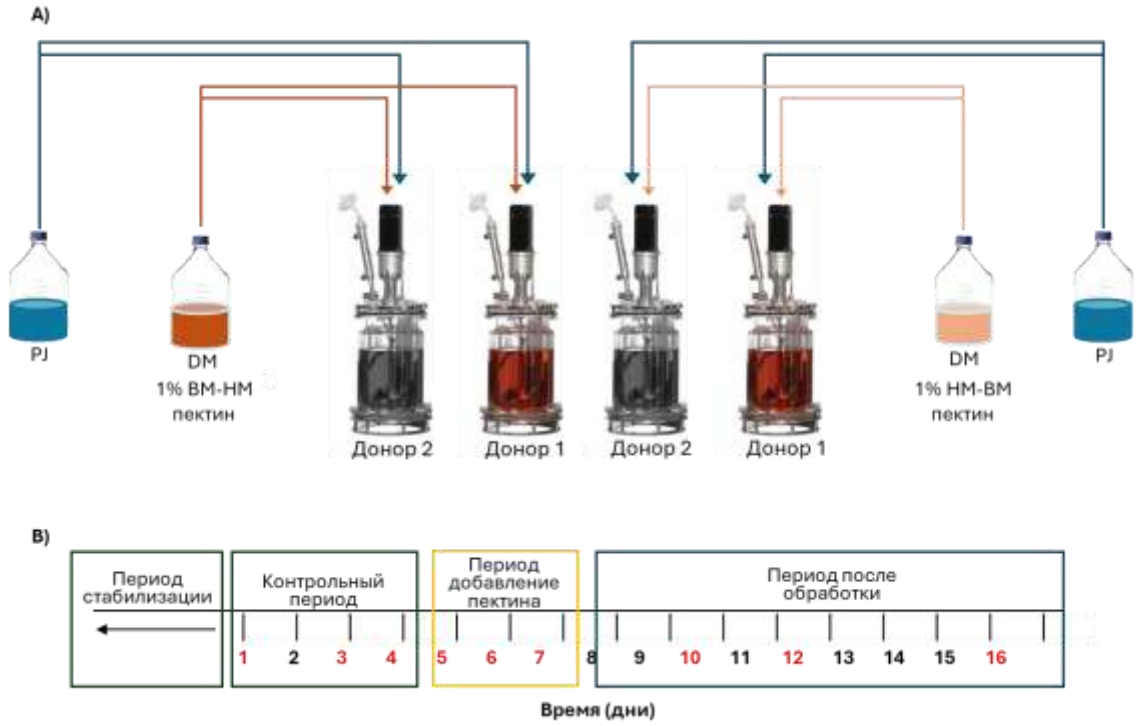


Рисунок 5.13. - Экспериментальный проект. А) Схема экспериментальной установки.

В) Хронология эксперимента

Инокуляты были приобретены у компании Openbiome в виде фекальных гомогенатов от случайных взрослых доноров, как описано ранее [187]. Инокуляты были охарактеризованы с помощью ампликонного секвенирования 16S рРНК для определения начальной структуры сообщества (Рисунок 5.14). Сообщества поддерживались с использованием определённой среды (DM), приобретённой у компании ProDigest®, в качестве источника питания, и панкреатического сока (PJ) в качестве источника панкреатических и жёлчных ферментов [187]. В фазе обработки DM была дополнена 1% пектином.

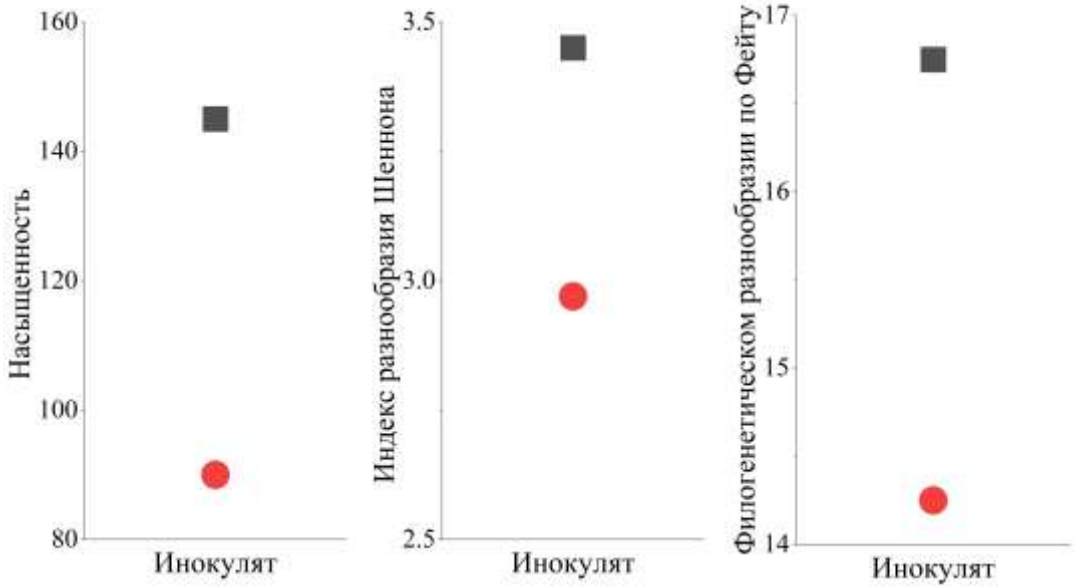


Рисунок 5.14. - Таксономический состав фекальных гомогенатов, использованных для культивирования *in vitro*. А) Альфа-разнообразие каждого инокулята, основанное на насыщенности, индексе разнообразия Шеннона и филогенетическом разнообразии по Фейту. В) Относительная численность родов, присутствующих в количестве более 0,1% по результатам секвенирования гена 16S рРНК

Пектин был выбран для этого исследования из-за сообщений об его пребиотическом потенциале и возможности его получения из сельскохозяйственных отходов, образующихся, например, при переработке сока [175, 261, 262]. Пектин с молекулярной массой 308 кДа и 31 % СЭ был назван ВМ-НСЭ, а второй с молекулярной массой 122 кДа и 66 % СЭ был назван НМ-ВСЭ.

	Mw, kDa*	ГК, %**	СЭ, %***
Пектин 1 (НМ-ВМ)	122	64.7	66
Пектин 2 (ВМ-НМ)	308	69.0	31

** Среднемолекулярная масса ** Галактуроновая кислота ***Степень этерификации*

Перед инокуляцией каждый биореактор был заполнен 700 мл DM и 300 мл PJ [187]. Фекальные гомогенаты размораживались в соответствии с

инструкциями поставщика, и в каждый биореактор инокулировали в объёме 5 % (об.) гомогената. Два биореактора были инокулированы гомогенатом от донора 1, а два биореактора – гомогенатом от донора 2. Сообщество микробиоты кишечника в каждом биореакторе поддерживалось трёхразовым питанием в день (каждые 8 часов) объёмом 200 мл 70 % DM и 30 % PJ, как описано ранее [210, 263]. Сообществам было предоставлено время для стабилизации (>2 недель) [187], а затем на протяжении 4-х дней собирались пробы в контрольный период. После контрольного периода DM была заменена на DM, содержащую 1 % пектина, на 3 дня экспериментального периода. В период добавления пектина один биореактор от каждого донора получал DM с пектином ВМ-НСЭ, а другой биореактор от каждого донора – DM с пектином НМ-ВСЭ. После этого периода все биореакторы получали DM без пектина на протяжении 9 дней.

5.2.2. Влияние пектинов с низкой молекулярной массой и высокой степенью этерификации и высокой молекулярной массой и низкой степенью этерификации на альфа-разнообразие

Для оценки влияния пектинов с низкой молекулярной массой и высокой степенью этерификации (НМ-ВСЭ) и высокой молекулярной массой и низкой степенью этерификации (ВМ-НСЭ) на микробиоту кишечника структура сообщества анализировалась с использованием секвенирования гена 16S рРНК. Альфа-разнообразие рассчитывалось в следующие временные промежутки: контрольный период, период обработки пектином и период после обработки пектином, основываясь на насыщенности, которая указывает количество обнаруженных таксономических единиц, разнообразии по индексу Шеннона и биоразнообразии по филогенетическому индексу Фейта (Faith’s PD) (Рисунок 5.15) [187, 188].

В случае пектина НМ-ВСЭ оба донорских сообщества ответили увеличением насыщенности, хотя это не достигло значимости в период обработки. Однако, после прекращения обработки пектином НМ-ВСЭ наблюдалось значительное снижение насыщенности, даже ниже уровня контрольного периода (Рисунок 5.15A). Разнообразие, оцененное с

использованием индекса Шеннона, изменилось только у донора 2 при воздействии пектина НМ-ВСЭ, что указывает на зависимость от донора. Изменение, зависящее от донора, характерно для конкретного донора и связано с тем, что состав микробиоты кишечника уникален для каждого человека и отличается значительным межиндивидуальным разнообразием [264]. Индекс Фейта (Faith's PD) для пектина НМ-ВСЭ не изменился ни у одного из доноров.

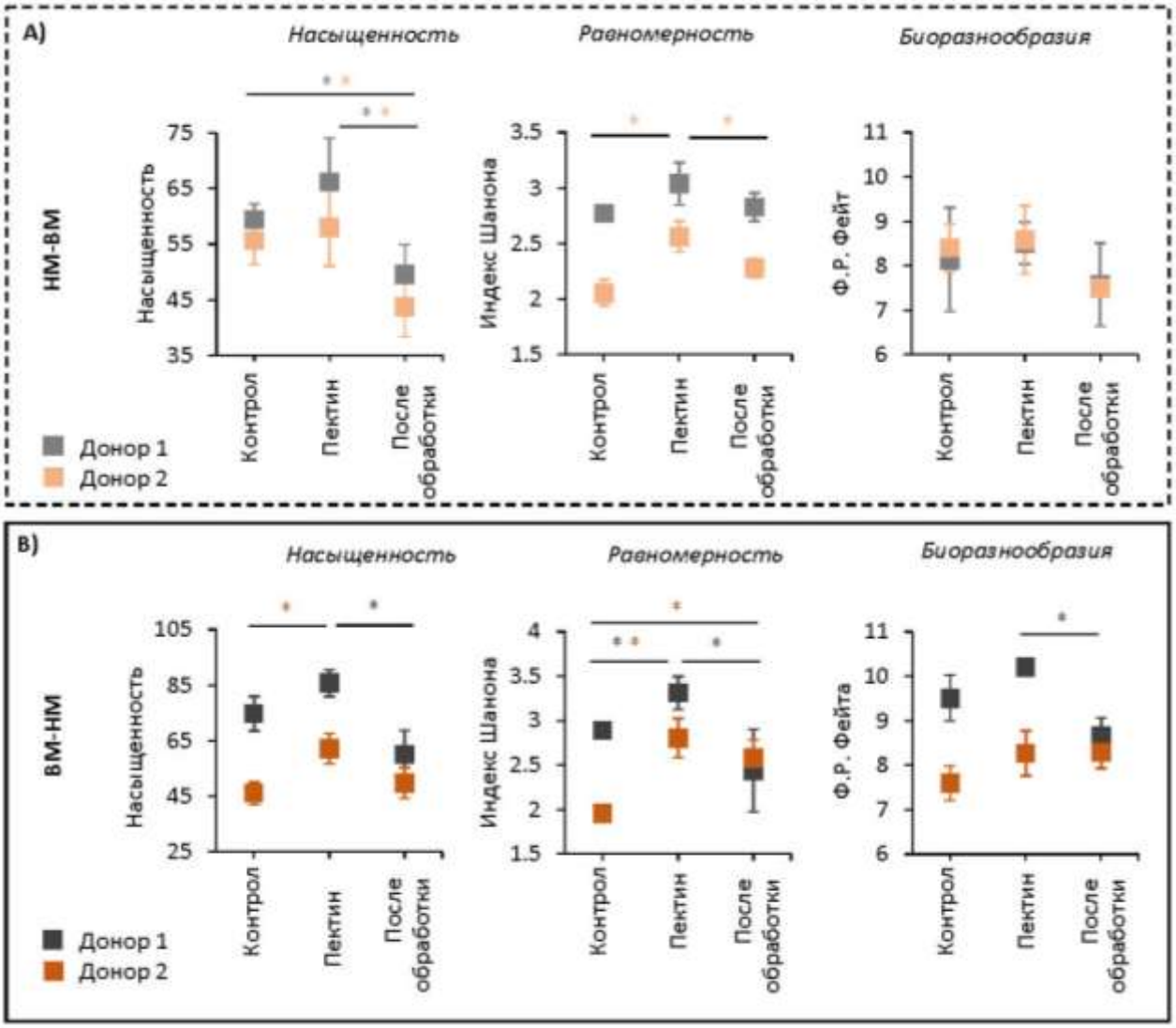


Рисунок 5.15. - Альфа-разнообразие, измеренное по насыщенности, индексу разнообразия Шеннона и филогенетическому индексу Фейта (Faith's PD). Статистически значимые изменения обозначены символом звёздочки (*). (А) Пектин НМ-ВСЭ; (В) Пектин ВМ-НСЭ

В случае пектина ВМ-НСЭ оба донорских сообщества ответили увеличением насыщенности (Рисунок 5.15B). Однако это было статистически значимым только для донора 2, в то время как у донора 1 насыщенность

значительно снизилась в период после обработки, как это наблюдалось при применении пектина НМ-ВСЭ. У обоих доноров наблюдалось значительное увеличение разнообразия по индексу Шеннона в ответ на пектин ВМ-НСЭ, а у донора 1 также было значительное снижение индекса Фейта (Faith's PD) в период до обработки. Эти данные показывают, что как пектин НМ-ВСЭ, так и пектин ВМ-НСЭ влияли на разнообразие сообщества, хотя часть изменений была обусловлена индивидуальным составом микробиоты доноров.

5.2.3. Оценка структуры сообщества с помощью анализа главных координат

Для оценки влияния пектинов НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ на β-разнообразие кишечной микробиоты использовали анализ главных координат (PCoA) на основе взвешенных и невзвешенных расстояний UniFrac (рисунок 5.16). Невзвешенный UniFrac учитывает наличие или отсутствие отдельных таксонов, тогда как взвешенный дополнительно отражает их относительную численность.

На графиках PCoA образцы каждого донора, полученные в контрольный период, во время обработки пектином и после её завершения, образовывали отдельные группы. Наиболее выраженное разделение наблюдалось при использовании невзвешенных расстояний UniFrac. Первая главная координата (PCoA1) объясняла 73,1% вариации для пектина НМ-ВСЭ и 70,7% для ВМ-НСЭ. Разделение образцов по этой оси преимущественно соответствовало их принадлежности к разным донорам, что указывает на существенные индивидуальные различия в таксономическом составе кишечной микробиоты, прежде всего в присутствии или отсутствии отдельных таксонов.

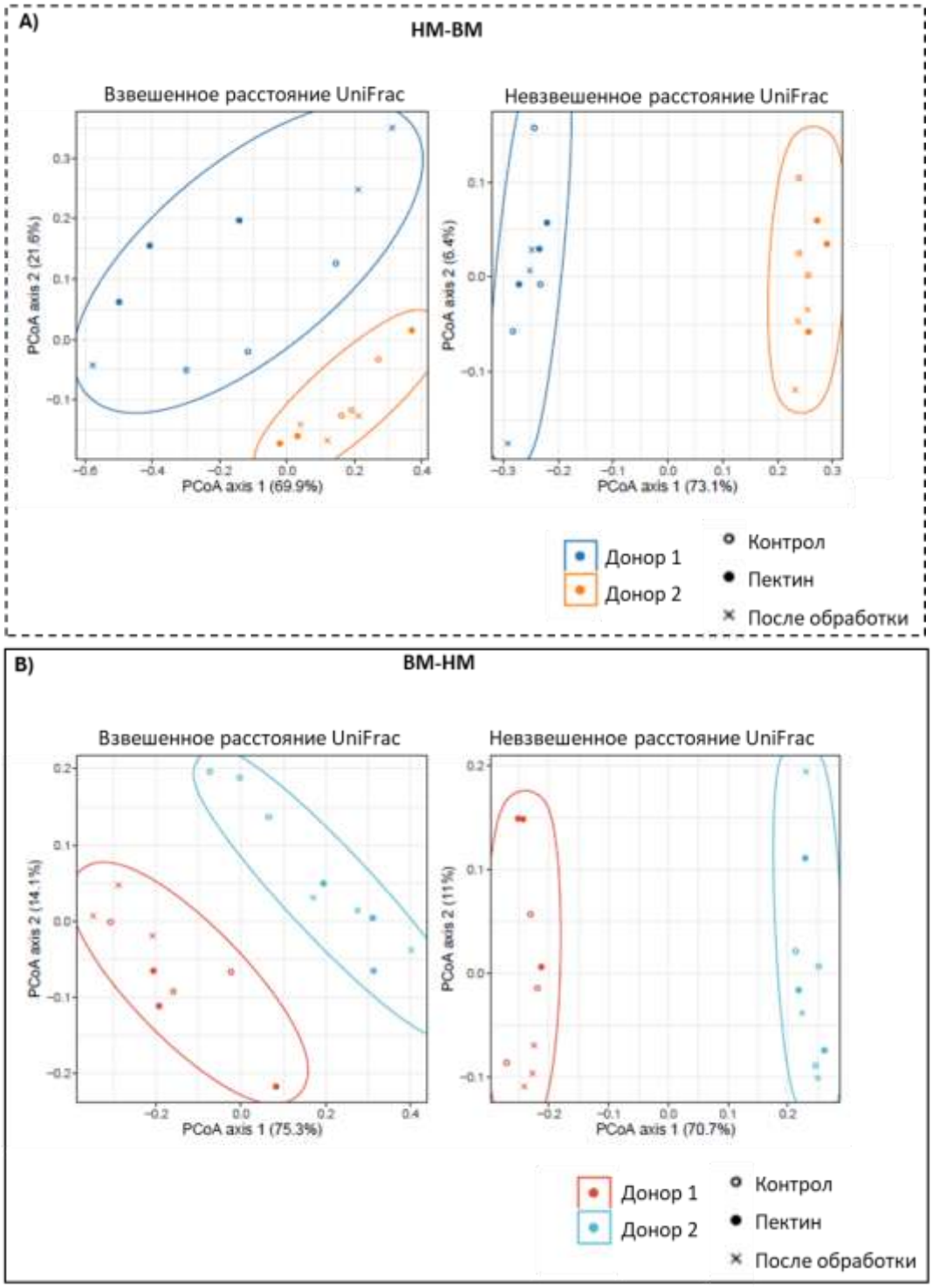


Рисунок 5.16. - Анализ главных координат (PCoA) на основе взвешенных и невзвешенных расстояний UniFrac для обоих доноров в период контроля, обработки пектином и после обработки. (A) Пектин НМ-ВСЭ; (B) Пектин ВМ-НСЭ

5.2.4. Изучение структурного влияния пектина с использованием секвенирования гена 16S рРНК

Несмотря на то, что результаты PCoA не показали значительных изменений в структуре сообщества, возник вопрос, окажет ли добавление пектинов НМ-ВСЭ или ВМ-НСЭ влияние на определенные таксономические группы. Используя данные секвенирования гена 16S рРНК, было определено относительное изобилие таксонов для каждого донора в периоды контроля, обработки пектином и после обработки, и представлены тепловыми картами, иллюстрирующими профили сообществ на уровне классов (Рисунок 5.17). Сообщества донора 1 не отреагировали значимо в период обработки любым из пектинов; однако после удаления НМ-ВСЭ наблюдалось значительное уменьшение класса *Clostridia* и соответствующее увеличение *Bacteroidia* (Рисунок 5.17A). Стоит отметить, что хотя во время обработки пектином наблюдалось значительное увеличение *Clostridia*, оно не достигло значимости из-за вариаций между образцами. Сообщества донора 2 отреагировали на оба типа пектина. Было зафиксировано значительное увеличение *Fusobacteriia* в ответ на пектин НМ-ВСЭ и несколько значимых изменений в ответ на обработку ВМ-НСЭ, таких как снижение таксонов *Bacteroidia* и увеличение представителей *γ-Proteobacteria*, *Clostridia*, *Fusobacteriia* и *β-Proteobacteria* (Рисунок 5.17B).

Для более подробной оценки влияния пектинов НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ на кишечную микробиоту изменения таксономического состава исследовали на уровне родов (рисунок 5.18). Такой подход позволил выявить различия, которые могли быть незаметны при анализе более крупных таксономических групп.

При обработке пектином НМ-ВСЭ статистически значимые изменения обнаружены только для шести родов (рисунок 5.18A). При этом ранее было установлено увеличение таксономического богатства сообществ (рисунок 5.15). Возможно, под действием пектина численность некоторых ранее малочисленных микроорганизмов увеличилась настолько, что они стали обнаруживаться при секвенировании.

Реакция микробных сообществ на НМ-ВСЭ различалась между донорами. У донора 1 наблюдалось снижение относительной численности *Acidaminococcus* и *Paraprevotella* при одновременном увеличении *Pseudoramibacter*. У донора 2 уменьшалась численность *Alistipes*, тогда как содержание *Oscillospira* и *Fusobacterium* возрастало.

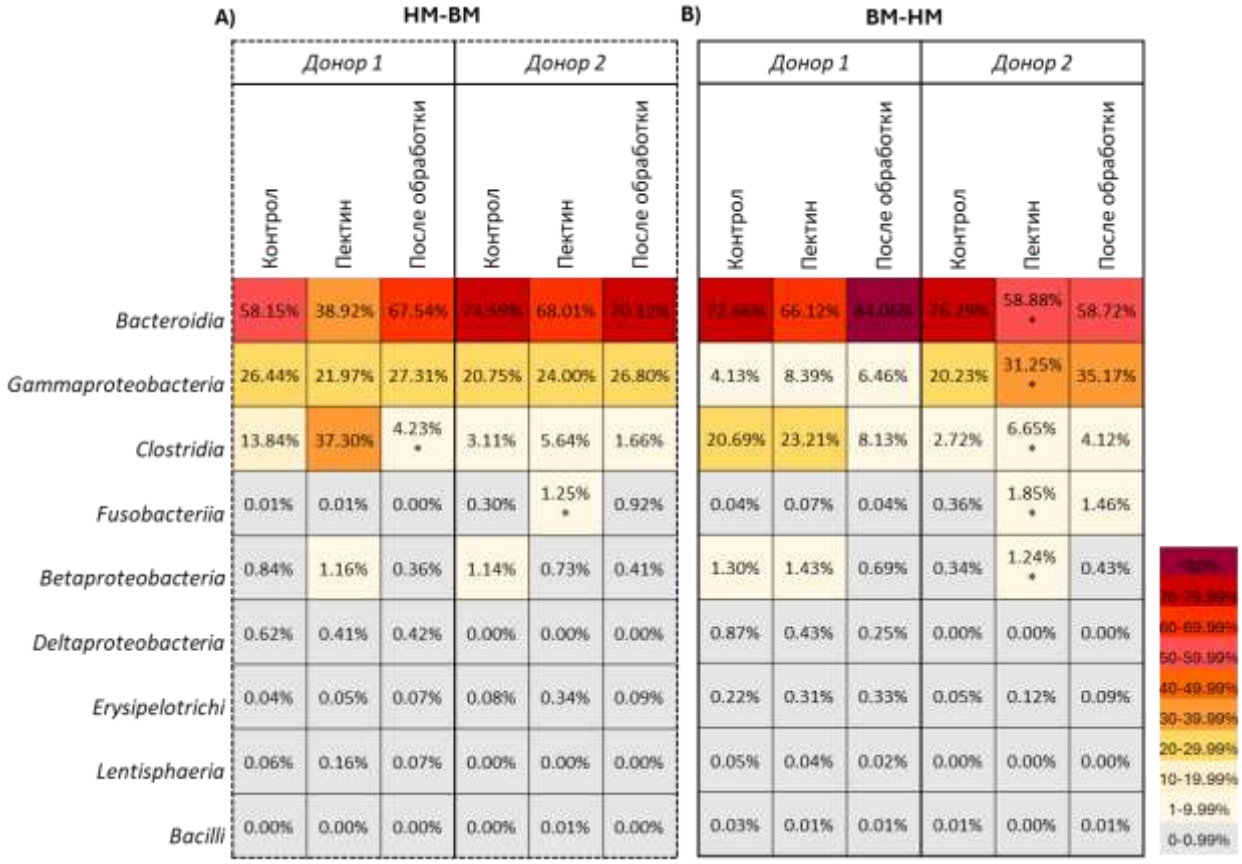
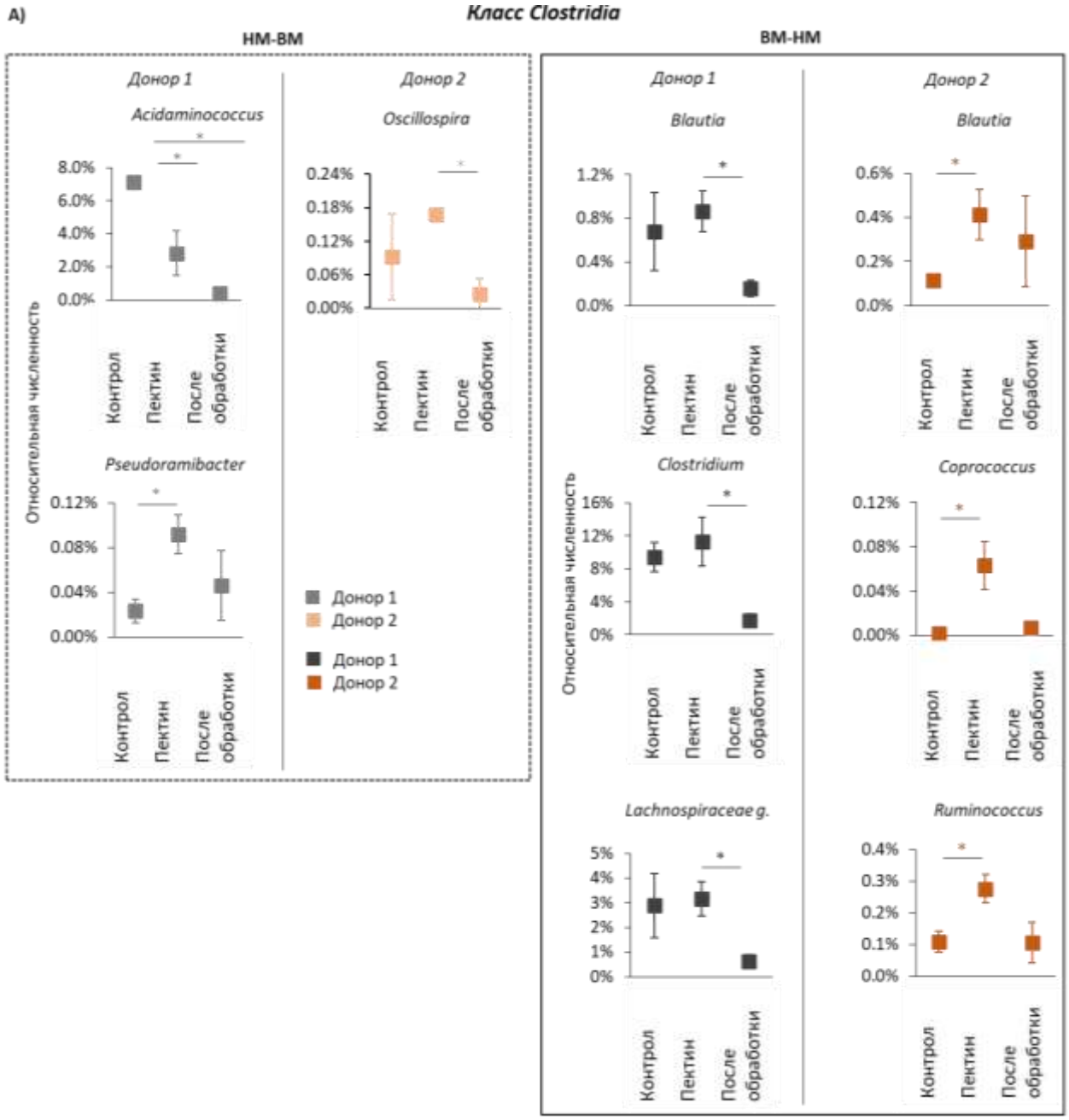


Рисунок 5.17. - Тепловая карта, отображающая относительное обилие таксонов на уровне классов для таксонов с обилием более 0,01% хотя бы в одном образце. Значимые изменения обозначены на рисунке символом звёздочки (*). (А) Пектин НМ-ВСЭ. (В) Пектин ВМ-НСЭ

Обработка пектином ВМ-НСЭ сопровождалась более выраженными изменениями на уровне родов, часть которых наблюдалась у обоих доноров (рисунок 5.18В). В частности, увеличивалась относительная численность представителей семейства *Lachnospiraceae*, хотя состав реагирующих родов различался. У донора 1 увеличение было связано с *Blautia*, *Clostridium* и одним

неидентифицированным родом, а у донора 2 с *Blautia*, *Coprococcus* и *Ruminococcus*.

Вместе с тем сохранялись и индивидуальные особенности ответа на ВМ-НСЭ. У донора 1 статистически значимые изменения отмечались только среди представителей класса *Clostridia*, хотя относительная численность этого класса в целом существенно не изменялась (рисунок 5.17.). Это показывает, что изменение соотношения отдельных родов не всегда сопровождается заметными изменениями на уровне более крупных таксономических групп.



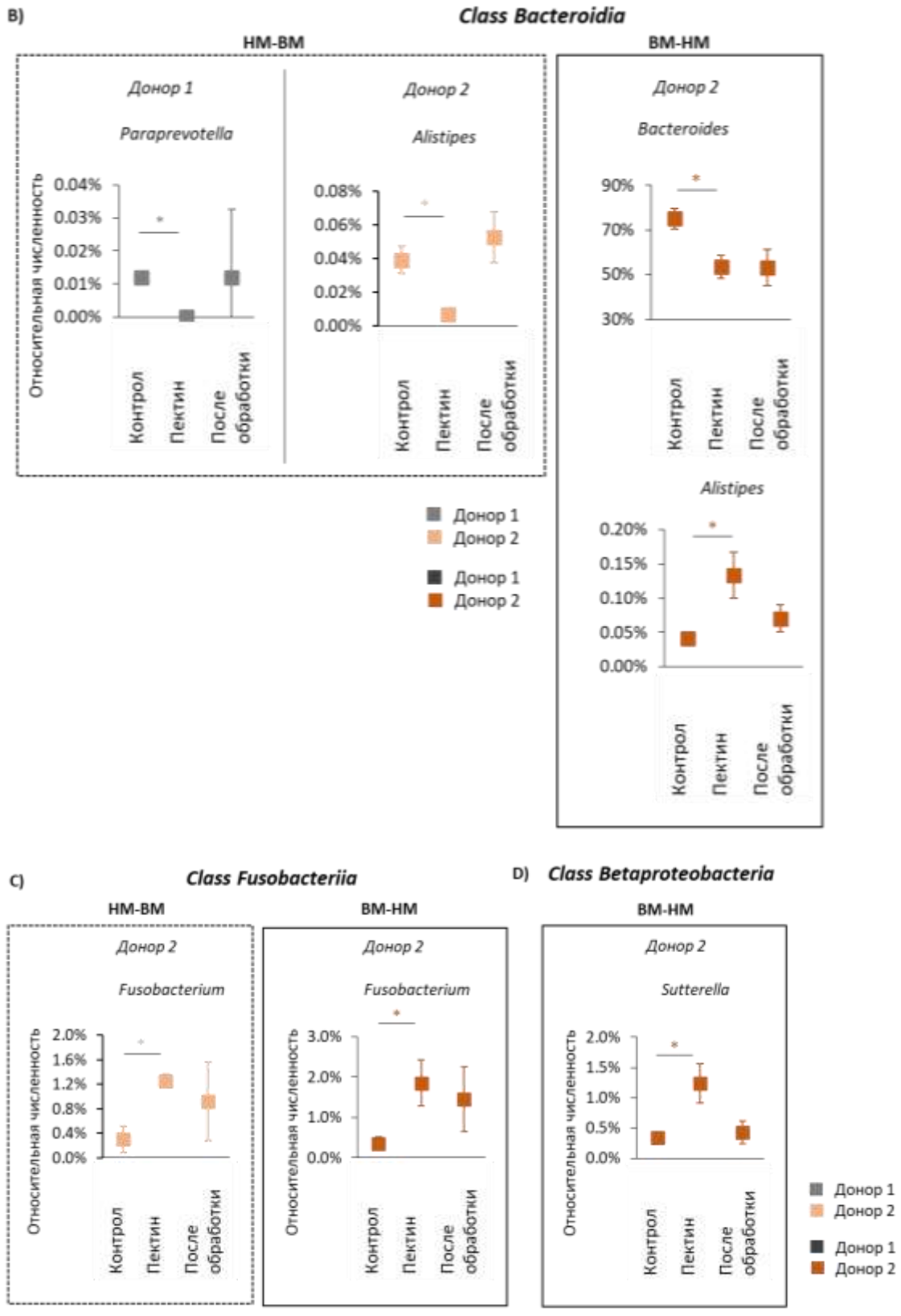


Рисунок 5.18. - Таксоны на уровне рода, изменённые пектинами НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ. (*) Статистически значимые изменения. (A) Clostridia; (B) Bacteroidia; (C) Fusobacteriia; (D) Beta*Proteobacteria*

Таксон, отсутствующий в данном профиле сообщества, – это *Bifidobacterium*, который обычно ассоциируется с положительными эффектами для здоровья, и, согласно некоторым исследованиям, пектин обладает бифидогенным эффектом [185]. Отсутствие таксона *Bifidobacterium*, вероятно, связано с тем, что ген 16S рРНК *Bifidobacteriales* плохо обнаруживается с помощью праймеров V1-V2 для секвенирования [265]. Данные секвенирования 16S рРНК были дополнены анализом qPCR для определения уровня рода *Bifidobacterium* (Рисунок 5.19). Результаты не выявили статистически значимых различий в уровнях *Bifidobacterium* для сообществ обоих доноров при воздействии как НМ-ВСЭ, так и ВМ-НСЭ пектинов.

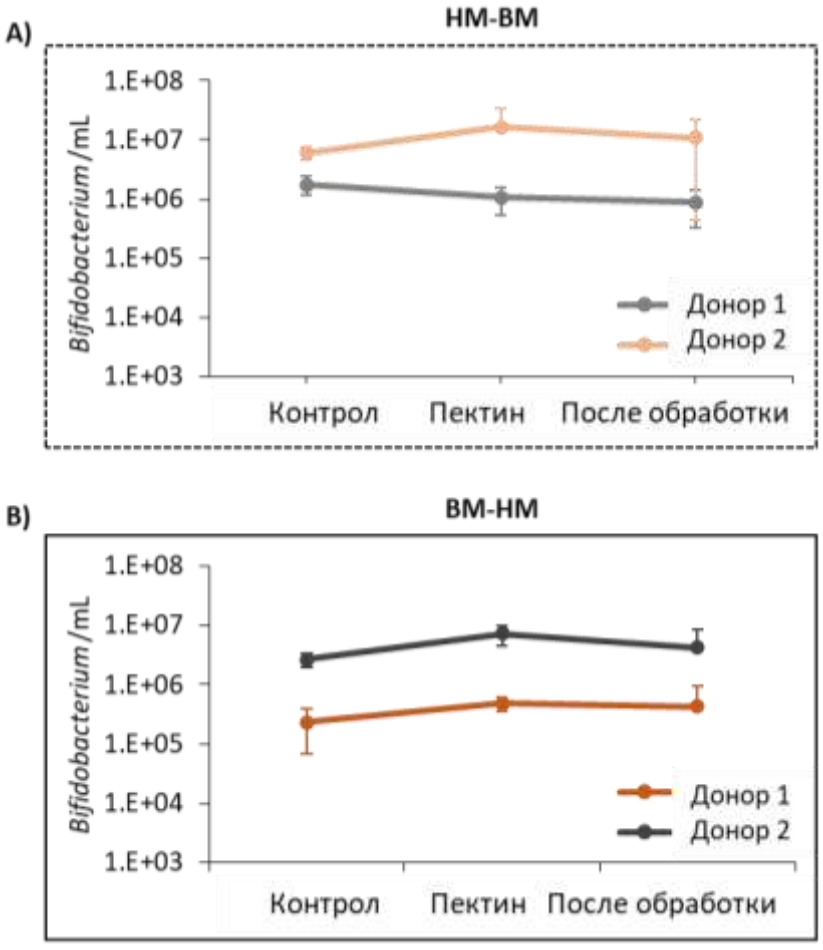
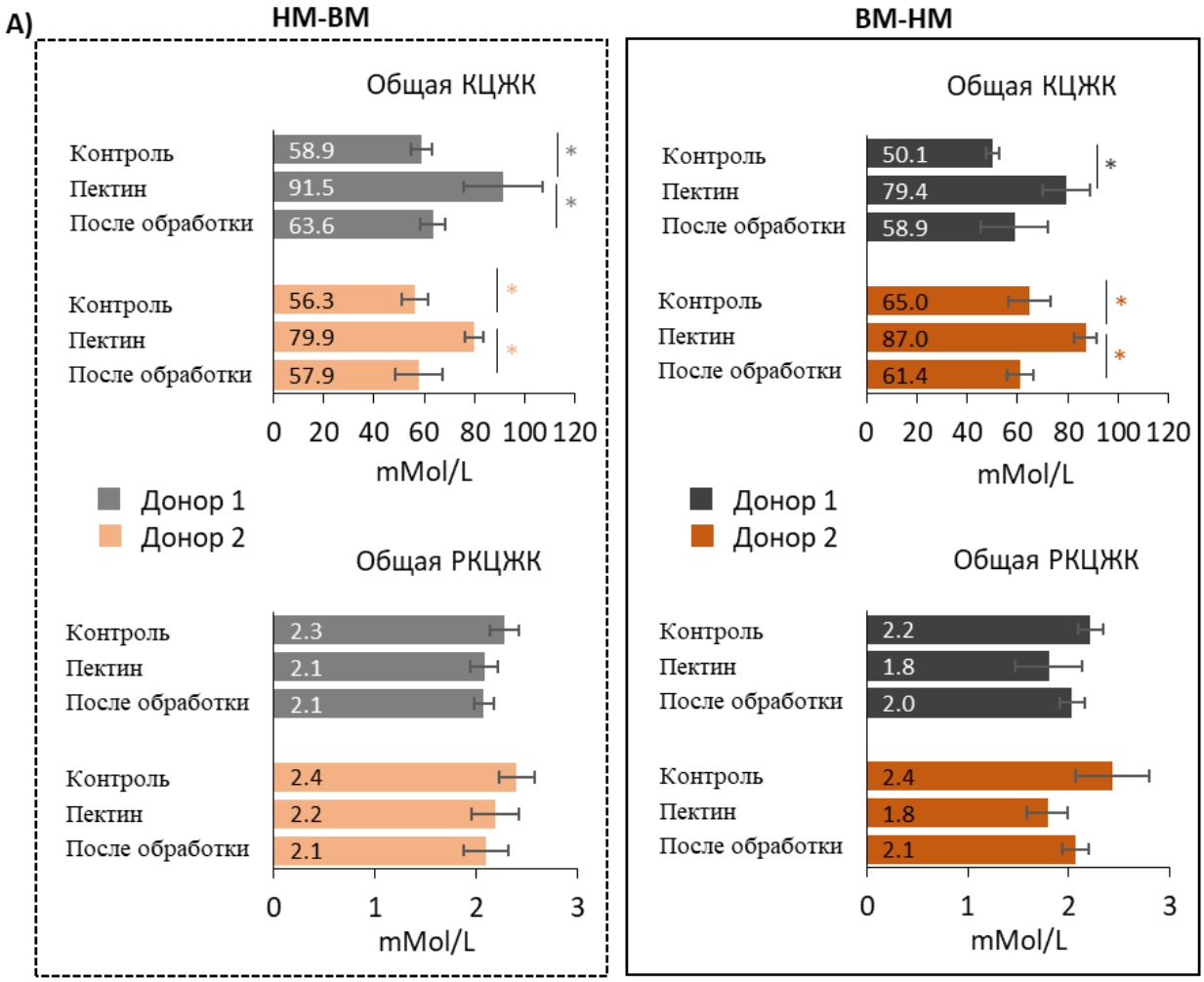


Рисунок 5.19. - Уровни *Bifidobacterium*, определённые с помощью анализа qPCR. (A) пектин НМ-ВСЭ; (B) пектин ВМ-НСЭ

5.2.5. Влияния пектинов на метаболиты микробиоты

Кишечная микробиота хорошо известна своими ферментативными свойствами, результатом которых является выделение КЦЖК, которые обычно

считаются полезными для здоровья человека [266]. Наиболее распространёнными КЦЖК являются уксусная, пропионовая и масляная кислоты, образующиеся в процессе ферментации растительных полисахаридов, олигосахаридов и резистентного крахмала [267]. РКЦЖК образуются в результате ферментации аминокислот, белков и пептидов. Чтобы проанализировать влияние пектина на метаболическую активность сообществ кишечной микробиоты, концентрация КЦЖК была определена с использованием газовой хроматографии-масс-спектрометрии, и были измерены количества, произведённые в течение контрольного периода, периода добавления пектинов и постпериод для сравнения (Рисунок 5.20).



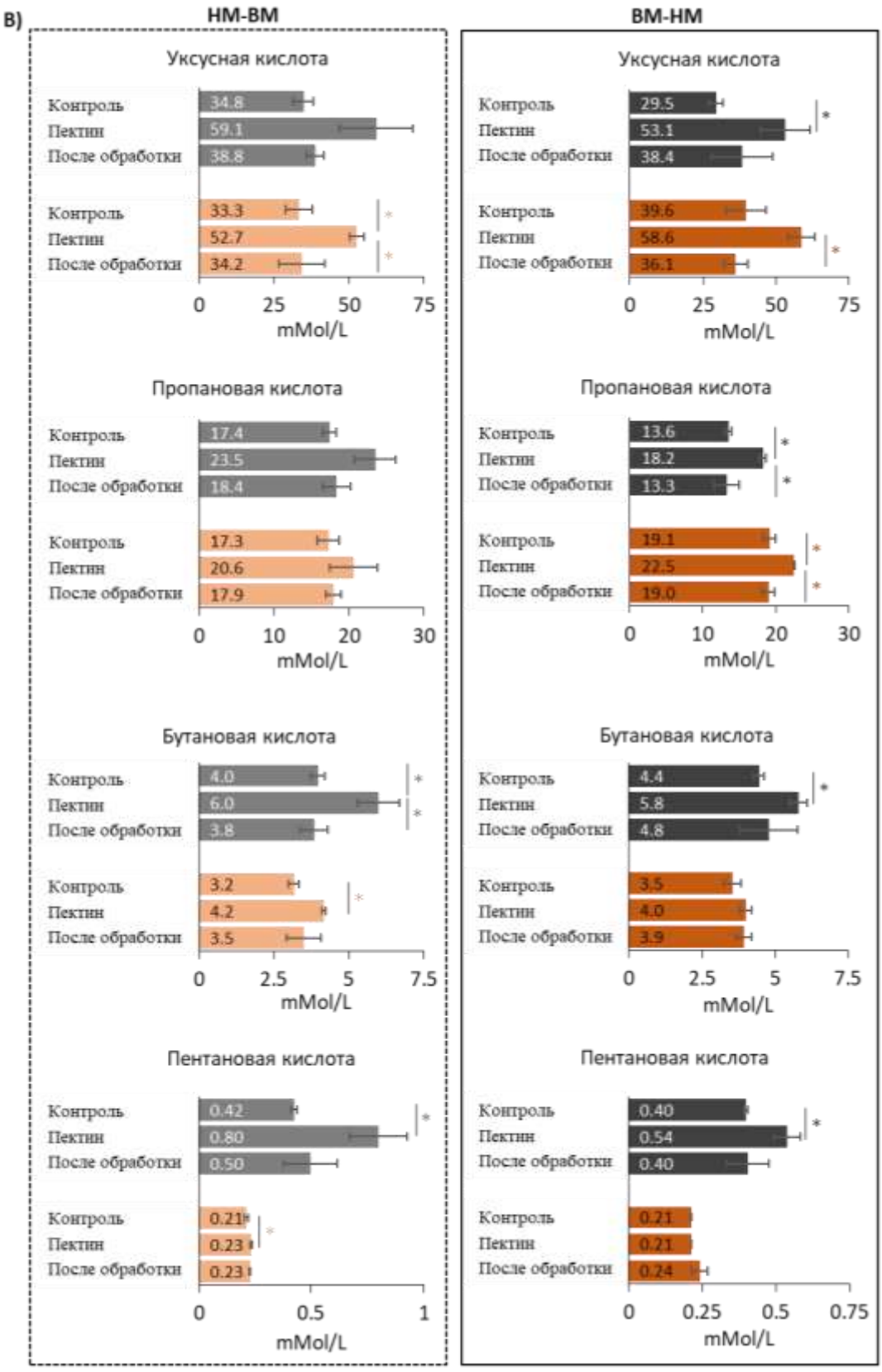


Рисунок 5.20. - Уровни КЦЖК, образующиеся при обработке пектином НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ. (*) Статистически значимые изменения. (А) Общий уровень КЦЖК и РКЦЖК; (В) Уровни отдельных КЦЖК: уксусная, пропионовая, масляная и пентановая кислоты

Результаты показали, что уровни общих КЦЖК значительно увеличились в ответ на обработку как НМ-ВСЭ, так и ВМ-НСЭ пектином, и это наблюдалось для обоих сообществ доноров (Рисунок 5.20A). Для НМ-ВСЭ было зафиксировано среднее увеличение в 1,49 раза, а для ВМ-НСЭ – в 1,46 раза по сравнению с уровнем КЦЖК. Ни один из пектинов не повлиял на уровень РКЦЖК для любого из доноров.

При более глубоком анализе было выявлено, что увеличение общего уровня КЦЖК в основном связано со значительным увеличением уровня уксусной кислоты, которая была преобладающей КЦЖК, измеренной в этих сообществах (Рисунок 5.20B). Это значительное увеличение наблюдалось при обоих условиях обработки и было независимо от донора. Добавление пектинов НМ-ВСЭ или ВМ-НСЭ привело к среднему увеличению уровня уксусной кислоты в 1,64 раза по сравнению с контрольным периодом. В частности, добавление НМ-ВСЭ привело к росту концентрации уксусной кислоты и сопровождалось значительным увеличением уровня масляной кислоты для обоих доноров, в среднем в 1,41 раза по сравнению с контрольным периодом. Интересно, что у донора 1 наблюдалось дополнительное значительное увеличение уровня пропионовой кислоты при обработке обоими типами пектина, а пектин НМ-ВСЭ также повысил уровень пентановой кислоты для этого донора.

Пребиотическая функция пектина была описана в предыдущих исследованиях, которые продемонстрировали его способность стимулировать рост полезных бактерий [20, 180, 268, 269]. Однако результаты в литературе противоречивы, что, скорее всего, связано с различиями в химической структуре используемых пектинов [180]. Молекулярная масса (MW) и СЭ пектина влияют на его ферментируемость кишечной микробиотой и его пребиотический потенциал. Для оценки влияния структурных особенностей пектина на кишечную микробиоту сравнивали два образца, различавшихся молекулярной массой (MW) и степенью этерификации (СЭ): НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ. Исследование проводили *in vitro* с использованием микробных сообществ двух доноров. Основное внимание уделяли изменениям таксономического состава и

метаболической активности микробиоты, позволяющим оценить пребиотическое действие пектинов.

Поскольку исследуемые образцы одновременно различались по MW и СЭ, эксперимент не позволял установить вклад каждого из этих параметров в наблюдаемые изменения. Однако такое сравнение давало возможность оценить различия в действии пектинов с существенно отличающимися структурными характеристиками.

Результаты показали, что оба пектина влияли на состав кишечной микробиоты, однако характер изменений зависел от исходного микробного сообщества донора. При обработке НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ наблюдалось увеличение таксономического богатства, более выраженное для ВМ-НСЭ (рисунок 5.15). Вместе с тем статистически значимые изменения были выявлены не у обоих доноров. Полученные результаты согласуются с исследованиями, в которых отмечалось увеличение таксономического богатства под действием пектина, хотя в литературе также описано снижение α-разнообразия при его применении [180, 270, 271]. Однако эти расхождения, скорее всего, связаны с различиями в типах используемых пектинов и дизайне исследования.

Одно из основных наблюдений в структуре сообщества в этом исследовании заключалось в том, что эффект как пектина НМ-ВСЭ, так и ВМ-НСЭ был сильно обусловлен составом индивидуального сообщества донора. Это было наиболее очевидно в результатах анализа UniFrac с взвешиванием и без него, которые показали, что для обоих пектинов НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ наибольшее расхождение было связано с составом сообщества донора, а не с обработкой пектином (Рисунок 5.16). Тем не менее, это было ожидаемо, так как эти два сообщества происходили от разных доноров. Однако в образцах, полученных от каждого донора, не было выявлено определенного паттерна изменения сообщества при добавлении или удалении пектинов. Вместо этого отсутствие кластеризации по типу обработки указывало на то, что добавление 1 % пектина, будь то НМ-ВСЭ или ВМ-НСЭ, было недостаточным для того, чтобы вызвать заметные изменения в структуре сообщества, выявляемые с помощью

PCoA-метода. Зависимость от донора также была замечена в профилях сообщества, исследованных на уровне класса (Рисунок 5.17). На тепловой карте показано, что статистически значимые изменения происходят как для пектина НМ-ВСЭ, так и для ВМ-НСЭ, но они зависят от донора**.** Это ещё раз подтверждает, что изменения, вызванные этими пектинами, зависят от состава начальных сообществ.

Анализ микробных сообществ на уровне родов показал, что пектин НМ-ВСЭ изменял относительную численность отдельных таксонов, причём характер этих изменений зависел от донора (рисунок 5.18). При обработке пектином ВМ-НСЭ у обоих доноров наблюдалось увеличение численности представителей семейства *Lachnospiraceae*, хотя реагирующие роды различались. Это согласуется с результатами предыдущих исследований, показавших увеличение численности *Lachnospiraceae* при добавлении пектина. Представители данного семейства обладают ферментами, участвующими в расщеплении пектиновых полисахаридов [19].

В сообществе донора 2 пектин ВМ-НСЭ также способствовал увеличению относительной численности *Alistipes*, *Sutterella* и *Fusobacterium* при одновременном снижении содержания *Bacteroides*. Примечательно, что два исследованных пектина оказывали противоположное влияние на *Alistipes*: при обработке НМ-ВСЭ численность этого рода снижалась, тогда как ВМ-НСЭ сопровождался её увеличением. Снижение содержания *Bacteroides* также представляет интерес, поскольку многие представители этого рода обладают ферментами, необходимыми для расщепления и ферментации пектина [179, 180].

Представители рода *Alistipes* могут участвовать в расщеплении растительных полисахаридов, включая пектин. В то же время увеличение относительной численности *Sutterella*, не относящейся к основным пектинолитическим бактериям, указывает на то, что воздействие пектина может затрагивать не только микроорганизмы, непосредственно участвующие в его ферментации, но и другие группы кишечной микробиоты. Возможно, механизмом данного явления может быть кросс-кормления, при котором

продукты метаболизма пектинолитических бактерий используются другими представителями микробного сообщества. Таким образом, наблюдаемые ответы, вероятно, включают как прямые, так и косвенные метаболические выгоды от пектина» [6, 272].

Ранее в нескольких исследованиях были отмечены бифидогенные эффекты пектина [18, 186]. В этом исследовании влияние пектинов НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ на *Bifidobacterium* оценивали с использованием qPCR. Результаты показали, что ни один из пектинов значимо не изменил уровни *Bifidobacterium* у обоих доноров (Рисунок 5.20). Возможно, это связано с тем, что используемый *in vitro* дизайн эксперимента не способствует поддержанию или росту *Bifidobacterium*, или этот род бактерий не способен эффективно использовать пектин или участвовать в межвидовом перекрёстном питании (cross-feeding) с таксонами, метаболизирующими структуры пектина. Результаты 16S секвенирования и количественной ПЦР (qPCR) дали интересные, хотя и противоречивые результаты. Добавление пектина вызвало изменения в структуре сообщества, но эти изменения варьировались и зависели от состава сообщества конкретного донора, не воспроизводя ранее полученные результаты, например, бифидогенный ответ [185]. Это может быть связано с низким количеством пектина, использованным в этом исследовании (1%), либо пектин может не нацеливаться на конкретный таксон в сообществе, но использоваться множеством таксонов.

Влияние пектинов НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ на метаболическую активность кишечной микробиоты оценивали по содержанию короткоцепочечных жирных кислот (рисунок 5.20). В микробных сообществах обоих доноров пектины вызвали статистически значимое увеличение суммарного содержания КЦЖК, а концентрация РКЦЖК, образующихся преимущественно при ферментации аминокислот, при этом существенно не изменялась.

Надо отметить, что при использовании пектина НМ-ВСЭ статистически значимо увеличивались концентрации уксусной и масляной кислот, тогда как в присутствии ВМ-НСЭ возрастало только содержание уксусной кислоты. Такая

зависимость наблюдалась в сообществах обоих доноров, несмотря на различия в их исходном таксономическом составе. Полученные данные показывают, что структурные характеристики пектина влияют на соотношение образующихся КЦЖК даже в тех случаях, когда их суммарная продукция существенно не различается.

Особого внимания заслуживает увеличение содержания масляной кислоты при ферментации пектина НМ-ВСЭ, так как масляная кислота служит одним из основных энергетических субстратов для колоноцитов, обеспечивая при окислении около 70% их энергетических потребностей [273]. Уксусная, пропионовая и масляная кислоты участвуют в регуляции клеточного обновления и дифференцировки кишечного эпителия, а также в поддержании его барьерной функции [274, 275]. Их биологическое действие связано с активацией рецепторов, сопряжённых с G-белками (GPCR), и ингибированием гистондеацетилаз; последние эффекты особенно характерны для пропионовой и масляной кислот [276]. GPR41 и GPR43 это два рецептора свободных жирных кислот, которые активируются КЦЖК с длиной углеродной цепи менее шести атомов. В кишечнике, симпатической нервной системе и жировой ткани эти рецепторы выступают в роли энергетических сенсоров и регуляторов в ответ на пропионовую и уксусную кислоты, соответственно [276, 277]. КЦЖК также известны тем, что они участвуют в регуляции воспалительного ответа через эти GPCR-рецепторы, однако аллергическая реакция, вызванная пентановой кислотой в кератиноцитах, вероятно, зависит от Gq/11-связанного белкового рецептора, который не является GPR41 или GPR43. Это предполагает, что у КЦЖК могут быть ещё не выявленные рецепторы в организме [278]. Дифференцированное выделение КЦЖК для НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ пектина может способствовать поддержанию клеточного здоровья немного разными, но взаимодополняющими способами.

В заключение результаты данного исследования показали, что пектины с различной MW и СЭ по-разному влияют на структуру и функции кишечной микробиоты. В случае пектина НМ-ВСЭ структура сообщества изменялась в

зависимости от донора, при этом наблюдались изменения в уровнях *Acidaminococcus*, *Paraprevotella*, *Pseudoramibacter*, *Alistipes*, *Oscillospira* и *Fusobacterium*. В случае пектина ВМ-НСЭ были отмечены донорно-независимые изменения таксонов в семействе *Lachnospiraceae*. При оценке функций данные показали донорно-независимое увеличение продукции КЦЖК для обоих видов пектина НМ-ВСЭ и ВМ-НСЭ. Это было преимущественно за счёт уксусной кислоты, уровень которой увеличился в 1,64 раза в период лечения для обоих используемых пектинов. Однако, добавление НМ-ВСЭ пектина увеличило уровень масляной кислоты в 1,41 раза. Эти данные подтверждают, что структура пектина влияет на его способность использоваться кишечной микробиотой, что напрямую связано с его потенциалом в качестве пребиотика.

5.3. Влияние добавления растворимых и нерастворимых биополимеров на количество бактерий, продуцирующих короткоцепочечные жирные кислоты в микробиоте кишечника.

5.3.1. Влияние типа добавок на состав микробиоты кишечника.

В этой части работы изучали влияние растворимой (SF) и нерастворимой (ISF) фракций биополимеров на кишечную микробиоту исследовали с применением системы SHIME и инокулюм из трёх доноров. После двухнедельного периода стабилизации микробиоты [187], отбирали образцы для определения таксономического состава методом секвенирования гена 16S рРНК.

При оценке таксономического богатства выявлены различия в реакции микробных сообществ на введение SF и ISF (рисунок 5.21А). Изменения просветных и слизистых сообществ имели схожесть с каждым донором, но выраженность ответа различалась между донорами. Между фракциями наблюдались статистически значимые различия преимущественно в проксимальном отделе толстой кишки у доноров 1 и 3.

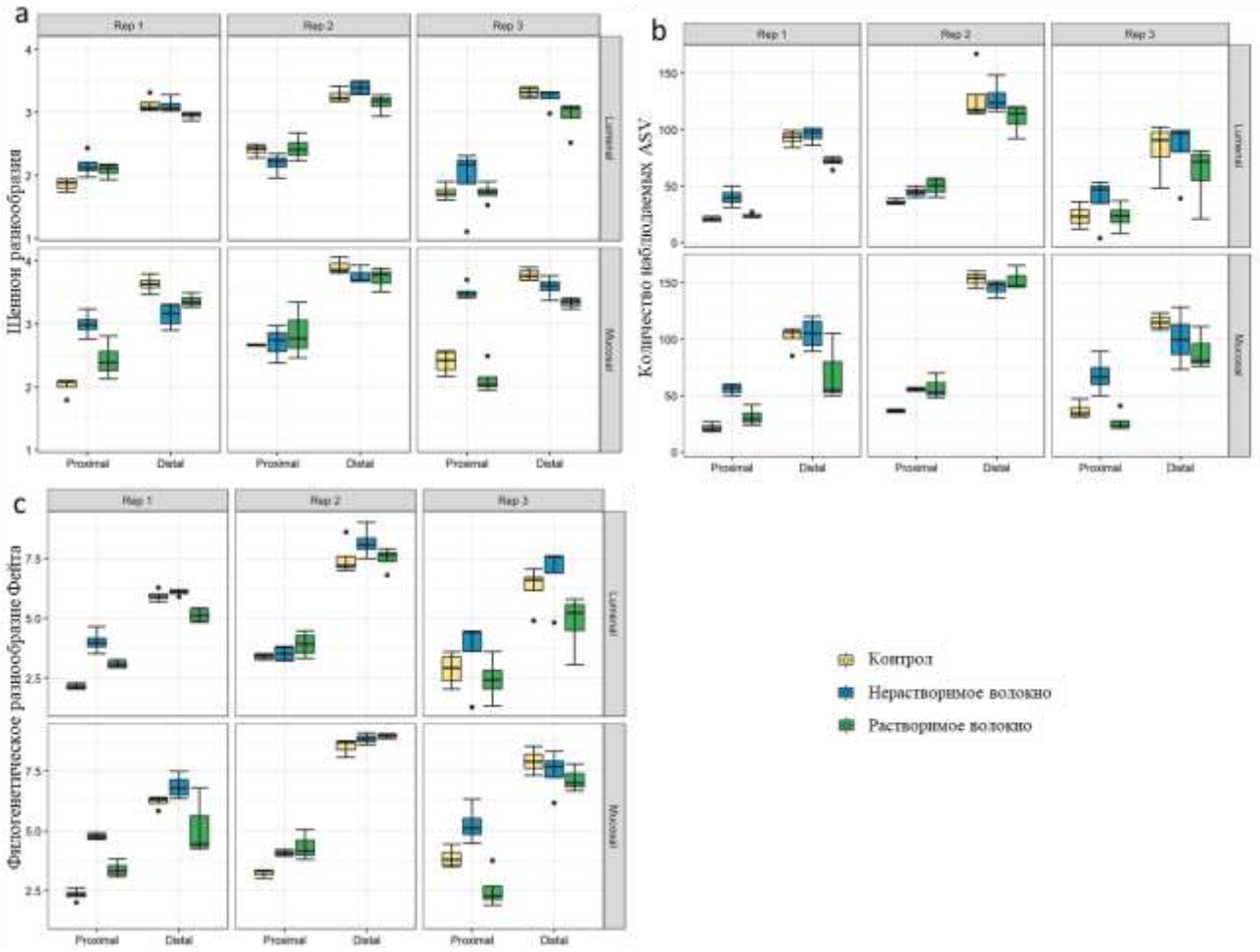


Рисунок 5.21. - Анализ альфа-разнообразия при обработке биополимеров ISF и SF. Для данного анализа доноры 1-3, а также просветная и слизистая фазы разделены. Для всех мер PC – и DC – отделы значительно различаются. A) Индекс разнообразия Шеннона для слизистых образцов. B) Количество наблюдаемых ASV (вариантов ампликонов) для просветных и слизистых образцов. C) Филогенетическое разнообразие по Фейту в просветной фазе и в слизистой фазе ISF

Однако у донора 2 не было значительных различий между условиями. Индекс разнообразия Шеннона (Рисунок 5.21B) использовался для изучения гетерогенности микробного сообщества; и мы снова обнаружили, что сообщества донора 2 продемонстрировали иной паттерн по сравнению с донорами 1 и 3. У доноров 1 и 3 была обнаружена, что добавление ISF увеличивает разнообразие микробных сообществ PC до уровней, превышающих как SF, так и контроль. Однако в DC просветных сообществах добавление ISF не

влияло на разнообразие микробов, тогда как добавление SF вызвало снижение разнообразия. В слизистой фазе мы наблюдали уменьшение разнообразия как при добавлении как ISF, так и SF по сравнению с контролем. Последней мерой альфа-разнообразия, использованной для анализа этих микробных сообществ, было филогенетическое разнообразие Фейта (Рисунок 5.21C), использованное для выявления изменений по филогении, а не только по таксонам. По данному показателю мы обнаружили схожий паттерн. У донора 2 не было значительных изменений в разнообразии, связанных с добавлением биополимеров, тогда как у доноров 1 и 3 наблюдалось увеличение разнообразия при добавлении ISF, особенно в PC – отделе. Аналогично другим обсуждаемым мерам альфа-разнообразия, в DC – отделе мы наблюдали снижение разнообразия при добавлении SF по сравнению с контролем.

Далее был выполнен анализ взвешенного UniFrac для изучения изменений в бета-разнообразии. На Рисунке 5.22 эти результаты были разделены по регионам толстой кишки (PC и DC) и фазам (просветная и слизистая). Аналогично данным по альфа-разнообразию, мы обнаружили, что в большинстве случаев микробиота донора 2 наиболее отличалась от микробиоты других двух доноров и от типа обработки, указывая на то, что донор является самым важным фактором в реакции на добавление волокон. В графиках для DC и слизистой области сообщества были очень схожи, причем донор 3 показал наибольшие различия в дистальной слизистой области. Сообщества PC были более разнообразны по сравнению с сообществами DC, а наибольшее количество изменений между обработками наблюдалось в проксимальных слизистых сообществах. Анализ PERMANOVA показал, что добавки как SF, так и ISF приводили к значительным изменениям в бета-разнообразии по сравнению с контролем, однако между собой эти добавки значительных различий не показали. В целом, этот анализ показывает, что наибольшие различия в микробном разнообразии для этих сообществ зависят от донора, а не от типа добавки.

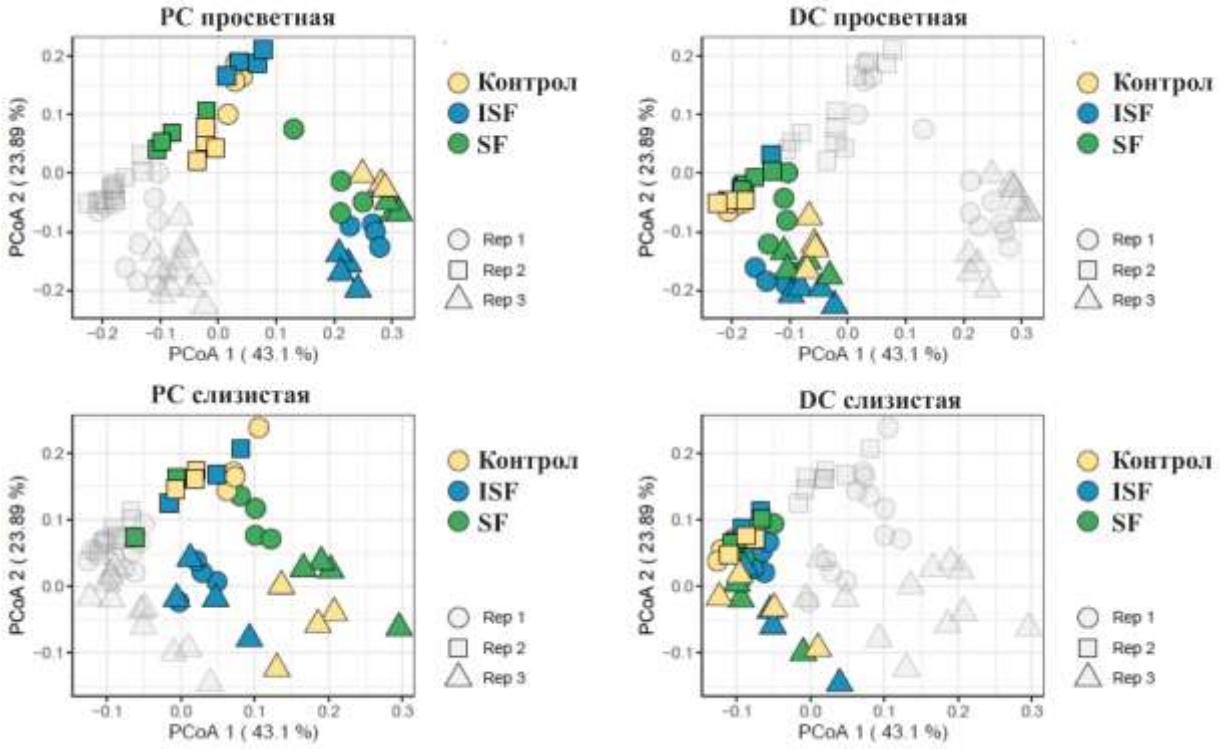


Рисунок 5.22. - Изменения в сообществе согласно анализу Weighted UniFrac. (PERMANOVA: контрольная группа значительно отличается от группы с ISF и группы с SF ($p < 0,05$); между группами с добавлением ISF и SF значительных различий не обнаружено)

5.3.2. Изменения в таксономической структуре микробиоты кишечника после добавление растворимого и нерастворимого волокон для каждого донора

Хотя результаты анализа UniFrac показали, что как SF, так и ISF вызвали изменения в микробных сообществах в одинаковой степени, этот анализ не дал информации о том, какие таксоны реагировали на эти добавки. Используя данные секвенирования, изменения, вызванные добавлением SF и ISF, были определены на основе относительной численности микробиоты на уровне типа. Аналогично результатам анализа альфа-разнообразия и UniFrac, добавление биополимеров SF и ISF привело к изменению таксономической структуры на уровне типа, зависящему от донора (рисунок 5.23). На этом уровне мы обнаружили, что обе обработки вызвали заметное, но статистически не значимое увеличение численности *Actinobacteria* в сообществах донора 1, а также значительное ($q < 0.0001$) увеличение *Fusobacteria* в DC-регионе в просветной фазе.

Увеличение относительной численности *Fusobacteria* также наблюдалось у донора 3, но только при добавлении растворимой фракции биополимеров (SF; $q < 0,05$). Анализ таксономического состава мукозо-ассоциированных сообществ на уровне типов выявил сходную закономерность. При этом в мукозо-ассоциированных сообществах преобладание *Firmicutes* было более выраженным, чем в просветных (рисунок 5.23).

Далее оценивали относительную численность трёх бактериальных семейств *Bifidobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* и *Lactobacillaceae*, представители которых участвуют в ферментации пищевых волокон и образовании КЦЖК (рисунок 5.24). Семейство *Bifidobacteriaceae* занимало заметное место в сообществах доноров 1 и 3. У донора 1 добавление как нерастворимой (ISF), так и растворимой (SF) фракции сопровождалось статистически значимым увеличением его относительной численности в просветном сообществе по сравнению с контролем ($q < 0,0005$ и $q < 0,5$ соответственно). В слизистой фазе относительная численность *Bifidobacteriaceae* значительно увеличивалась с добавлением биополимеров SF и ISF; представленность *Lachnospiraceae* значительно уменьшалась при воздействии биополимеров ISF и SF ($q < 0,0005$; $q < 0,05$), а относительная численность *Lactobacillaceae* ($q < 0,0005$) значительно уменьшилась при воздействии биополимера SF в РС-отделе донора 1.

У донора 2 отмечено значительное снижение относительной численности *Bifidobacterium* при обработке биополимерами ISF ($q < 0,005$) и SF ($q < 0,0005$) как в просветном, так и в слизистом сообществах РС-отдела, хотя общий уровень представленности *Bifidobacterium* в микробиоте кишечника у донора 2 был низкий. У донора 2 относительное обилие как *Lachnospiraceae*, так и *Lactobacillaceae* было значительно выше по сравнению с двумя другими донорами, но значительных изменений в численности ни одного из этих семейств при обработке биополимерами SF или ISF не наблюдалось.

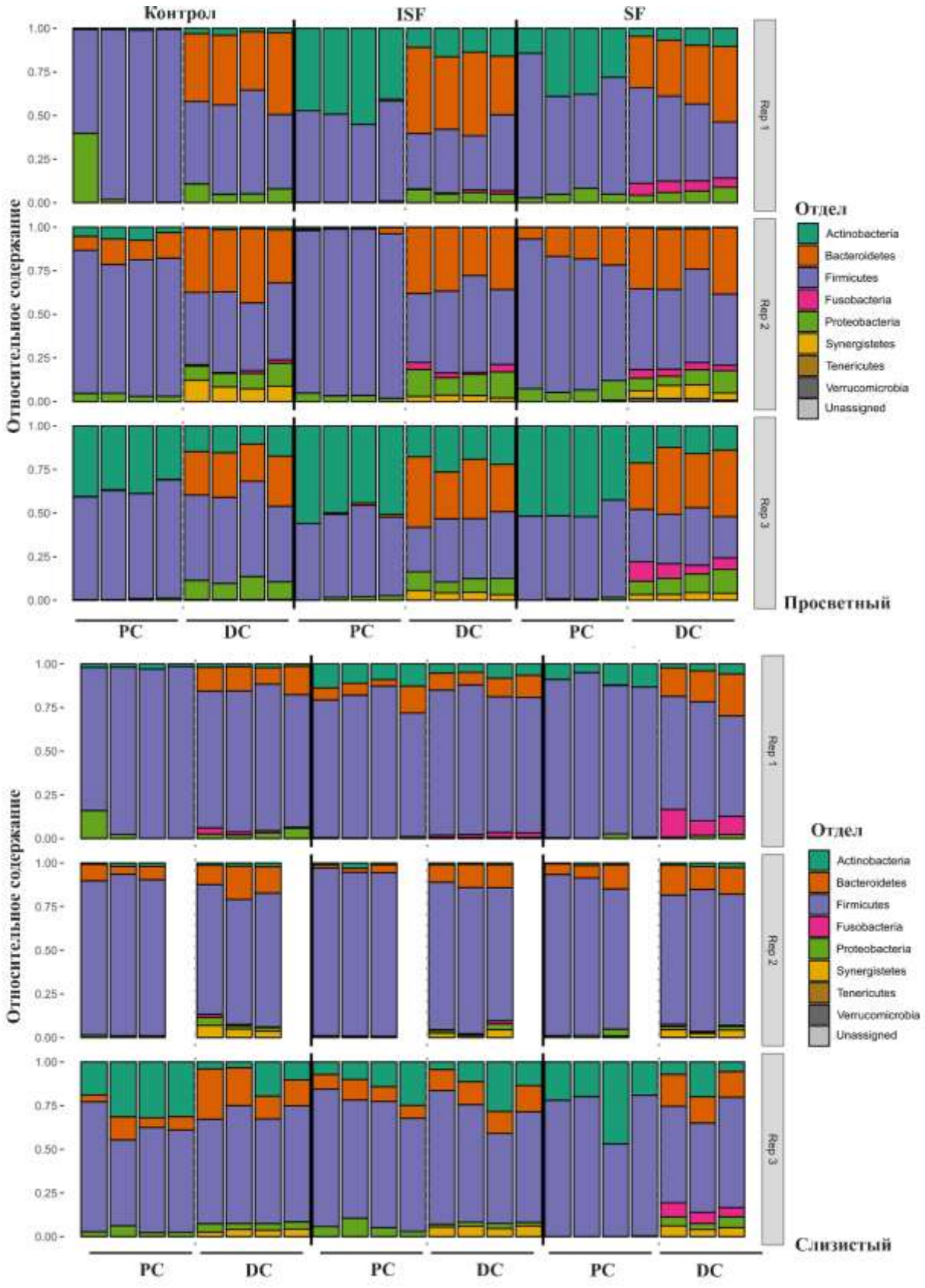


Рисунок 5.23. - Относительная численность сообществ на уровне типов в просветном и слизистом слоях

У донора 3 значительных изменений в относительной численности *Bifidobacterium* в зависимости от типа биополимерной добавки отмечено не

было, однако у донора 3 было обнаружено значительное относительное обилие количество *Bifidobacteriaceae* как в просветном, так и в слизистом сообществах, аналогично донору 1. Представленность *Lactobacillaceae* и *Lachnospiraceae* значительно увеличилась ($q < 0{,}0005$) при обработке биополимером ISF в просветной и слизистой фазах PC-отдела донора 3; но при этом следует отметить, что у этих семейств низкая численность у донора 3 в целом.

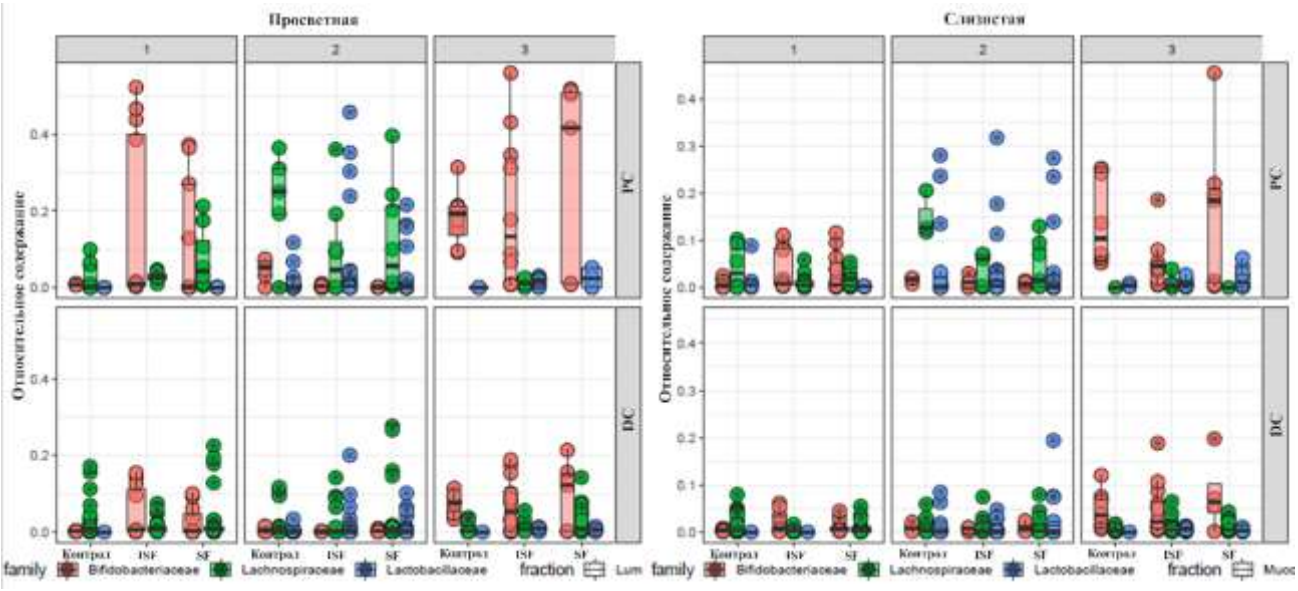
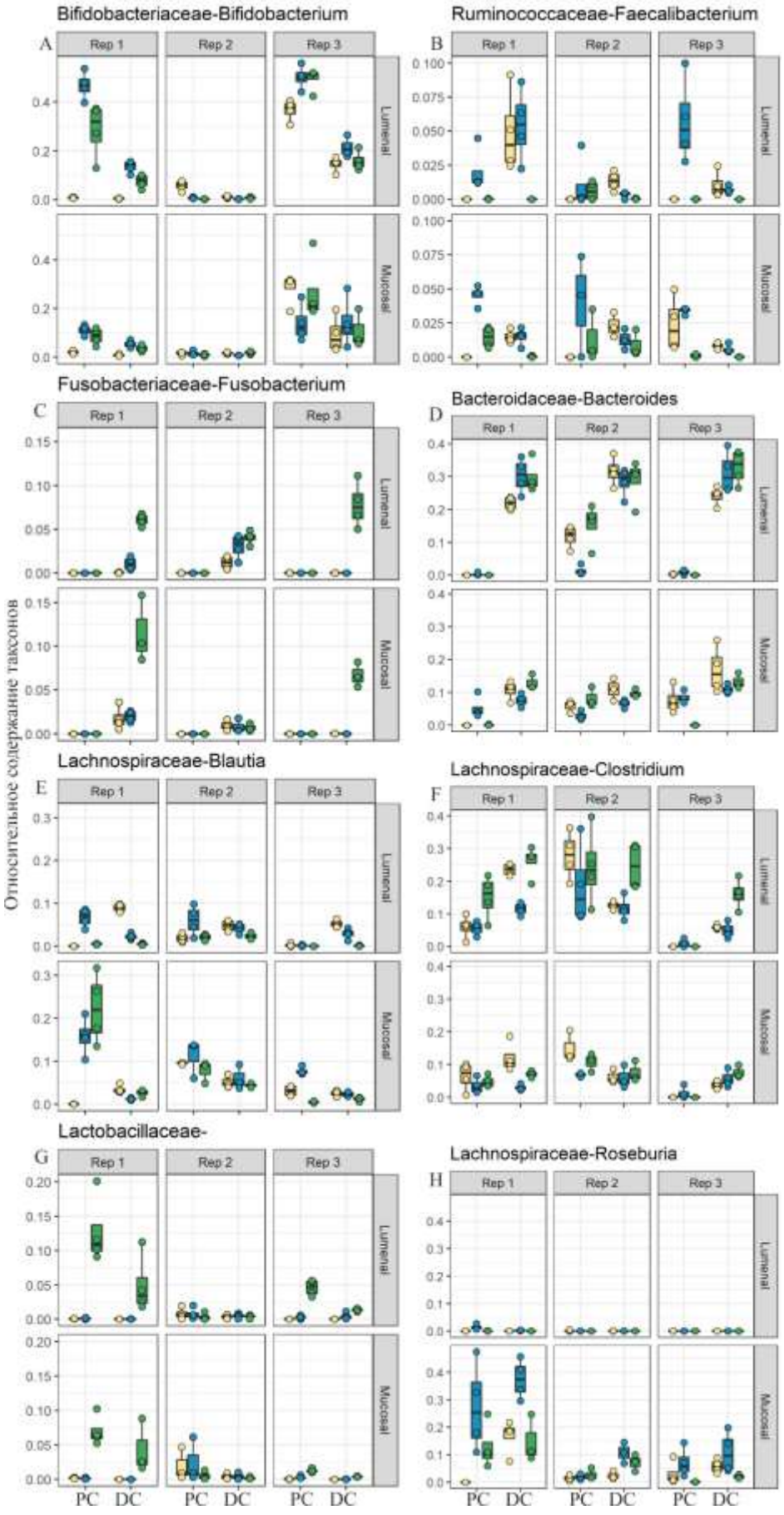


Рисунок 5.24. - Относительная численность трёх ключевых таксонов на уровне семейства

Для подробной оценки влияния растворимой (SF) и нерастворимой (ISF) фракций биополимеров анализировали изменения относительной численности отдельных бактериальных родов, участвующих в ферментации пищевых волокон или заметно реагировавших на их добавление (рисунок 5.25). Характер изменений зависел от донора, отдела кишечника и типа микробного сообщества.

У донора 1 внесение ISF сопровождалось увеличением относительной численности *Bifidobacterium* в просветных и слизистых сообществах проксимального отдела (PC; $q < 0{,}0005$), а в дистальном отделе наблюдалась аналогичная тенденция, но без статистической значимости. При добавлении SF численность *Bifidobacterium* возрастала в просветном сообществе PC, а у донора 3 в слизистом сообществе отмечалось снижение этого показателя, тогда как у донора 2 обе фракции вызывали значимое снижение численности *Bifidobacterium* в PC (ISF: $q < 0{,}05$; SF: $q < 0{,}0005$).



Контрол

ISF

SF

Рисунок 5.25. - Относительная численность трёх ключевых таксонов на уровне семейства

Увеличение относительной численности *Faecalibacterium* наблюдалось только при использовании ISF в просветных сообществах PC у доноров 1 и 3 (рисунок 5.25B). Для *Fusobacterium*, напротив, выраженный эффект отмечался при внесении SF: у донора 1 его численность значительно возрастала в просветных и мукозо-ассоциированных сообществах DC (рисунок 5.25C).

Одно из распространённых представителей кишечной микробиоты рода *Bacteroides*, статистически значимых изменений относительной численности при добавлении обеих фракций не выявлено (рисунок 5.25D). Семейство *Lachnospiraceae* характеризировалось наибольшим количеством таксонов, которые изменились в количественном отношении при добавлении растворимых и нерастворимых волокон; в частности, выраженная динамика отмечалась для родов *Blautia* и *Clostridium*.

Относительная численность *Blautia* (Рисунок 5.25E) в целом была более обильна в PC-сегменте, но увеличивалась в численности при добавлении биополимера ISF в просветной и слизистой фазах ($q < 0{,}005$ и $q < 0{,}05$ соответственно) у донора 1. При добавлении биополимера SF отмечалось увеличение относительного обилия *Blautia* в PC-сегменте донора 1 ($q < 0{,}05$) и в DC-сегменте донора 3 ($q < 0{,}05$). Относительная численность рода *Clostridium* (Рисунок 5.25F) значительно увеличивалась при добавлении нерастворимых пищевых волокон ISF у донора 1 в DC-сегменте, в просветной и слизистой фазах ($q < 0{,}05$). Аналогичное увеличение относительного обилия этого же рода отмечено а при добавлении растворимых пищевых волокон SF в DC-сегменте донора 3, в просветной и слизистой фазах ($q < 0{,}0005$). Род *Roseburia,* по-видимому, присутствует только в слизистой фазе ободочной кишки и его относительная численность статистически значимо не изменилась. Для этого таксона (Рисунок 5.25H) было обнаружено, что добавление биополимера ISF увеличивало его относительное обилие в сравнении с группой контроля и с образцами, содержащими SF, в PC- и DC-сегментах в слизистой фазе у донора 1**.** В то же время у остальных доноров представленность этого таксона в основном отмечалась в DC-отделе. Увеличение относительной численности *Roseburia* у

донора 1 было также отмечено в просветной фазе, но только в PC-сегменте, и это изменение не было статистически значимым. Ещё одна категория, неклассифицированные роды *Lactobacillaceae* (Рисунок 5.25G), показала значительное увеличение относительной численности при добавлении растворимых пищевых волокон SF в PC-отделе , однако это в основном касается доноров 1 и 3 ($q < 0{,}0005$). При этом у донора 1 также наблюдалось меньшее, но всё же статистически значимое увеличение представленности родов *Lactobacillaceae* в DC-сегменте ($q < 0{,}05$). В целом, полученные данные демонстрируют, что реакция на добавления волокон сильно зависит от индивидуальных таксонов и сообществ доноров.

5.3.3. Межиндивидуальные изменения в анализе короткоцепочечных жирных кислот

Чтобы понять, как добавление волокон повлияло на функциональные изменения микробиоты кишечника, был проведён GC–MS анализ концентрации КЦЖК для каждого донора в каждом условии (Таблица 5.2). Как видно, независимо от типа добавки, общая концентрация КЦЖК увеличивались в дистальном отделе ободочной кишки по сравнению с проксимальным отделом. Интересно, что доноры 2 и 3 с точки зрения концентрации КЦЖК, продемонстрировали схожие реакции на добавки, а реакция донора 1 была уникальной.

Например, концентрация уксусной кислоты увеличивалась при добавлении биополимеров как ISF-, так и SF-видов для донора 1 ($q < 0{,}0005$), но уменьшалась у доноров 2 и 3 ($q < 0{,}0005$). Концентрация пропановой кислоты снижалась в ответ на добавление биополимера ISF в PC-сегменте донора 1 ($q < 0{,}0005$) и DC-отделе донора 3 ($q < 0{,}05$), но увеличивалась у донора 2 как в PC-, так и в DC-сегментах ($q < 0{,}0005$). Обе группы добавок увеличивали концентрацию бутановой кислоты у доноров 2 и 3 в PC-сегменте. При этом отмечен такой факт: однако только добавление растворимых волокон SF только у донора 3 показала значительное изменение ($q < 0{,}0005$), в то время как добавление SF-фракции снизило концентрацию бутановой кислоты у донора 1 ($q < 0{,}0005$).

Таблица 5.2. - Корреляция концентрации жирных кислот между образцами просветной фазы. Статистическая значимость определялась по Тьюки с 95 % доверительного интервала и скорректированного значения *p* (* q < 0,05, ** q < 0,005, * q < 0,0005)**

		Донор 1		Донор 2		Донор 3	
		PC	DC	PC	DC	PC	DC
Общее кол-во КЦЖК	ISF против контроля	***	***	***	***	***	***
	SF против контроля	***	***	***	***	***	***
	ISF против SF		***		***		***
Общее кол-во РКЦЖК	ISF против контроля	***	***	***	***	***	***
	SF против контроля	***	***	***	***	***	***
	ISF против SF				***		***
Уксусная кислота	ISF против контроля	***	*			**	***
	SF против контроля	***			***	***	**
	ISF против SF						**
Пропановая кислота	ISF против контроля	***		***			*
	SF против контроля	***	***	***	*	*	***
	ISF против SF	***	***			**	***
2-метилпропановая кислота	ISF против контроля		***			***	*
	SF против контроля		***		*		
	ISF против SF		*	*	*	***	
Бутановая кислота	ISF против контроля		**			***	
	SF против контроля	***					
	ISF против SF	**					
3-метилбутановая кислота,	ISF против контроля		***			*	
	SF против контроля		***	*			
	ISF против SF			***	**	**	
2-метилбутановая кислота,	ISF против контроля		***			**	
	SF против контроля		***				
	ISF против SF			*		*	
Пентановая кислота	ISF против контроля						*
	SF против контроля						***
	ISF против SF				*		***

Концентрация пентановой кислоты была очень низкой у донора 1, но фиксировалась в DC-сегментах доноров 2 и 3. Добавление биополимера SF снижало уровень пентановой кислоты у обоих доноров, но значительное снижение наблюдалось только у донора 3 (q < 0,05). Использование ISF-фракции вызывало увеличение концентрации пентановой кислоты у донора 2 (хотя это изменение не было статистически значимым) и уменьшение таковой – у донора

3 ($q < 0,05$). Разветвлённые КЦЖК (3-метилбутановая, 2-метилпропановая и 2-метилбутановая кислоты) показали схожие реакции на биополимерные добавки.

У донора 1 все три разветвлённые короткоцепочечные жирные кислоты (РКЦЖК) обнаруживались только в дистальном отделе (DC). Добавление как растворимой (SF), так и нерастворимой (ISF) фракции рисовых отрубей сопровождалось статистически значимым увеличением их концентраций ($q < 0,0005$). У донора 2 добавление SF приводило к снижению содержания всех трёх РКЦЖК в проксимальном (PC) и дистальном (DC) отделах. При использовании ISF в PC-отделе наблюдалось увеличение концентраций 3-метилбутановой и 2-метилпропановой кислот, однако эти изменения не достигали статистической значимости. У донора 3 добавление ISF сопровождалось увеличением концентраций всех трёх РКЦЖК в обоих отделах кишечника (таблица 5.2). При обработке SF их содержание в PC-отделе практически не отличалось от контроля, тогда как в DC отмечалось небольшое снижение. Эти данные, наряду с результатами анализа разнообразия микробных сообществ и численности таксонов, подтверждают, что реакция микробиоты кишечника на биополимерные добавки SF и ISF зависит в значительной степени от исходного микробного сообщества.

Анализ структуры микробного сообщества и метаболического профиля КЦЖК показал высокую индивидуальную изменчивость в ответе микробиоты кишечника на биополимерные добавки SF и ISF. Поскольку каждый микробиом уникален, эта изменчивость была ожидаема. Однако мы предположили, что, хотя таксономический и функциональный ответ может зависеть от начальной структуры сообщества у доноров, генные пути, обогащённые за счёт SF- и ISF-биосубстратов, будут схожими и не будут определяться индивидуальной изменчивостью.

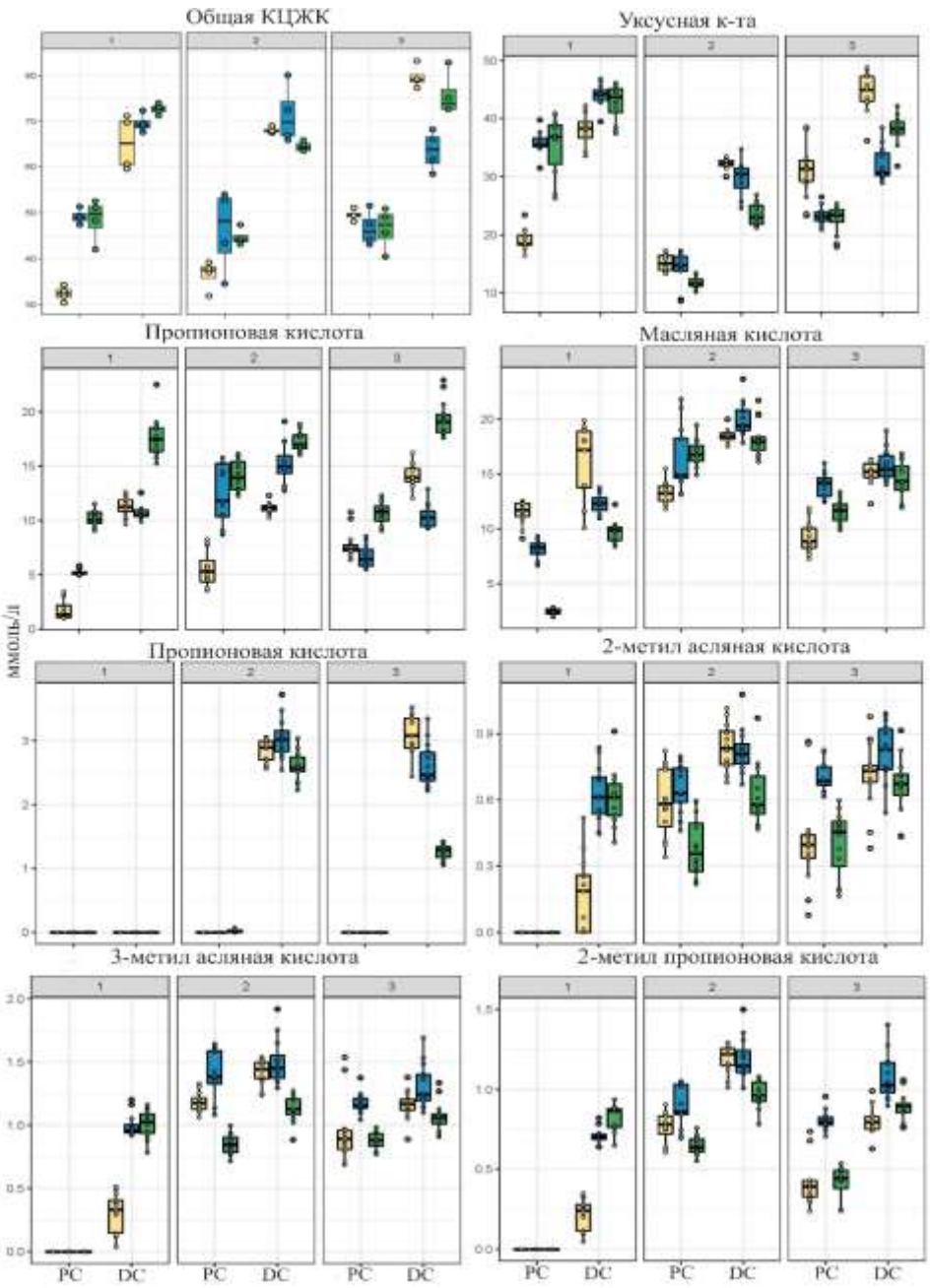


Рисунок 5.26. - Концентрация КЦЖК. Цвета соответствуют предыдущим рисункам: жёлтый обозначает контроль, синий — нерастворимые пищевые волокна ISF, зелёный – растворимые пищевые волокна SF. Значимость была определена с помощью метода множественных сравнений Тьюки, * = q < 0,05; ** = q < 0,01; * = q < 0,001; **** = q < 0,0001**

5.3.4. Зависимость метаболизма полисахаридов от разных доноров в зависимости от типа добавки

Поэтому для предсказания присутствия генов, которые могут быть ответственны за метаболизм целлюлозы в этих микробных сообществах

кишечника, использовался алгоритм PICRUSt2. Часть этого метаболического пути показана на рисунке 5.27, где отражены ферменты, чья активность была существенно изменена в результате использования добавок SF или ISF. Соответствующие таксоны для каждого фермента показаны на сопутствующих тепловых картах. На этом рисунке видно, что *Lachnospiraceae* является основным участником ферментов, участвующих в преобразовании целлюлозы в целлобиоз. При этом некоторые представители семейства *Lachnospiraceae* ассоциируются только с определёнными типами добавок. Например, род *Coprococcus* присутствует только в условиях контроля и использования ISF-добавки, а *Roseburia* – при использовании как ISF, так и SF, но отсутствует в условиях контроля для целлюлазы (EC3.2.1.4).

Lactobacillus delbrueckii ассоциируется с сахарозофосфорилазой (EC 2.4.1.7), левансахаразой (EC 2.4.1.10) и декстрансахаразой (EC 2.4.1.5) и проявляет большую численность при добавлении ISF- и SF-волокон по сравнению с контролем. (EC 2.4.1.7). Повышенная представленность рода *Bifidobacterium* и ассоциированных с ним генов сахарозофосфорилазы (EC 2.4.1.7) чаще отмечалась при добавлении SF-биополимеров в сравнении с контрольными образцами и группой с ISF, в которых эти показатели были ниже.

Согласно нашим данным по относительному количеству, представленным выше, *Bifidobacterium* в основном присутствует у доноров 1 и 3, в то время как у донора 2 преобладает вид (Рисунок 5.24). Полученные результаты позволяют предположить, что *Bifidobacterium* и *Lactobacillus delbrueckii* могут выполнять сходные функции при ферментации исследуемых полисахаридов. Такая функциональная взаимозаменяемость микроорганизмов, вероятно, обеспечивает способность микробных сообществ разных доноров использовать одни и те же пищевые волокна, несмотря на различия в их таксономическом составе.

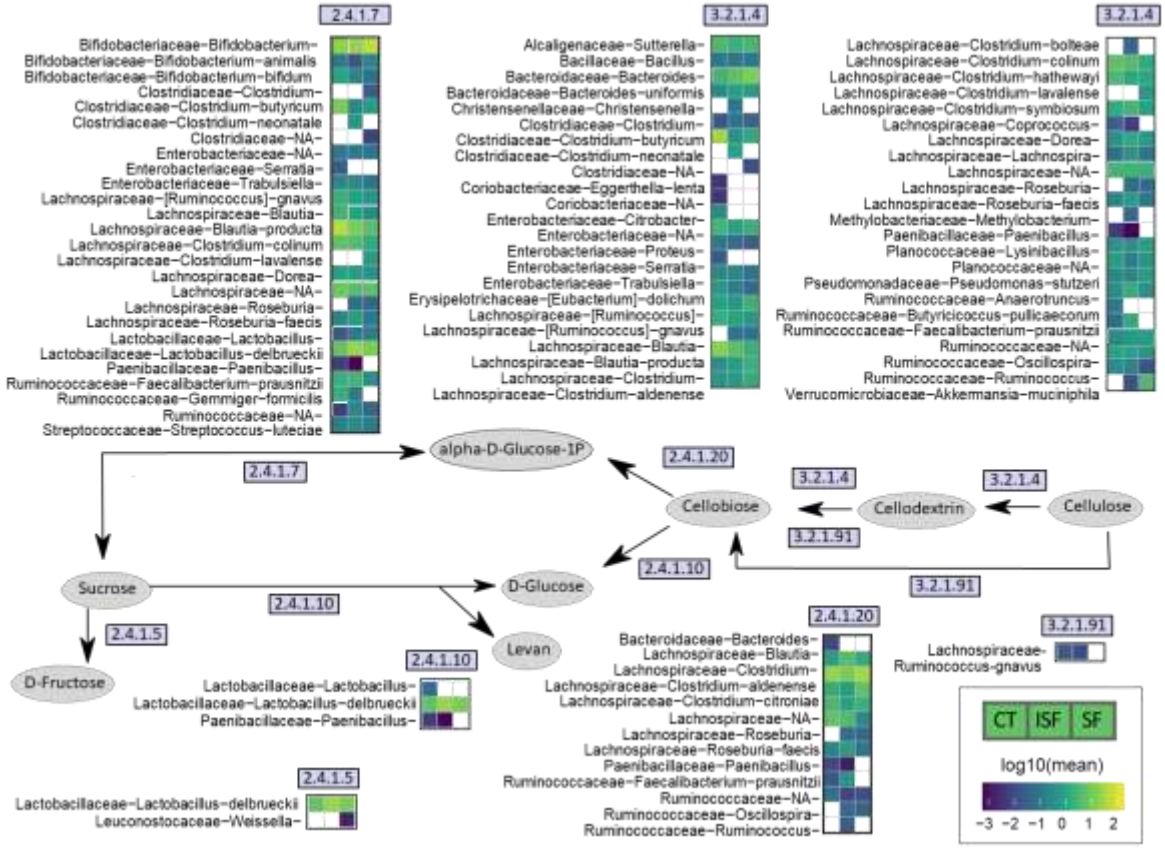


Рисунок 5.27. - Упрощённый путь метаболизма целлюлозы. На этом рисунке показана часть пути метаболизма целлюлозы кишечной микробиотой, где с помощью номеров EC обозначены гены, связанные с ферментами, участвующими в процессе, и которые существенно изменяются при добавлении ISF- или SF-биосубстратов. Тепловые карты демонстрируют специфические таксоны, связанные с каждым ферментом, и могут потенциально способствовать его активности

Изменение характера питания, связанное с индустриализацией и распространением западного образа жизни, сопровождается увеличением потребления переработанных продуктов и снижением доли пищевых волокон в рационе. Эти изменения рассматриваются среди факторов, способствующих развитию воспалительных заболеваний кишечника, ожирения, сахарного диабета и других метаболических нарушений [279, 280]. В литературе приводится, что есть возможность сохранения снижения разнообразия кишечной микробиоты в следующих поколениях при недостаточном потреблении овощей, цельнозерновых продуктов и других источников клетчатки [281].

В связи с этим изучение влияния SF и ISF фракций полисахаридов на структуру и функциональную деятельность кишечной микробиоты является актуальным. Анализ таксономического состава показал, что обе фракции вызывали изменения микробных сообществ, но их характер и выраженность зависели от донора. Добавление ISF сопровождалось увеличением α-разнообразия по сравнению с SF и контрольными образцами.

Традиционно растворимые пищевые волокна ассоциируются как доступные для микробной ферментации, а нерастворимые считаются мало ферментируемыми. Полученные нами результаты показывают, что ISF способны изменять состав кишечной микробиоты и эти данные коррелируются с исследованиями других авторов, которые изучили нерастворимую клетчатку других растительных источников [282, 283]. В частности, было установлено, что нерастворимые волокна сои повышали разнообразие кишечной микробиоты мышей, изменяли относительную численность отдельных бактериальных групп и увеличивали образование КЦЖК. Эти данные свидетельствуют о возможности микробной ферментации нерастворимых пищевых волокон [282]. В другом исследовании *in vitro* с использованием человеческих фекалий в качестве исходного материала было обнаружено, что использование нерастворимых волокон из соевых оболочек изменяло микробиоту кишечника за счёт увеличения альфа-разнообразия и повышения содержания определённых таксонов, включая *Bifidobacterium* [283]. В нашем исследовании мы наблюдали аналогичное увеличение альфа-разнообразия с ISF-биосубстратом, однако изменения в количестве *Bifidobacterium* были более переменными и сильно зависели от донора, типа сообщества и области ободочной кишки (PC- или DC-сегменты).

Ещё одним таксоном, относительная численность которого значимо возросла в PC-сегменте у всех доноров при добавлении ISF-фракции в нашем исследовании, был *Faecalibacterium*. Виды *Faecalibacterium* ассоциируются с меньшей частотой воспалительных заболеваний кишечника и других болезней, связанных с воспалением толстого кишечника, и как показано, продуцируют КЦЖК, включая ацетат и бутират [284]. Повышение содержания рода

Faecalibacterium при добавлении ISF-биополимера может способствовать увеличению ацетата и бутирата, что было отмечено у некоторых наших доноров.

Семейство *Lachnospiraceae*, представленность которого значительно изменилась в относительной численности при добавлении SF- или ISF-биосубстратов, является важным производителем КЦЖК, более высокая продукция которых связана с улучшением состояния здоровья [260, 285, 286]. Однако влияние различных представителей *Lachnospiraceae* на здоровье человека вызывает споры. *Blautia* и *Roseburia*, два рода, увеличившиеся в относительном обилии с добавлением ISF- и SF-фракций в сравнении с группой контроля, являются основными производителями КЦЖК и**,** как было показано ранее, обладают противовоспалительными свойствами и способствуют поддержанию здоровья иммунной системы [267, 287].

Процесс ферментации диетических волокон микробиотой кишечника приводит к образованию КЦЖК, которые являются важными метаболитами для здоровья кишечника и организма в целом. Например, ацетат облегчает симптомы старения в кишечнике мышей [288]. Производство бутановой кислоты, в частности, известно своим влиянием на образование плотных соединений в кишечнике, что улучшает его барьерную функцию [289].

Бутират также связан с выработкой слизи бокаловидными клетками толстой кишки [290]. Пропионовая кислота проявляет противовоспалительные эффекты, улучшает чувствительность к инсулину и способствует насыщению [291]. Результаты исследования показали, что добавление пищевых волокон рисовых отрубей влияло на образование короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК), однако характер изменений зависел от донора. Наиболее устойчивый эффект наблюдался для пропионовой кислоты: при добавлении растворимой фракции (SF) её концентрация статистически значимо увеличивалась у всех трёх доноров как в проксимальном (PC), так и в дистальном (DC) отделах по сравнению с контролем. При использовании нерастворимой фракции (ISF) реакция микробных сообществ была менее однородной.

Для уксусной кислоты зависимость от донора была более выраженной. У донора 1 добавление обеих фракций сопровождалось увеличением её концентрации, тогда как у донора 3 наблюдалось снижение. При этом в контрольных реакторах донора 3 исходное содержание уксусной кислоты уже было одним из наиболее высоких. Сходная закономерность отмечалась для масляной кислоты. У доноров 2 и 3 её концентрация при добавлении SF и ISF увеличивалась или оставалась близкой к контрольным значениям, тогда как у донора 1 наиболее высокое содержание отмечалось в контрольных образцах. Возможно, сообщества с изначально высокой продукцией отдельных КЦЖК обладали меньшим потенциалом дальнейшего увеличения их концентраций при добавлении пищевых волокон.

Индивидуальные различия в образовании КЦЖК согласуются с изменениями относительной численности бактериальных групп, участвующих в их продукции. Добавление SF и ISF влияло на состав этих групп, однако направленность и выраженность изменений зависели от исходного состояния микробного сообщества. Увеличение численности бактерий, участвующих в образовании КЦЖК, наряду с изменениями метаболитного профиля указывает на возможность положительного влияния исследуемых фракций на функциональную активность кишечной микробиоты.

Таким образом, растворимая и нерастворимая фракции пищевых волокон рисовых отрубей вызывали изменения состава и метаболической активности кишечной микробиоты, различавшиеся между донорами и отделами толстой кишки. Полученные результаты подтверждают значение исходного состава микробных сообществ для их реакции на пищевые субстраты и согласуются с литературными данными о высокой межиндивидуальной вариабельности кишечной микробиоты [292]. Эти особенности необходимо учитывать при изучении действия пищевых волокон и разработке подходов к персонализированному питанию. Результаты также показывают перспективность дальнейшего исследования обеих фракций рисовых отрубей в

качестве компонентов функциональных пищевых продуктов с привлечением большего числа доноров.

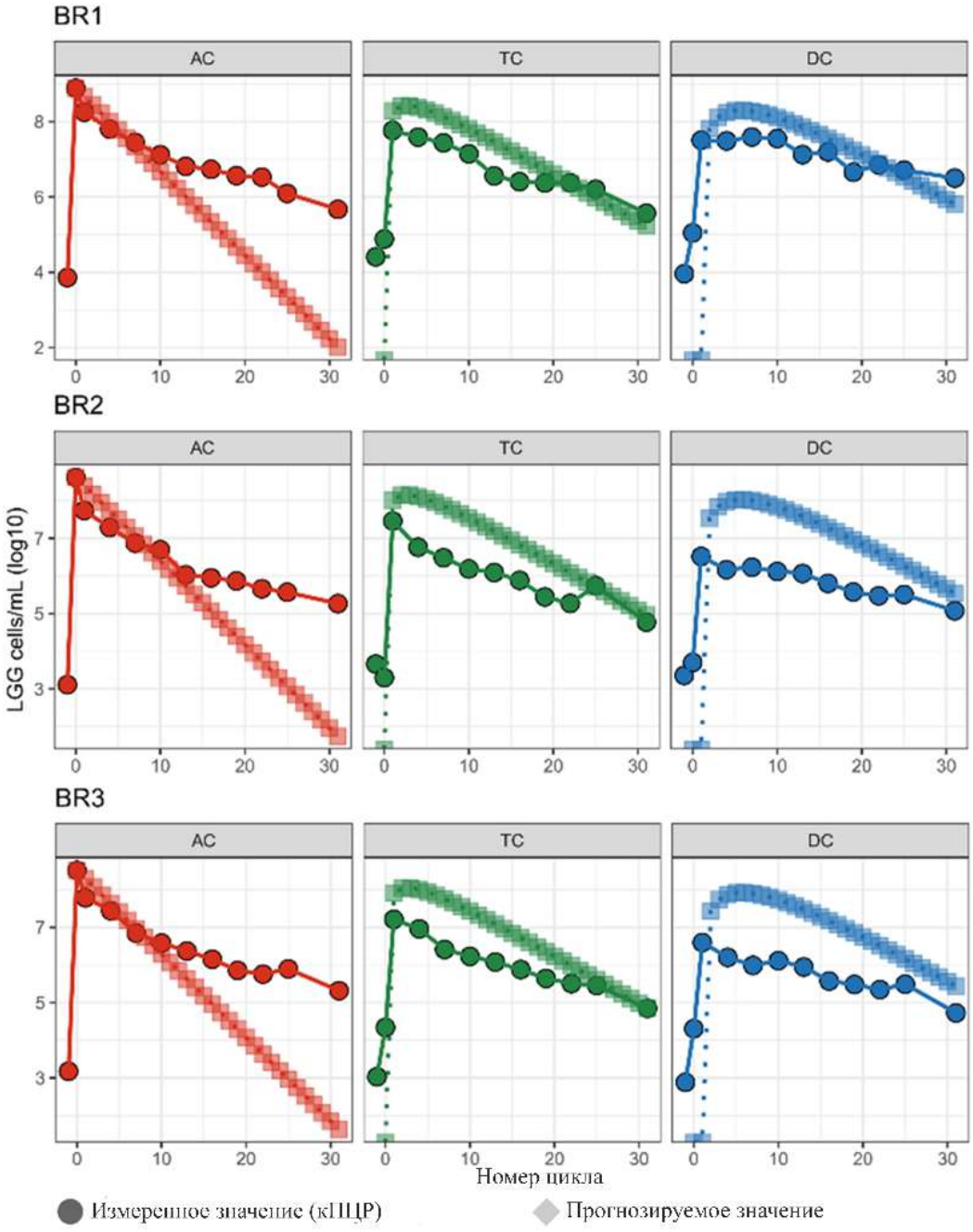
5.4. Стойкость пробиотического штамма *Lacticaseibacillus rhamnosus GG* (LGG) в *in vitro*- модели микробиома кишечника

5.4.1. Выживание и рост LGG в многокамерной *in vitro* - модели толстой кишки

В данном исследовании были изучены профили выживания и роста LGG в условиях *in vitro* с использованием платформы SHIME, представляющей собой многокамерное *in vitro*-устройство, предназначенное для имитации процессов в восходящем (AC), поперечном (TC) и нисходящем (DC) отделах толстой кишки [187, 293]. Эксперимент проводился в трёх биологических повторностях с использованием образцов фекального инокулята, полученных от трёх независимых доноров, и обозначенных как биологические репликаты 1–3 (BR1, BR2 и BR3).

Эндогенная концентрация LGG в трёх смоделированных отделах толстой кишки варьировала от $1{,}3 \times 10^3$ до 8×10^4 клеток/мл. У BR1 наблюдалась концентрация, в 10 раз превышающая концентрацию LGG у BR2 и BR3. После введения экзогенного LGG в SHIME-систему было определено процентное содержание этого штамма в сообществах в разных отделах толстой кишки**.** Сразу после увеличения концентрации LGG в AC-сегменте (вследствие его введения), во всех трёх моделях наблюдалось резкое снижение численности популяции данного штамма в просветной фазе всех отделов (AC, TC, DC) в течение первых 7–10 циклов кормления, за которым следовало более медленное, но постоянное снижение до конца эксперимента (Рисунок 5.28). В конце эксперимента измеренное содержание LGG в отделах AC, TC и DC каждого сообщества было

в 7–540 раз (на 1–2 порядка (лога)) выше, чем в исходном сообществе (Рисунок



5.29).

Рисунок 5.28. - Сохранение и репликация штамма LGG в биореакторах. Для каждого из трёх биологических репликатов показаны прогнозируемые количества клеток LGG по модели без роста по сравнению с измеренными (qPCR) количествами клеток LGG для каждого биореактора (AC, TC, DC) в течение 31 цикла транзита. Прогнозируемые количества обозначены кружками

В этом исследовании показатели выживаемости и роста LGG также были зависимы от донора. У BR2 и BR3 наблюдалось снижение содержания LGG в

последовательности AC > TC > DC в течение экспериментального периода. В сообществе донора BR1 содержание LGG в AC-сегменте было выше, чем в TC- и DC-отделах до 7-го цикла кормления, после чего концентрация штамма в DC-отделе стала выше, чем в AC- и TC-регионах (Рисунок 5.28 - 5.30).

Затем мы измерили способность LGG колонизировать муциновые носители, добавленные в каждую симулированную область кишечника, чтобы представить слизистую поверхность в ЖКТ. Как показано на рисунке 5.30, содержание LGG в муциновых носителях было низким, на 1–2 порядка меньше, чем в просветной фазе (Рисунок 5.29 и Рисунок 5.30).

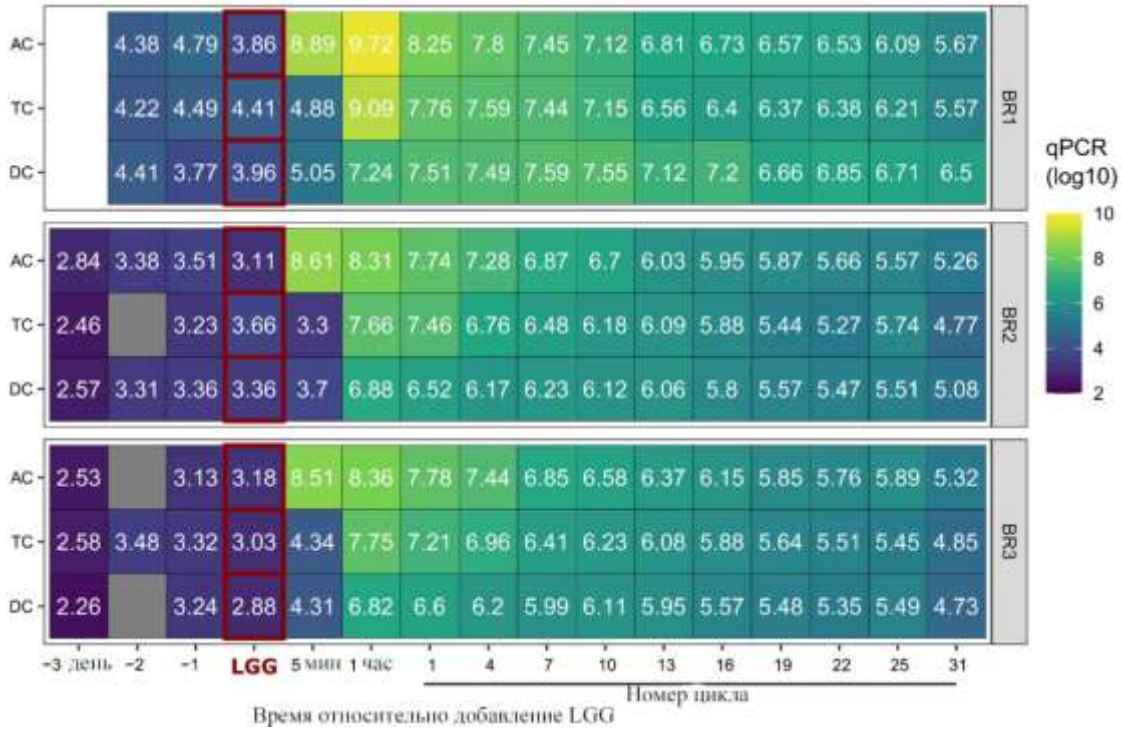


Рисунок 5.29. - Число клеток LGG в просветных пробах. Тепловая карта, показывающая количество клеток штамма LGG по данным qPCR в просветных пробах для каждого из трёх биологических репликатов (BR1, BR2, BR3)

Демонстрируя аналогичную тенденцию, наблюдаемую в просветной фазе, содержание LGG в муциновых носителях во всех областях кишечника уменьшалось по мере увеличения времени ферментации. Однако скорость снижения была более умеренной в сравнении с просветной фазой, с уменьшением только на 1 порядок в течение всего экспериментального периода.

К концу эксперимента содержание LGG в муциновых носителях оставалось выше, чем в исходных сообществах, увеличившись в 1,5–27 раз с момента начала до окончания эксперимента, за исключением области AC у BR1, где содержание увеличилось с нуля до 1,28 × 10^5 клеток/мл.

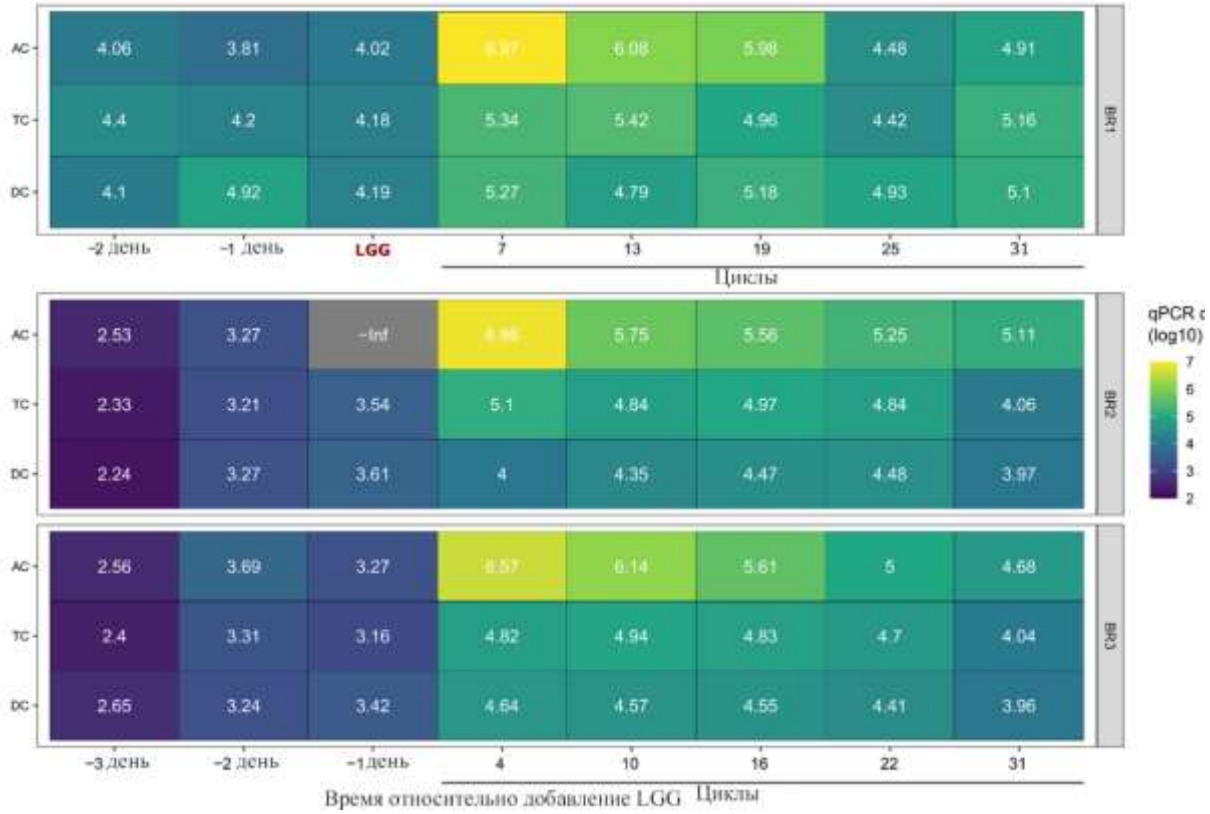


Рисунок 5.30. - Число клеток штамма LGG в слизистых пробах. Тепловая карта, показывающая количество клеток штамма LGG по данным qPCR в слизистых пробах для каждого из трёх биологических репликатов (BR1, BR2, BR3).

Поскольку эндогенные концентрации LGG для трёх биорепликатов (BR1, BR2, BR3) были постоянными и считались базовым уровнем, это количество было вычтено из измеренного для определения количества LGG, выжившего или размножившегося после пробиотического лечения. Для подтверждения мы сравнили измеренное количество с теоретически рассчитанным содержанием LGG, основанным на уравнении, рассчитывающем снижение введённого LGG с течением времени из-за разбавления на каждом цикле кормления (Рисунок 5.28).

5.4.2. Оценка способности штамма LGG к колонизации в сравнении с его временным пребыванием в системе

В соответствии с теоретической моделью (без учёта репликации клеток), после однократного внесения штамма LGG его численность должна закономерно снижаться. Подобная тенденция обусловлена постоянным разбавлением содержимого свежей питательной средой и вымыванием в процессе транзита через отделы системы SHIME. Это изменение было математически рассчитано с использованием механистической модели, описанной ниже. Эта модель предполагала, что роста не происходило, и потеря экзогенного LGG происходила после добавления клеток в SHIME. Клетки**,** связанные с муциновыми носителями, могли не учитываться (общий объём муцинового геля и содержание LGG на мл муцина невелики)**.** При этом предполагалось, что изменение численности бактерий в каждом биореакторе происходит дискретно – в моменты подачи среды и транзита содержимого между отделами. биореакторе происходило одновременно с кормлением и переходом из одной области в другую три раза в день. Изменение содержания LGG рассчитывалось с использованием механистической модели [294], которая приведена ниже:

Пусть $r(t)$ обозначает процент содержания поступающего потока в момент времени t. В течение временного интервала Δt, количество передаваемого содержания будет приблизительно равно $mr(t)\Delta t$, и отсюда следует, что общее количество передаваемого содержания будет равно:

$$\int_0^{t_0} mr(t)dt$$

Теорема о среднем значении позволяет записать следующее:

$$r_0(t_0 - 0) = \int_0^{t_0} r(t)dt$$

где $r(0) \leq r_0 \leq r(t_0)$, для некоторого r_0, а константа m сокращается. Уравнение для содержания в биореакторе имеет вид:

$$M_1 \int_0^{t_0} m\, r_1(t)dt + M_2 \int_0^{t_0} m\, r_2(t)dt = (M_1 + M_2) \int_0^{t_0} m\, r(t)dt$$

Это можно упростить до:

$$M_1 r_1 + M_2 r_2 = (M_1 + M_2) r$$

где r_1 – процент содержания в количестве M_1, а r_2 – процент содержания в количестве M_1, уже находящемся в биореакторе, и базовая формула тогда становится:

$$r = \frac{M_1 r_1 + M_2 r_2}{M_1 + M_2}$$

На основании приведённого уравнения рассчитывали ожидаемую численность клеток *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) при отсутствии их размножения и с учётом вымывания из системы. В расчётах использовали исходные значения LGG, определённые методом количественной ПЦР (qPCR) непосредственно после введения штамма в каждом эксперименте. Согласно уравнению, максимальная численность клеток обнаружили в AC, затем в TC и DC отделах. По-видимому, это связано с переносом клеток между реакторами при трёхкратном ежедневном добавление свежей питательной среды, которая переходит от AC в TC и из TC в DC. К 30-му циклу расчётная численность LGG во всех трёх отделах была нулевая (рисунок 5.30).

Таким образом, высокая численность штамма сохранялась в AC-отделе, а в TC и DC она была ниже ожидаемой и свидетельствует о сохранение и размножение LGG в восходящем отделе. По-другому это объясняется либо ограниченным переносом клеток из AC, либо их интенсивной элиминацией после поступления в TC и DC. При этом для экзогенного штамма, введённого в сформировавшееся микробное сообщество, возможны три варианта поведения: сохранение без размножения, закрепление с последующим ростом или постепенная элиминация.

Численность LGG, ассоциированного с муциновыми носителями, была на 1–2 порядка ниже, чем в просветных сообществах. Поэтому на основании полученных данных нельзя однозначно определить, в какой степени связывание

с муцином способствовало более длительному сохранению штамма в моделируемой кишечной среде [295, 296]. Необходимы дальнейшие исследования по оптимизации модели муцина *in vitro*. Считается, что для инородных микробов, таких как экзогенно добавленные пробиотики, крайне сложно закрепиться в уже существующей симбиотической экосистеме из-за интенсивной конкуренции за нишу и питательные вещества, особенно с эндогенным LGG. Ожидается, что в конечном итоге большинство экзогенно добавленных микробов будет удалено из-за массового потока при ежедневных циклах кормления [296, 297, 298].

5.5. Влияние на собственное микробное сообщество

Структурный состав микробного сообщества для каждого отдела толстой кишки в биорепликантах до и после добавления штамма LGG был охарактеризован с помощью секвенирования гена 16S рРНК. Сначала было измерено влияние LGG на альфа-разнообразие существующего микробного сообщества кишечника, в терминах индекса разнообразия Шеннона, видового богатства (наблюдаемые ASVs) и индекса филогенетического разнообразия Фейта (Faith’s P.D.). Поскольку экспериментальное добавление LGG в сообщество предположительно должно было увеличить эти значения, ASV LGG были удалены из таблицы признаков перед расчётом метрик альфа-разнообразия.

Индекс Шеннона отражает как численность, так и присутствие видов в каждой пробе; чем выше показатель, тем выше разнообразие. За исключением проб из области AC для BR1, значительных различий в индексе Шеннона между временными точками в любых отделах толстой кишки у трёх биорепликантов не наблюдалось (Рисунок 5.31a). Тем не менее, для всех трёх биорепликантов разнообразие и в TC-, и в DC-сегментах было значительно выше, чем в AC-отделе во всех временных точках. Это было похоже на предыдущие исследования, которые показывали, что сообщество AC имеет более низкое разнообразие в системе SHIME® [187, 293]. Эти результаты были подтверждены видовым богатством, отражающим количество видов (Рисунок 5.31b), и метриками филогенетического разнообразия Фейта, указывающими на степень

родства внутри сообщества (Рисунок 5.31c). В образце BR1 альфа-разнообразие оставалось преимущественно стабильным от поперечного до нисходящего отделов толстой кишки, в то время как в образцах BR2 и BR3 разнообразие продолжало увеличиваться вплоть до DC-сегмента включительно толстой кишки, в том числе по показателям общего видового богатства и филогенетического разнообразия Фейта. В совокупности это указывает на то, что влияние штамма LGG на общее альфа-разнообразие микробного сообщества было минимальным и временным, а любые эффекты были вторичными по отношению к более значимым межиндивидуальным и региональным различиям.

Исследование различий в общей структуре микробного сообщества (бета-разнообразие) показало аналогичную взаимосвязь между повторностью, участками и временными точками, как и в метриках альфа-разнообразия. Несмотря на индивидуальные различия, сообщества в AC-отделе более схожи друг с другом, чем подобные образцы TC- и DC-сегментов из тех же биоповторностей. Биологические образцы TC- и DC-областей у BR1 образуют плотные кластеры. Похожая картина наблюдалась и в микробном сообществе у донора BR2; однако в образцах донора BR3 в TC- и DC-сегментах формировались отдельные кластеры. У BR2 и BR3 микробные сообщества AC-отдела образовали один кластер, как и образцы DC-сегмента, что свидетельствует о низких межиндивидуальных различиях.

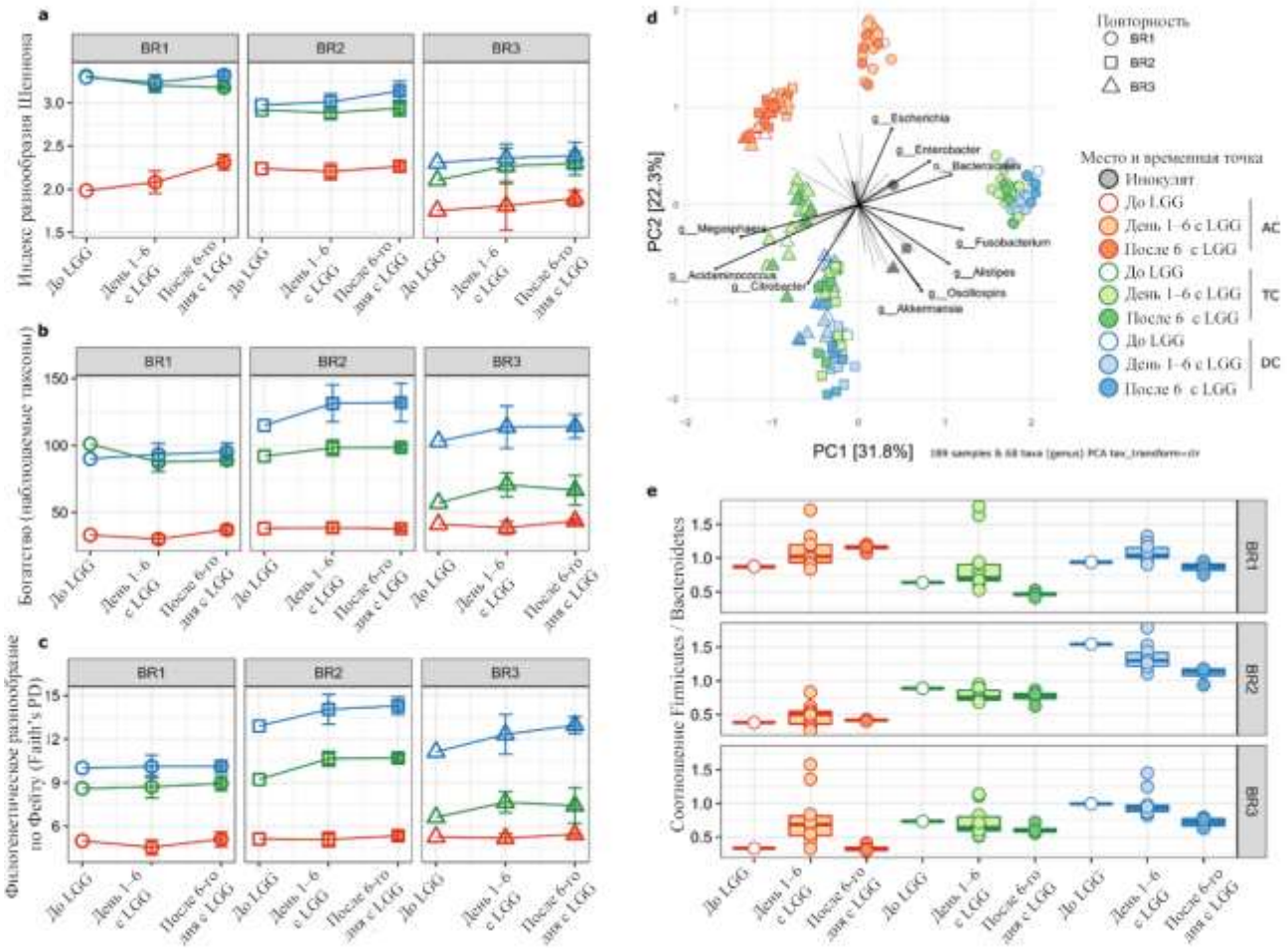


Рисунок 5.31. – Разнообразие микробного сообщества и соотношение *Firmicutes /Bacteroidetes*. (a) Индекс разнообразия Шеннона, (b) видовое богатство (наблюдаемые ASV), (c) филогенетическое расстояние Фейта. Области толстой кишки показаны цветами: красный – AC, зелёный – TC, синий – DC. (d) PCA-биплот общего количества ASV, показывающий образцы (точки) и таксоны (стрелки). Точки окрашены по участку и времени относительно добавления LGG, а формы представляют биорепликанты. Десять таксонов, наиболее сильно влияющих на распределение образцов, показаны стрелками, длина которых соответствует нагрузке PCA (степени ассоциации). Образцы TC и DC более похожи друг на друга, чем на образец AC. Образец BR2 и BR3 более похожи друг на друга, чем на образцы BR1. (e) Боксплоты, показывающие соотношение *Firmicutes /Bacteroidetes* для образцов. Поля отображают первый и третий квартили и медиану. Индивидуальные значения соотношений для образцов показаны точками

Аналогичная тенденция наблюдается и для инокулятов BR2 и BR3, поскольку эти сообщества более сходны между собой, чем с BR1 (Рисунок 5.31d, серые формы). Основные таксоны, ассоциированные с различиями между сообществами, показаны на рисунке 5.31d. Микробные сообщества TC- и DC-сегментов у BR1 отличались от таковых у BR2 и BR3 по доле ASV из порядка *Bacteroidales*, в то время как у представителей родов *Megasphaera* и *Acidaminococcus* (оба из порядка *Selenomonadales*) таких различий не наблюдалось. Интересно, что различия между микробиотой AC-отдела у BR1 и TC- и DC-сегментов у BR2 и BR3 определялись близкородственными колиформными родами**:** *Escherichia* (AC у BR1) и *Citrobacter* (TC и DC у BR2 и BR3, где они были обогащены этим родом). Стоит отметить, что кластеризации по времени относительно добавления штамма LGG выявлено не было. Это указывает на то, что общая структура микробного сообщества осталась стабильной по крайней мере, на временных интервалах, охваченных этим экспериментом.

На более общем уровне бактериальные типы *Bacteroidetes* и *Firmicutes* и их соотношение (F/B) считаются маркерами здоровья хозяина [299]. Нами был исследован состав микробных сообществ кишечника на уровне типов для оценки этого соотношения и общего состава микробиома (Рисунок 5.31e). Во всех исследованных сообществах преобладали представители типов *Firmicutes* и *Bacteroidetes,*в то время как доля других групп (*Proteobacteria, Fusobacteria,*

Однако таксономический состав различался, что было ожидаемо ввиду межиндивидуальных различий в микробиоме кишечника. Например, в образце BR1 относительная доля Fusobacteria была выше, чем в образцах BR2 и BR3. Кроме того, представители Proteobacteria встречались чаще в образцах BR1 и BR2 по сравнению с BR3. Всё это согласуется с показателями индекса разнообразия Шеннона, представленными на рисунке 5.31a. *Actinobacteria* и *Verrucomicrobia*) была значительно меньше (Рисунок 5.32).

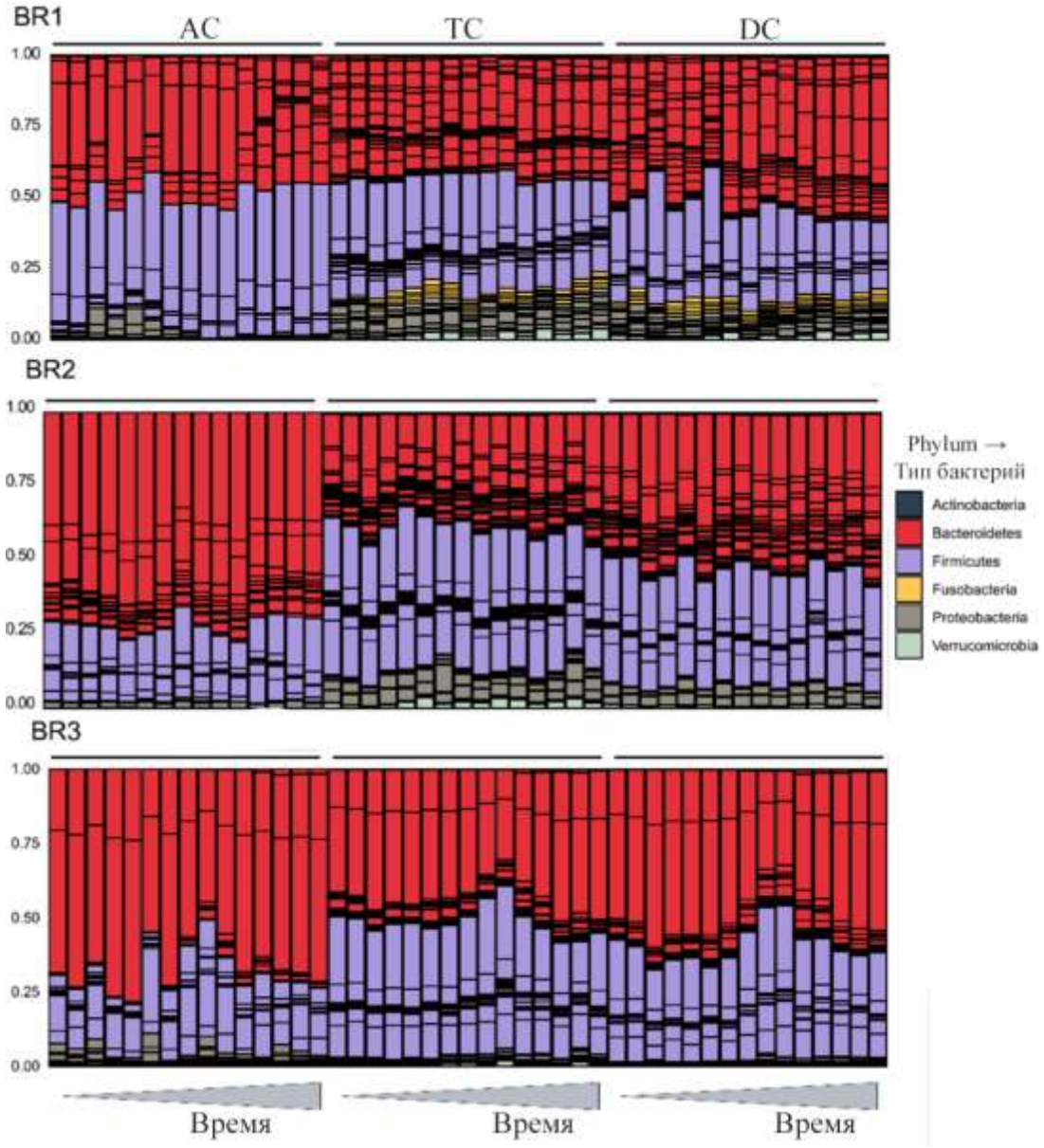


Рисунок 5.32. - Барграф относительной численности типов. Показано относительная численность шести основных типов в образцах системы SHIME. Типы представлены разными цветами, а столбики внутри каждого цвета обозначают отдельные таксоны внутри этого типа. Ось X указывает время с момента инокуляции штамма LGG

В соответствии с метриками альфа-разнообразия, доминирование двух типов было наиболее выражено в AC-сегменте во всех биоповторностях,тогда как в TC- и DC-отделах отмечался рост видового разнообразия. В дистальном направлении доля *Bacteroidetes* снижалась, что сопровождалось соответствующим увеличением соотношения F/B. Только образцы BR3 показали значительные различия в соотношении F/B по временным точкам относительно

добавления штамма LGG. Однако, самые высокие показатели соотношения F/B наблюдались в период, непосредственно после добавления штамма LGG в систему; это позволяет предположить, что добавление LGG может способствовать краткосрочному, таксономически специфичному изменению состава (ремоделированию), благоприятному для здоровья.

5.6. Влияние добавления штамма LGG на синтез короткоцепочечных жирных кислот

Нами было исследовано влияние добавления штамма LGG на продукцию КЦЖК в микробиоме кишечника (Рисунок 5.33a и b). Сравнение трёх биорепликатов показало, что уровень КЦЖК в образцах BR2 и BR3 превышает аналогичные показатели для образца BR1. До введения штамма LGG в систему концентрации КЦЖК в трёх биорепликатах возрастали при последовательном прохождении реакторов – от AC- к TC- и далее к DC-сегментам, что согласуется с нашими предыдущими результатами [187]. Несмотря на то, что после внесения штамма LGG в концентрациях измеренных КЦЖК значительных изменений обнаружено не было, в ряде образцов наблюдались кратковременные пики. Это отражено в повышенной вариабельности данных для групп образцов "День 1–6" на рисунке 5.33. Добавление LGG к трём биорепликатам не оказало значительного эффекта на эту тенденцию, несмотря на небольшое увеличение, которое было зафиксированное для 2M-/3M-бутиратов и 2M-пропионовой кислоты в зоне TC (Рисунок 5.33a), что, возможно, связано с увеличением численности *F. Acidaminococcus* и *P. Sutterella* [300, 301]. При сравнении 324 пар значений для каждой отдельной КЦЖК в исходном сообществе с измеренными значениями на 8-й и 10-й день после введения LGG только 14 пар показали статистически значимые различия, что указывает на незначительное и временное влияние LGG на уровни КЦЖК, поскольку штамм постепенно выводился из системы.

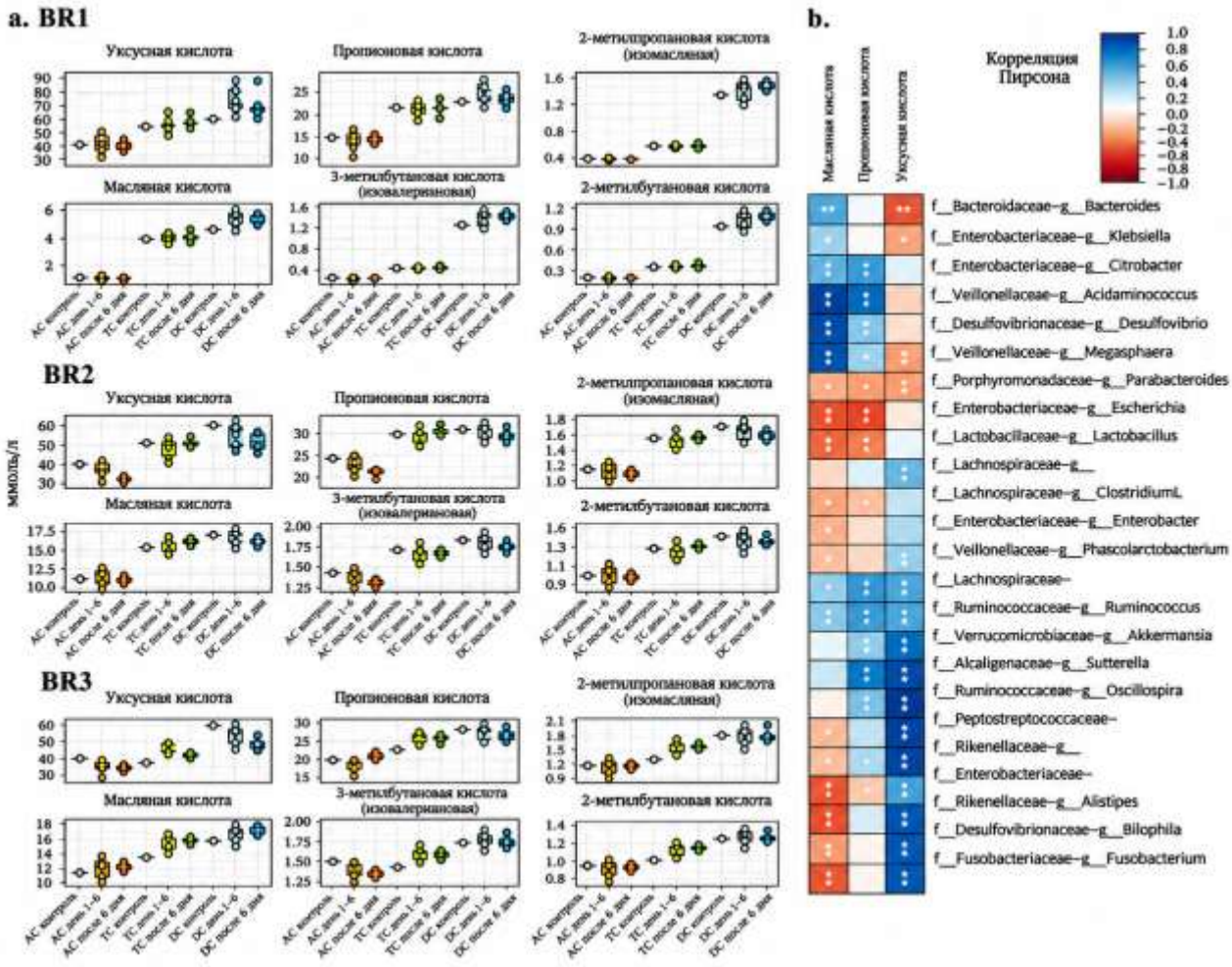


Рисунок 5.33. - Содержание КЦЖК и их корреляция с бактериальными таксонами: (a) концентрации КЦЖК в реакторах до и после введения LGG (медиана, IQR, отдельные образцы); (b) корреляция Пирсона между относительной численностью бактериальных родов и тремя основными КЦЖК. Значимость: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

В настоящем исследовании сохранение и размножение LGG изучали в модели SHIME с использованием микробных сообществ трёх здоровых доноров, придерживавшихся западного типа питания. Введение штамма сопровождалось изменениями соотношения *Firmicutes/Bacteroidetes* без перестройки общей структуры микробиоты. LGG сохранялся в системе не менее 10 дней во всех трёх экспериментах, динамика его численности различалась между донорами и отделами кишечника.

На рисунке 5.33b показано, что после введения LGG наблюдалось отсутствие изменений содержания КЦЖК, хотя корреляционный анализ Пирсона

выявил положительную связь между концентрацией масляной кислоты и относительной численностью *Acidaminococcus*, *Sutterella*, *Bacteroides* и *Ruminococcus* , что связано с одновременным образованием и потреблением этих метаболитов различными бактериями, в том числе посредством перекрёстного питания [302, 303, 304].

Полученные результаты подтверждают возможность использования SHIME для изучения устойчивости пробиотических штаммов в условиях *in vitro*. Такой подход может применяться и при исследовании других пробиотических микроорганизмов.

5.7. Метагеномное секвенирование методом дробовика

В течение 9-дневного периода начиная с добавления LGG до завершения эксперимента, было взято 180 образцов из просветной и слизистой фаз регионов AC, TC и DC для трёх биорепликатов. Мы провели шотган-метагеномное секвенирование 18 просветных образцов каждого биорепликата, получив в среднем 2 305 546 ± 537 620 ридов, что предоставило нам возможность оценить как состав микробного сообщества, так и его функциональный потенциал.

Таксономическая классификация на основе метагеномных ридов была выполнена с использованием программного обеспечения MetaPhlAn3, основанного на шотган-секвенировании. Этот анализ предоставил таксономические назначения на уровне видов и их относительные доли (Рисунок 5.34). Сообщества, сформированные из трёх биорепликатов, демонстрируют несколько общих характеристик. Во-первых, бактериальные составы в зонах TC и DC схожи между собой, но отличаются от такового AC-зоны. Это согласуется с нашими предыдущими выводами, где было выявлено, что бактериальное сообщество в стабильном состоянии проявляет сильную связь по составу между TC- и DC-сегментами и относительно слабую связь с сообществом AC-региона [187].

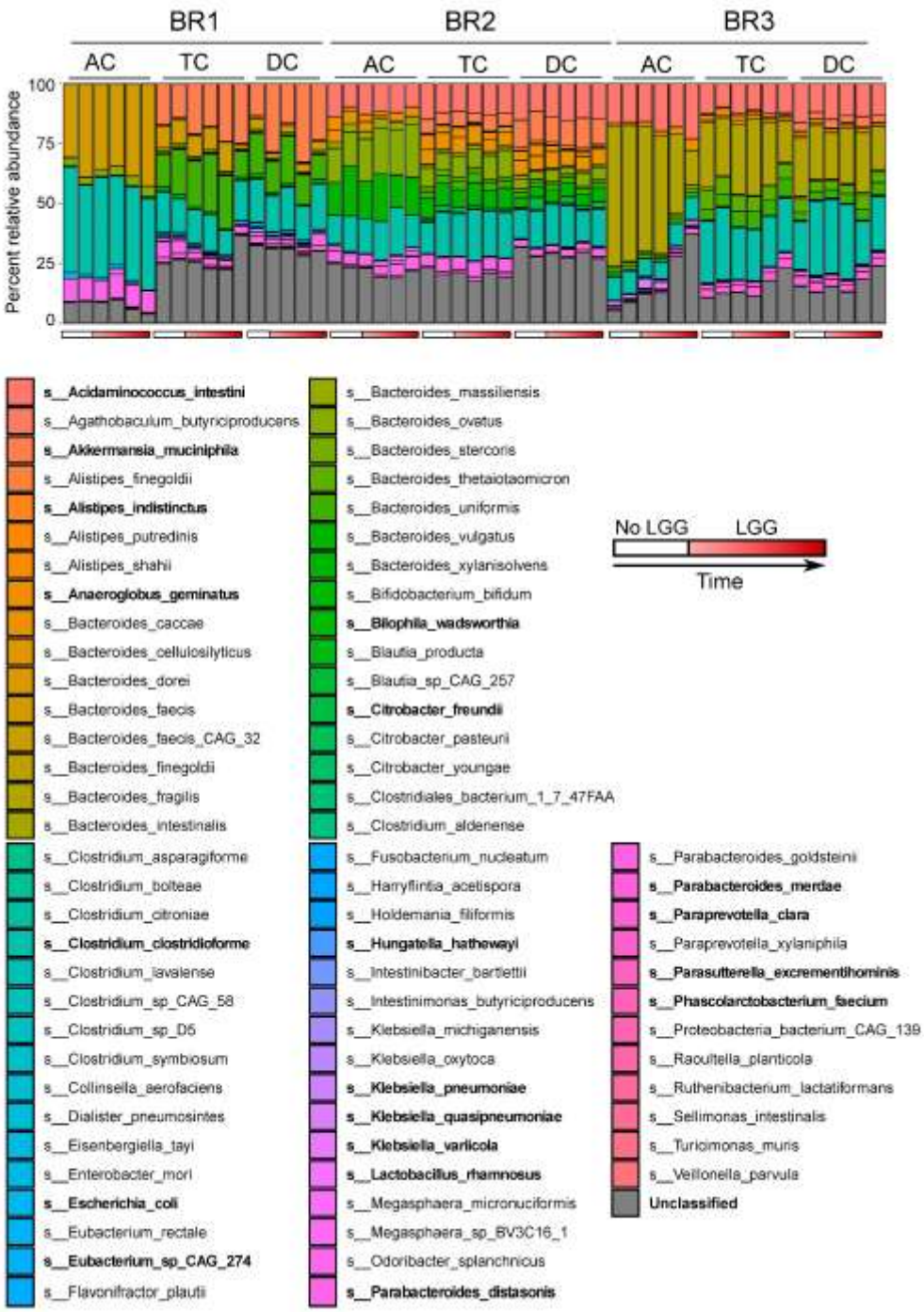


Рисунок 5.34. - Структура микробного сообщества, определённая по данным метагеномного секвенирования. Относительная численность таксонов на видовом уровне для трёх биорепликатов (BR1, BR2, BR3) в трёх моделируемых участках толстой кишки. Таксоны были определены на уровне видов, неклассифицированные последовательности обозначены серым цветом. Жирным шрифтом выделены названия видов, для которых была восстановлена метагеномно-собранная геномная последовательность

(MAG). Полосы под отдельными столбцами указывают на добавление штамма LGG в образец; время отбора увеличивается слева направо

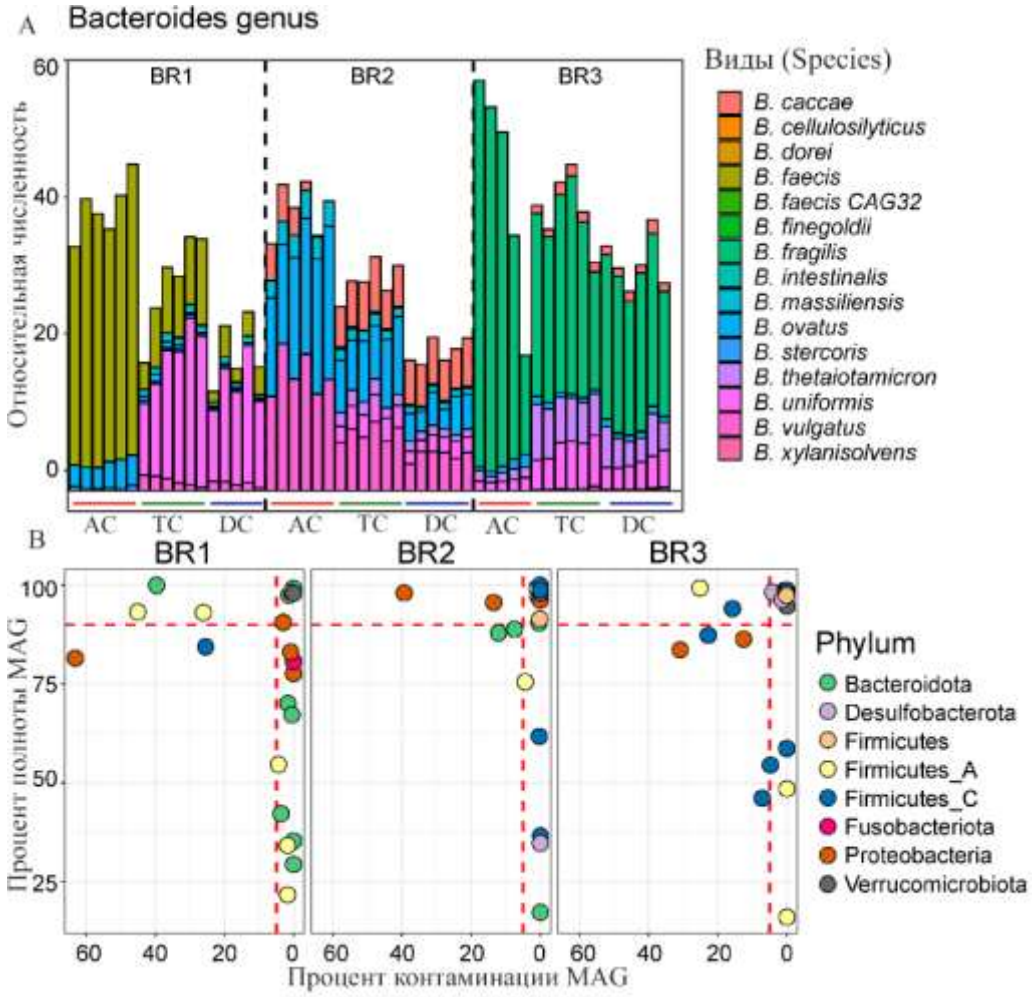


Рисунок 5.35. - Видовое разнообразие в пределах рода Bacteroides. (A) Подмножество метагеномных данных об относительной численности, отражённых на рисунке 5.34, здесь представлены только виды рода Bacteroides. Общие пропорции схожи, в то время как распределение на видовом уровне значительно варьируется. (B) Метагеномно-собранные геномы (MAGs), полученные из ко-сборок метагеномных данных. Круги представляют отдельные геномные блоки, показывая предполагаемую полноту и загрязнение, пределы для высококачественных MAGs обозначены красными пунктирными линиями

Добавление экзогенного штамма LGG не изменяет эту тенденцию. Поскольку в реакторы добавлялась только стерилизованная среда DM и

одинаковый инокулят вводился в биореакторы, моделирующие различные отделы толстой кишки, это указывает на то, что неклассифицированные таксоны действительно поприсутствовали в образцах AC-сегмента, но, вероятно, в меньших количествах, пока не достигли более благоприятных условий в реакторах TC- и DC-зон.

Во-вторых, составы были специфичными для донора; например, *Klebsiella sp.* была обнаружена в TC- и DC-сегментах, но отсутствовала в AC-отделе в образце BR1; присутствовала в AC-регионе образцов BR2 и BR3, но отсутствовала в TC- и DC-отделах этих двух биорепликатов.

Дополнительные индивидуальные различия также наблюдались и на видовом уровне.Например, род *Bacteroides* демонстрировал схожее распределение для каждого биорепликата, составляя большую часть сообщества в AC-зоне (41–45% относительной численности), чем в TC- или DC-сегментах (17–41% относительной численности). Однако состав на уровне видов существенно варьировался у разных доноров, а в случае образцах BR1 значительно изменялся от AC- к TC- и DC-сегментам (Рисунок 5.35). Далее мы провели ко-сборку и бининг образцов из метагеномных данных для каждого биорепликата, что позволило получить в общей сложности 27 MAG средней и высокой полноты. Из них 21 геном соответствовал высокому качеству, с полнотой >90% и загрязнением <5% (Рисунок 5.35B). Эти MAG включали представителей некоторых наиболее многочисленных таксонов, выявленных при секвенировании 16S рРНК [305] и при анализе прочтений метагеномных данных. Виды, для которых были собраны MAG, выделены жирным шрифтом на рисунке 5.35.

5.8. Взаимосвязь между микробиомом и метаболомом

Для 148 образцов мы провели нетаргетный метаболомный анализ, что позволило получить профили для 654 метаболитов, из которых 559 были идентифицированы по химическим структурам. Сначала мы проверили, соответствуют ли профили метаболитов профилям микробных сообществ. В случае функциональной избыточности возможно, что микробное сообщество

может изменяться без сопутствующего изменения в профиле метаболитов. Напротив, профили метаболитов могут изменяться без сдвигов в таксонах, что указывает на изменения в экспрессии генов и метаболизме стабильного сообщества. Однако в этом эксперименте мы обнаружили, что профили как микробного сообщества, так и метаболитов изменялись синхронно.

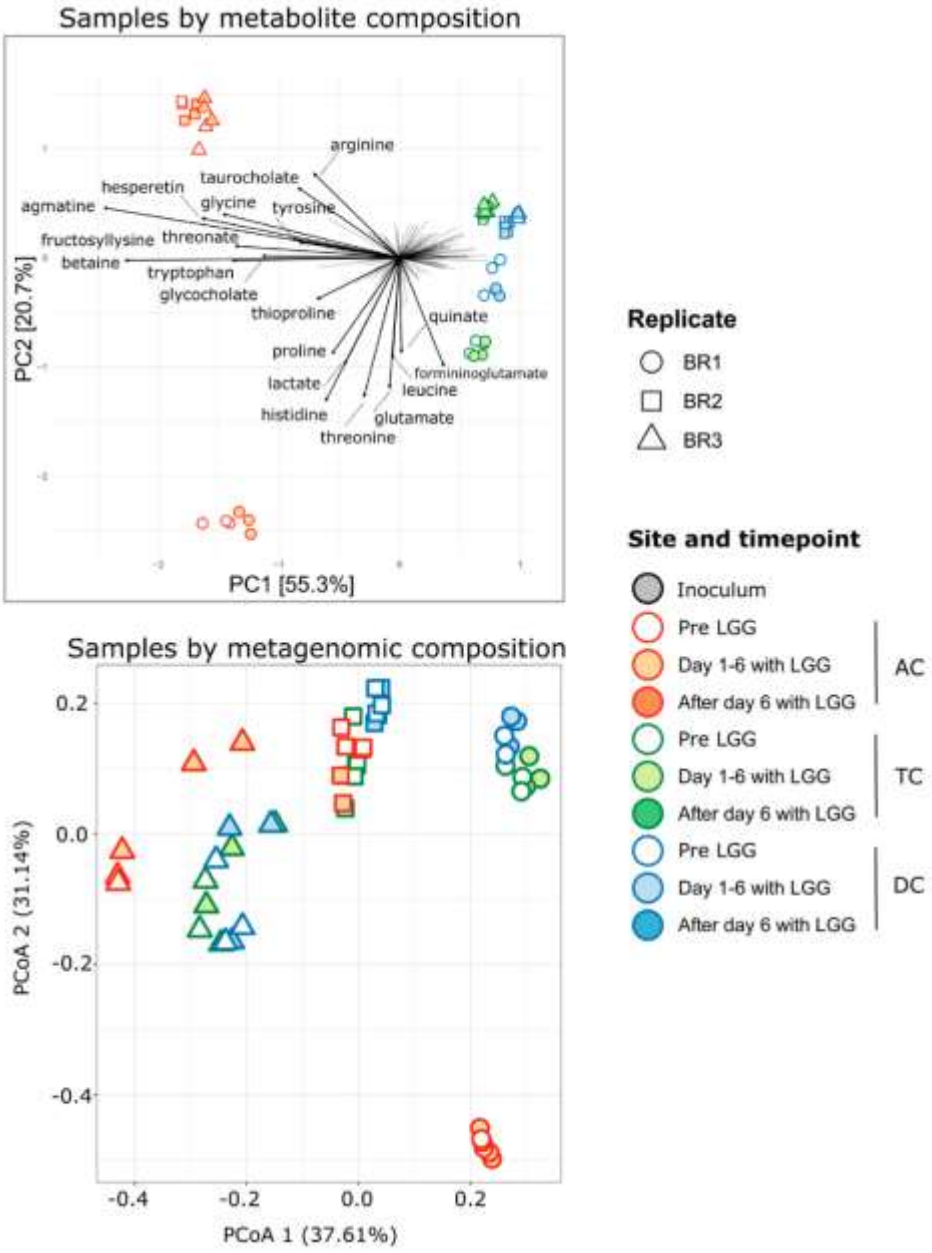


Рисунок 5.36. - Анализ главных компонент метаболических профилей (PCA, вверху) и микробных сообществ (PCoA, внизу). Для PCA применено CLR-преобразование, для PCoA расстояния Брэй–Кёртиса по относительной численности бактериальных родов. Стрелками показаны векторы нагрузки 20 метаболитов с наибольшим вкладом.

Анализ главных компонент (PCA) (верхняя часть рисунка), основанный на составе метаболитов, согласуется с анализом основных координат (PCoA), проведённым на основе профилей сообществ на уровне рода, полученных как из данных метагеномного секвенирования (нижняя часть рисунка 5.36), так и из данных ампликонного анализа 16S рРНК [305]. Образцы BR2 и BR3 были похожи между собой, чем с BR1. В метаболических профилях BR2 сообщества TC и DC разделялись отчётливо, тогда как у BR3 их состав был более близким. Связь таксономического состава микробиоты с её метаболическим профилем оценивали с помощью теста Мантеля, сопоставляя матрицы расстояний по данным секвенирования и метаболомного анализа (статистически значимая корреляция $r = 0{,}5097$, $p < 0{,}0001$, 9999 перестановок.

При дальнейшем анализе метаболитов после введения LGG установлено, что различия между TC и DC были менее выраженными и зависели от времени отбора проб и экспериментальной серии. При этом заметное разделение контрольных и опытных образцов наблюдалось в AC, менее выраженное в TC.

Для сравнения метаболических профилей до и после введения LGG применили алгоритм случайного леса (Random Forest). На обучение использовали 70% данных, на тестирование 30%, при этом средняя частота ошибок составила 9% для образцов с LGG и 26% для контрольных образцов, а по результатам 200 итераций общая ошибка классификации на тестовой выборке составила 12,5%. Метаболические профили позволили различать контрольные образцы и пробы после введения LGG. Чаще всего ошибочно классифицировались контрольные образцы, а среди проб с LGG образцы AC-отдела, отобранные через три дня после введения штамма. Последнее указывает на временные изменения метаболического профиля в этом отделе.

5.9. Пространственное разрешение метаболических преобразований

Исследование превращения жёлчных кислот проводили для оценки способности системы воспроизводить пространственные особенности микробного метаболизма. В систему SHIME первичные жёлчные кислоты

поступали вместе с панкреатическим соком, включая холевую (CA), хенодезоксихолевую (CDCA) кислоты и их конъюгаты с таурином и глицином.

При нецелевом метаболомном анализе обнаружены CA, CDCA, таурохолевая (TA) и гликохолевая (GA) кислоты преимущественно в AC-отделе, куда они первоначально поступали, а в реакторах TC и DC сохранялись небольшие количества CA (рисунок 5.37). Одновременно в этих отделах увеличилось содержание продуктов дальнейшего превращения жёлчных кислот, включая 7-кетолитохолат, урсодезоксихолат и урсохолат. Вторичные жёлчные кислоты, литохолат и дезоксихолат обнаруживали преимущественно в TC- и DC-отделах. Такое распределение свидетельствует о последовательном микробном преобразовании жёлчных кислот по мере прохождения содержимого через систему, так как первичные жёлчные кислоты преобладали в AC-отделе, тогда как продукты их дальнейшего метаболизма накапливались в TC и DC.

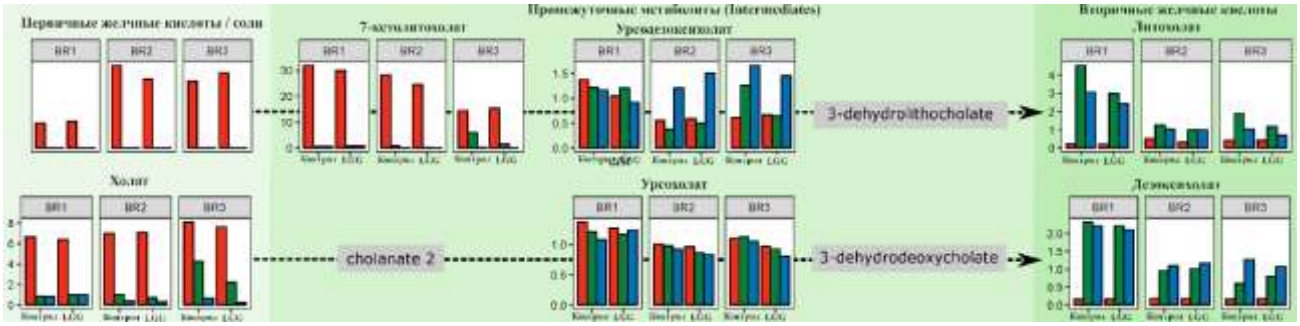


Рисунок 5.37. - Профили интенсивности сигналов жёлчных кислот, их конъюгатов и промежуточных продуктов метаболизма в различных отделах толстой кишки. Пространственное распределение обнаруженных соединений отражает последовательные микробные превращения жёлчных кислот в системе SHIME.

Полученные результаты согласуются с ранее опубликованными данными о преобразовании первичных жёлчных кислот во вторичные при переходе от AC к TC и DC [208]. Воспроизведение этой закономерности позволило использовать систему SHIME для дальнейшего изучения пространственных изменений других метаболитов и их связи с составом кишечной микробиоты.

5.10. Индивидуальные метаболиты и пути метаболизма

Наиболее известными из метаболитов микробиоты кишечника являются короткоцепочечные жирные кислоты. Влияние штамма LGG на КЦЖК и их роль в энергетических превращениях и передаче сигналов обсуждались ранее [187, 305]. Помимо КЦЖК, в данном исследовании были идентифицированы 132 метаболита и 20 метаболических путей, которые значительно различались в зависимости от обработки, с учётом биорепликатов и области толстой кишки. Хотя это количество (132 метаболита) составляет 24 % от всех аннотированных метаболитов, незначительные общие различия между образцами, описанные через агрегированные профили метаболитов (раздел 5.8 выше), включают влияние оставшихся 76 % аннотированных метаболитов, которые существенно не различались в зависимости от обработки. Среди обнаруженных соединений особый интерес представляли производные индола, образующиеся при метаболизме триптофана (Trp), а также 4-гидроксифенилуксусная кислота продукт превращения тирозина (Tyr). Подобно жёлчным кислотам, эти метаболиты имели характерное распределение между отделами толстой кишки, соответствующее последовательным этапам микробного катаболизма.

Trp, а также в меньших количествах Phe и Tyr, обнаруживались преимущественно в восходящем отделе (AC) (рисунок 5.38). Вероятно, эти аминокислоты высвобождались при микробном расщеплении белков, поступавших с питательной средой. Их практически полное отсутствие в поперечном (TC) и нисходящем (DC) отделах указывает на дальнейшее использование микроорганизмами по мере прохождения содержимого через систему. Интенсивность сигнала триптофана положительно или отрицательно коррелировала с относительной численностью отдельных вариантов последовательностей ампликонов (ASV), относящихся к родам *Bacteroides*, *Klebsiella*, *Veillonella*, *Clostridium*, *Paraprevotella* и *Escherichia* (рисунок 5.38B).

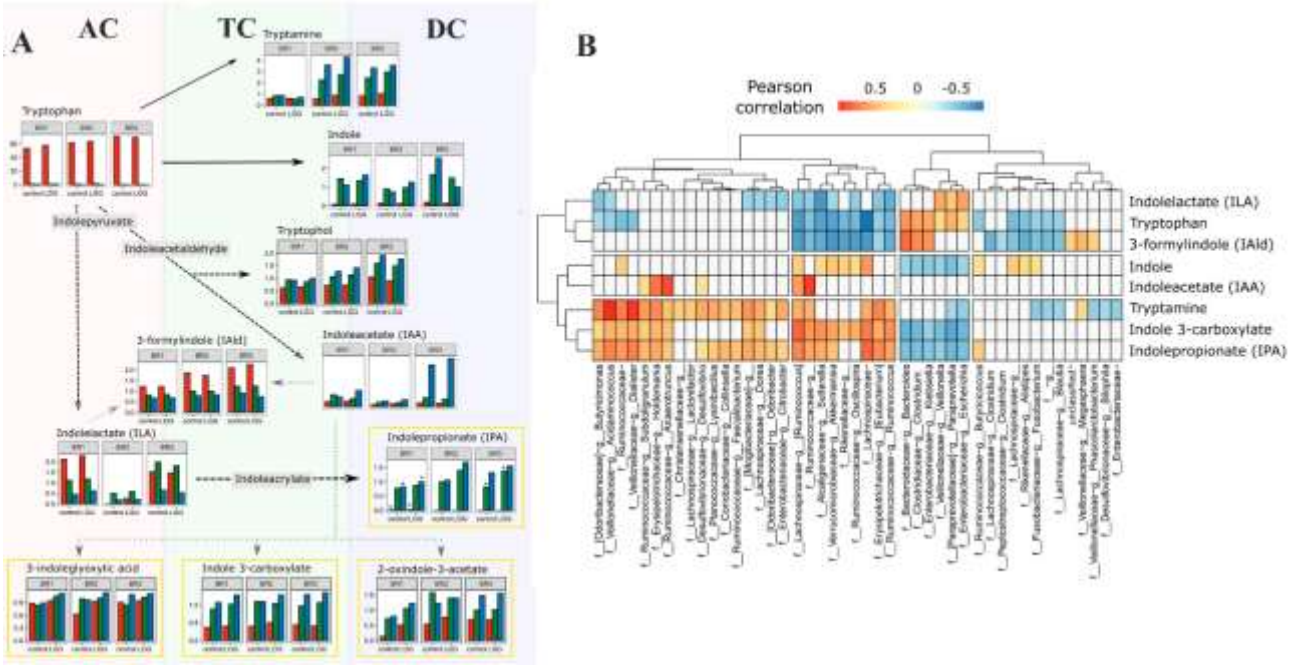


Рисунок 5.38. - Катаболизм триптофана в отделах моделируемой толстой кишки. (A) Профили метаболитов и пути их превращения: сплошные стрелки — прямые реакции, пунктирные — многостадийные и альтернативные пути; серые прямоугольники — предполагаемые промежуточные соединения. Жёлтыми рамками выделены метаболиты со значимыми изменениями после введения LGG, звёздочками - значимые изменения индолпропионата по отделам и биоповторностям. Стрелки обозначают реакции, а не перемещение веществ между реакторами. (B) Корреляции Пирсона между бактериальными родами (16S рРНК) и метаболитами триптофана: цвет отражает направление и величину значимых корреляций, незакрашенные ячейки - отсутствие значимости. Критерий значимости: p < 0,05 после коррекции Бенджамини–Хохберга.

Представители рода *Bacteroides* обладают протеолитической активностью, а некоторые виды *Klebsiella* и *Escherichia* способны образовать индол из триптофана. Их совместная деятельность участвует в последовательном высвобождении и превращении триптофана в кишечном микробном сообществе.

В AC-отделе обнаружили триптофан, индоллактат (ILA) и индолальдегид (3-формилиндол, I3A). Содержание двух последних метаболитов возрасло в TC и DC, тогда как индол и индолпропионат (IPA) накопились преимущественно в

этих отделах. Такое распределение наблюдали для пропионатных производных тирозина и фенилаланина, которые выявили главным образом в дистальных отделах. Сам фенилаланин, в отличие от триптофана и тирозина, обнаруживали и за пределами АС. После введения LGG отмечали значительное изменение содержания индол-3-пропионовой кислоты (IPA) микробного метаболита триптофана, известного своими противовоспалительными и антиоксидантными свойствами [306, 307, 308]. На сегодняшний день известно, что IPA производится только шестью видами рода *Clostridium* и четырьмя видами рода *Peptostreptococcus* [309]. Как и IPA, производные фенилаланина, такие как 3-фенилпропионат и 4-гидроксифенилпропионат, известны тем, что образуются с использованием генного кластера fldABC по аналогичному пути, что и IPA [310]. В данном исследовании IPA (рисунок 5.38) увеличивался как в ТС, так и в DC регионы. Исходный субстрат (триптофан, Trp) и его микробные метаболиты (индоллактат (ILA) и индолальдегид (3-формилиндол, I3A) начинали появляться в восходящем отделе (АС) и продолжали накапливаться в поперечном (ТС) и нисходящем (DC) сегментах ободочной кишки. Индол и индол-3-пропионовая кислота (IPA), образующиеся при микробном метаболизме триптофана, обнаруживались преимущественно в поперечном (ТС) и нисходящем (DC) отделах толстой кишки. Сходное распределение наблюдалось для продуктов превращения тирозина и фенилаланина, пропионатные производные которых накапливались главным образом в дистальных отделах. При этом фенилаланин, в отличие от триптофана и тирозина, обнаруживался и за пределами восходящего отдела (АС), что может указывать на его более медленное использование микроорганизмами.

Одним из метаболитов, содержание которых статистически значимо изменялось после введения пробиотического штамма LGG, была индол-3-пропионовая кислота (IPA). Это соединение образуется в результате микробного метаболизма триптофана и представляет интерес благодаря известным противовоспалительным и антиоксидантным свойствам. После добавления LGG

содержание IPA увеличивалось преимущественно в TC- и DC-отделах и продолжало возрастать в ходе эксперимента.

Поскольку IPA может всасываться в кишечнике, проследить её образование и накопление в отдельных отделах толстой кишки в условиях *in vivo* затруднительно. Ранее связь между составом микробиоты и образованием метаболитов триптофана была показана на экспериментальных моделях мышей [311]. Использование системы SHIME позволило исследовать пространственное распределение IPA и сопоставить его с таксономическим составом микробных сообществ.

После введения LGG в TC- и DC-отделах также увеличивалось содержание пропионатных производных других ароматических аминокислот (рисунок 5.38). Сходный характер этих изменений позволяет предположить, что в их образовании участвуют микроорганизмы с общими или близкими путями метаболизма триптофана, фенилаланина и тирозина.

Образование IPA связывают прежде всего с *Clostridium sporogenes* и некоторыми другими представителями рода *Clostridium* (семейство *Clostridiaceae*). Однако анализ результатов секвенирования гена 16S рРНК и метагеномных данных не выявил *C. sporogenes* ни в одной из трёх биологических повторностей. При этом были обнаружены последовательности 16S рРНК, отнесённые к роду *Clostridium*. Их суммарная относительная численность достигала 1,5% лишь в одном образце, а в остальных составляла около 0,5%. Изменения численности этих бактерий не соответствовали наблюдаемому профилю накопления IPA, что указывает на возможное участие других представителей микробного сообщества в её образовании. Также сообщалось, что IPA может продуцироваться представителем типа Firmicutes *Peptostreptococcus anaerobius*. Как и в случае с родом *Clostridium*, в обоих наборах данных мы обнаружили низкое присутствие таксонов, связанных с семейством *Peptostreptococcaceae*, практически исключительно в DC-регионе BR1, с максимальной относительной численностью 1,3 % в одном образце.

Основываясь на этом распределении, маловероятно, что члены этих таксонов участвовали в производстве IPA.

Для того, чтобы определить, какие организмы могут быть ответственны за наблюдаемое соединение IPA и другие производные ароматических пропионовых кислот, мы проанализировали собранные метагеномные контиги на наличие генов fldABC, известных своей ответственностью за продукцию пропионовых производных ароматических аминокислот. В BR1 гены fldBC были связаны с *Enterocloster*, *Fusobacterium* и потенциально неклассифицированным видом *Clostridium*. В BR2 и BR3 кандидаты fldBC были связаны с *Enterocloster*, *Acidaminococcus* и *Megasphaera*, всеми членами типа *Firmicutes*. Во всех случаях эти попадания (BLASTP) имели низкую идентичность к более широкой семье гидроксиглутарил-КоА дегидратаз, составляя менее 60% аминокислотной идентичности к генам fldABC *C. sporogenes*. Такое отсутствие идентичности может свидетельствовать о функциональной и филогенетической дистанции, и экспериментальная проверка способности этих организмов или генов участвовать в редуктивном катаболическом пути метаболизма ароматических аминокислот была бы необходима. Интересно, что в данных как 16S рРНК, так и метагеномных данных представленность *Megasphaera* и *Acidaminococcus sp.* была найдены обнаружена только в биорепликатах BR2 и BR3. Это указывает на то, что если они действительно производят IPA, то за производство этого метаболита в реакторах BR1 должен отвечать другой таксон, который, вероятно, является основным производителем во всех реакторах, с меньшим вкладом представителей *Megasphaera* и *Acidaminococcus sp*.

Среди таксонов, вносящих вклад в гены fldBC, члены рода *Enterocloster* были очень обильны в этом эксперименте. На основе метагеномных данных нам удалось собрать и разделить несколько метагеномно-собранных геномов (MAG) из рода *Enterocloster* (семейство *Lachnospiraceae*), включая три, классифицированных как *Enterocloster clostridioformis*, один – как *Enterocloster asparagiformis* и один, неклассифицированный до уровня вида. База данных GTDB, использованная для присвоения таксономии MAG, указывает

Enterocloster clostridioformis как новое название для *C. clostridioforme*, ранее классифицируемого как род *Clostridium*, семейство *Lachnospiraceae*. Эти MAG не содержат генов 16S рРНК, что часто происходит в случае метагеномных сборок, поэтому мы не можем напрямую связать их с данными 16S рРНК. Анализ метагеномных данных с помощью MetaPhlAn3 выявил высокую относительную численность *Clostridium clostridioforme* (*Enterocloster clostridioformis*).

Выраженную положительную корреляцию с IPA выявили у неклассифицированных представителей *Lachnospiraceae,* а значимую отрицательную у *Clostridium (Clostridiaceae),* что предполагает участие других продуцентов IPA наряду с ранее описанными представителями *Clostridiales* [309, 310], в этом процессе могли участвовать и другие микроорганизмы, в том числе посредством обмена метаболитами.

В системе SHIME, мы ранее установили сходство таксономического состава сообществ TC и DC и их отличие от AC. После введения LGG эта закономерность сохранилась, при этом содержание IPA и ряда других метаболитов триптофана увеличилось, что может быть связано с влиянием LGG на метаболическую активность других представителей микробиоты. Поскольку численность известных продуцентов IPA не соответствовала его накоплению в TC и DC, мы дополнительно проанализировали наличие генов *fldABC* в метагеномных данных и выявили другие потенциальные группы микроорганизмов, способные участвовать в образовании IPA.

Исследование проводили в системе *in vitro*, не воспроизводить в полной мере иммунные, метаболические и другие регуляторные взаимодействия кишечной микробиоты с организмом хозяина. Поэтому для полной оценки действия LGG и его взаимодействий с лекарственными веществами и компонентами питания целесообразно сочетать исследования в модели SHIME с экспериментами *in vivo*.

ГЛАВА 6. ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ПИРОКСИКАМА ИЗ ПЕКТИН-ЗЕИНОВЫХ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

6.1. Подготовка гидрогелевых микросфер, инкапсулированных лекарственным средством

Полученные характеристики гидрогелевых микросфер и двух образцов пектина (LM-APSh и HM-APF) представлены в таблице 6.1. Как видно из таблицы, выход П/З-гидрогелевых микросфер был значительно выше при использовании LM-пектина (86,15%) по сравнению с HM-пектином (45,43%). При этом степень загрузки пироксикама (Px) в структуру геля, наоборот, была ниже для LM-пектина и выше для HM-пектина.

Однако, при использовании LM-пектина образование гидрогеля ионного типа (пектин–Zn^{2+}) происходило более эффективно, чем формирование гидрофобной структуры пектин–зеин. Такое различие может быть обусловлено, прежде всего, молекулярной массой, а также конформацией цепей исследованных пектинов, которые напрямую влияют на эффективность гелеобразования и взаимодействие с ионами цинка и белковой матрицей [14].

Кроме того, низкая степень метоксилирования и меньшая молекулярная масса LM-пектина обеспечивают повышенную плотность доступных карбоксильных групп, что способствует более прочному и упорядоченному ионному сшиванию. Это объясняет, почему система на основе LM-пектина формировала более стабильный гидрогельный каркас, несмотря на меньшую степень инкапсуляции лекарственного средства.

Таблица 6.1. - Характеристики образцов пектина и П/З ВМ (1.30)

	Характеристики пектина			Выход гидрогеля, %	Px в гидрогеле, %	Степень набухания
	AGA, %	СЭ, %	Mw, KD			
HM-APSh	58,6	40,3	119,0	86,15	48,5±2,1	6,25
BM-APF	64,4	71,6	208,0	45,43	57,0±2,5	8,81

6.2. Фармакокинетическое исследование высвобождения лекарственного средства *in vitro*

Для предотвращения потерь пектин-зеиновых (П/З) гидрогелевых микросфер при отборе проб, опытные образцы помешали в диализный мешок, затем в сосуд аппарата тест на растворения. Чтобы оценить возможное влияние мембраны на высвобождение пироксикама (Рх), провели контрольный опыт, в котором П/З ВМ помещали непосредственно в сосуд аппарата без диализного мешка, а перед анализом отобранные пробы дополнительно фильтровали.

Сравнение полученных кривых показало, что профили высвобождения пироксикама из П/З ВМ с диализным мешком и без него были близкими (рисунок 6.1).

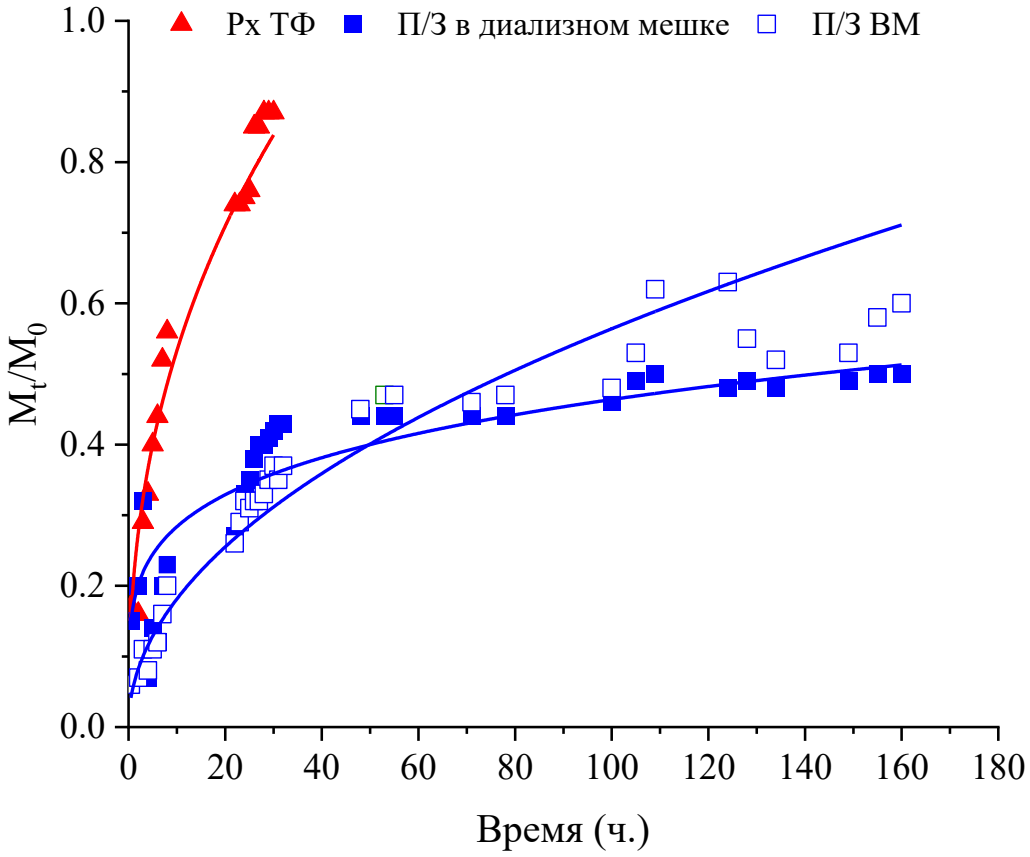


Рисунок 6.1. - Профили кумулятивного высвобождения пироксикама из Рх ТФ и пектин-зеиновых микросфер (П/З ВМ) с использованием диализного мешка и без него в условиях *in vitro* (фосфатный буфер, pH 6,4, содержащий 0,1 мл пектиназы).

Это свидетельствует о том, что диализная мембрана не оказывала существенного влияния на общий характер высвобождения лекарственного средства, а перенос пироксикама через мембрану происходил под действием градиента концентрации [312]. Коэффициент распределения между внешней средой и внутренним объёмом диализного мешка (Kp = Cout/Cin) оставался практически постоянным (0,95 ± 0,02). Для сравнения исследовали также растворение пироксикама (Традиционная форма), обозначенного как Рх ТФ. Суспензию лекарственного средства помещали в диализный мешок и определяли количество вещества, переходящего в раствор. В отличие от микросфер, для Рх ТФ была характерна более быстрая начальная фаза высвобождения до 90% в течение первых 24 часов.

Высвобождение Рх из исследуемых микросфер наблюдали в течение шести суток, что указывает на пролонгированный характер процесса. Для сравнения характеристик лекарственных форм кинетические данные анализировали с использованием математических моделей, а полученные уравнения, значения коэффициента детерминации (R^2), константы высвобождения и показателя степени n представлены в таблице 6.2.

Таблица 6.2. - Параметры математического описания высвобождения пироксикама в условиях *in vitro*

Формы лекарственного средства	**Уравнение**	**R^2**	**k_H 10^2, $ч^{1/2}$**	**n (экспонента высвобождения)**
Рх ТФ	Mt/Mo = 0,1652√t	0,95	16,52	0,186
П/З ВМ в диализном мешке	Mt/Mo = 0,0595√t	0,96	5,95	0,335
П/З ВМ	Mt/Mo = 0,0836Ln(t) + 0,0875	0,82	8,36	0,563

Кинетику высвобождения Рх ТФ и П/З ВМ в диализном мешке описывали моделью Хигучи с коэффициентами детерминации 0,95 и 0,96 соответственно. При этом константы высвобождения пироксикама составляли 16,52 × 10^{-2} и 5,95 × 10^{-2} $ч^{-1/2}$, то есть для пироксиакама в традиционной форме

этот показатель был в 2,8 раза выше. По модели Корсмейера–Пеппаса значения показателя n для Рх ТФ и П/З ВМ в диализном мешке составили 0,186 и 0,335 соответственно, что соответствует преобладанию диффузионного механизма при принятой геометрии системы. Без диализного мешка для П/З ВМ получили n = 0,563, что допускает участие процессов набухания и релаксации полимерной матрицы.

Полученные данные показывают, что инкапсулирование пироксикама в пектин-зеиновую матрицу сопровождалось снижением константы высвобождения, а сходство профилей, полученных с диализным мешком и без него, позволяет применять диализный мешок для дальнейшего исследования микросфер с учётом особенностей математического описания кинетических параметров.

6.3. Фармакокинетическое исследование *in vivo* на крысах

Одним из направлений разработки пролонгированных лекарственных форм является уменьшение частоты приёма препарата при сохранении необходимого терапевтического действия. Для оценки поведения разработанных пектин-зеиновых микросфер в организме исследовали высвобождение пироксикама в желудочно-кишечном тракте крыс.

Животным экспериментальной группы однократно перорально вводили оптимизированные П/З ВМ, а контрольной группе - неинкапсулированный пироксикам (Рх ТФ). Доза препарата в обеих группах была одинаковой и составляла 3,6 мг/кг массы тела. Изменения содержания, высвобожденного Рх в тонком и толстом кишечнике представлены на рисунке 6.2.

На основании экспериментальных данных были построены кинетические кривые для обеих лекарственных форм. На начальном участке профиль высвобождения Рх из П/З ВМ был близок к ранее полученному в условиях *ex vivo* [45]. В этот период наблюдалась начальная фаза выхода лекарственного вещества из полимерной матрицы.

У животных контрольной группы, получавших Рх ТФ, максимальное содержание высвобожденного пироксикама в тонком и толстом кишечнике

отмечалось приблизительно через 6 часов после введения. В последующие часы его количество постепенно снижалось в обоих отделах ЖКТ (рисунок 6.2).

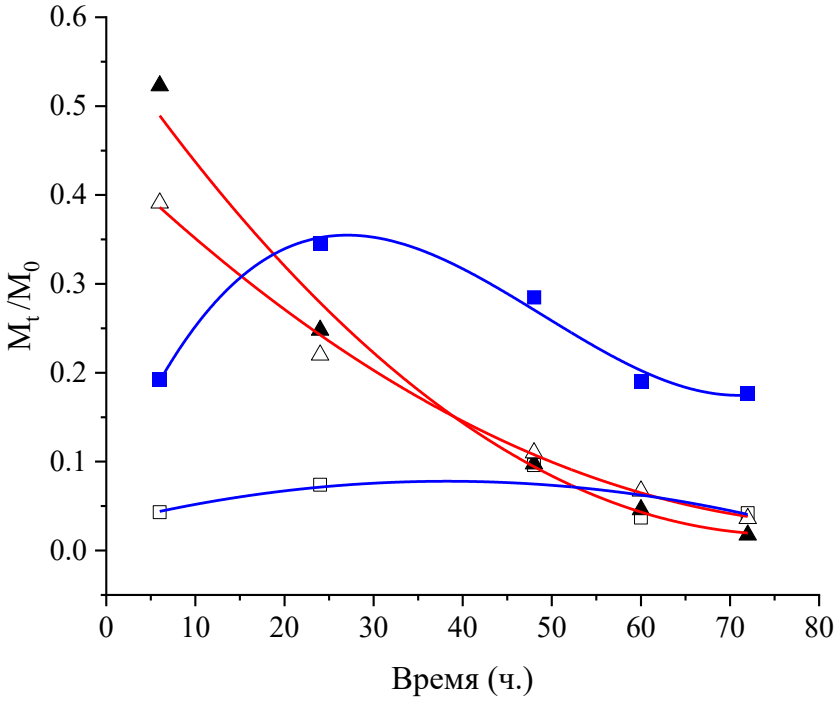


Рисунок 6.2. - Высвобождение пироксикама в тонком и толстом кишечнике крыс после однократного перорального введения П/З ВМ и Рх ТФ в дозе 3,6 мг/кг. Обозначения: П/З ВМ - ■ толстая кишка, □ тонкая кишка; Рх ТФ - ▲ толстая кишка, △ тонкая кишка.

При введении П/З ВМ высвобождение пироксикама происходило медленнее. В течение всего периода наблюдения, продолжавшегося 24 часа, количество высвобождаемого препарата оставалось относительно стабильным как в тонком, так и в толстом кишечнике. Такой характер кривых свидетельствует о более равномерном и продолжительном высвобождении Рх из пектин-зеиновой матрицы по сравнению с традиционной формой препарата.

Результаты исследования *in vivo* показали, что пектин-зеиновые микросферы (П/З ВМ) обеспечивали медленное и продолжительное высвобождение пироксикама по сравнению с его традиционной формой (Рх ТФ). Эта закономерность согласуется с результатами экспериментов *in vitro* и подтверждает влияние полимерной матрицы на кинетику высвобождения препарата.

В отличие от Рх ТФ, для которого наблюдалось быстрое высвобождение, пироксикам из П/З ВМ поступал в кишечную среду постепенно, без выраженных колебаний. При этом препарат оставался доступным в толстой кишке на протяжении почти трёх суток. Полученные данные свидетельствуют о способности разработанных микросфер обеспечивать пролонгированное высвобождение пироксикама в целевом отделе кишечника.

После однократного перорального введения П/З ВМ концентрация пироксикама (Рх) в плазме крови крыс через 6 часов составляла 1,26 мкг/мл. Максимальное значение достигалось через 24 часа и составляло 3,85 мкг/мл. В дальнейшем концентрация постепенно снижалась, однако даже через 72 часа оставалась достаточно высокой - 2,876 мкг/мл (рисунок 6.3).

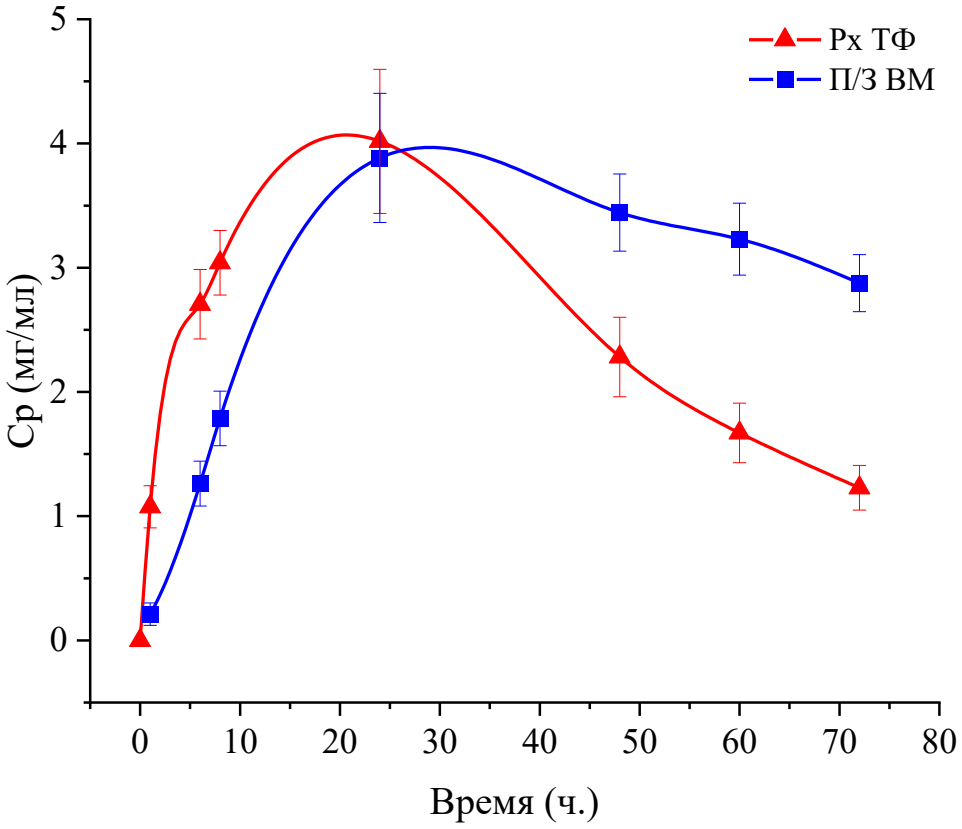


Рисунок 6.3. - Изменение концентрации пироксикама в плазме крови крыс после однократного перорального введения Рх ТФ и П/З ВМ

В контрольной группе, получавшей традиционную форму пироксикама (Рх ТФ), уже через 6 часов концентрация препарата в плазме была в 2,15 раза выше, чем при введении микросфер. Максимальная концентрация также наблюдалась через 24 часа и составляла 4,23 мкг/мл. Однако в последующие

часы содержание пироксикама снижалось быстрее и к 72-му часу достигало 1,23 мкг/мл. Таким образом, при одинаковом времени достижения максимальной концентрации обе лекарственные формы существенно различались по характеру её последующего изменения.

Полученные данные показывают, что включение пироксикама в пектин-зеиновую матрицу изменяло характер его поступления в системный кровоток. В отличие от традиционной формы, для которой после достижения максимума наблюдалось более быстрое снижение концентрации, П/З ВМ обеспечивали более продолжительное сохранение препарата в плазме. Через 72 часа его концентрация при использовании микросфер была примерно в 2,34 раза выше, чем в контрольной группе. Это согласуется с результатами исследований высвобождения *in vitro* и подтверждает пролонгирующее действие разработанной системы доставки.

Для количественной оценки фармакокинетических различий использовали модельно-независимый анализ после однократного перорального введения обеих лекарственных форм. Основные рассчитанные параметры приведены в таблице 6.3.

Таблица 6.3. - Основные модельно-независимые фармакокинетические параметры пироксикама после перорального введения

Параметр	**Единица**	**Рх ТФ**	**П/З ВМ**
Tmax	ч	24	24
Cmax	мкг/мл	4,23	3,82
AUC 0-t	мкг/мл*ч	191,77	211,18
AUC 0-inf	мкг/мл*ч	239,60	461,80
AUMC	мкг/мл*ч²	11223,84	49971,77
MRT	ч	46,84	108,21
Frel	%	51,9	192,7

Относительную биодоступность Рх рассчитывали по уравнению ниже, используя данные о концентрации лекарственного вещества в плазме крови после введения двух различных лекарственных форм.

$$F_{rel} = \frac{AUC_A}{AUC_R} \times \frac{D_B}{D_A} \times 100$$

Как видно из таблицы 6.3 рассчитанная относительная биодоступность П/З ВМ по отношению к Рх ТФ составляла 192,7%, что указывает на более высокую общую системную экспозицию пироксикама при использовании разработанной лекарственной формы. Вместе с тем различия между AUC_{0}–t и AUC_{0}–∞ показывают, что существенная часть площади под кривой была получена путём экстраполяции, поэтому оценка относительной биодоступности требует учёта точности расчёта терминальной фазы.

Сравнение фармакокинетических параметров показало, что при использовании П/З ВМ значение AUC была выше, чем при введении Рх ТФ. Значение AUC_{0}–t увеличивалось с 191,77 до 211,18 мкг·ч/мл, а AUC_{0}–∞ с 239,60 до 461,80 мкг·ч/мл, при этом максимальная концентрация пироксикама при использовании микросфер была 3,84 мкг/мл, а в традиционной форме 4,23 мкг/мл, хотя время её достижения для обеих форм оставалось одинаковым и составляло 24 часа. Различия для среднего времени пребывания лекарственного средства в организме наблюдались при введении Рх ТФ 46,84 ч., тогда как для П/З ВМ достигалось 108,21 ч. Соответствующее увеличение AUMC с 11223,84 до 49971,77 мкг·ч²/мл также отражало изменение временного профиля присутствия пироксикама в системном кровотоке.

В целом фармакокинетические исследования показали, что пектин-зеиновые микросферы обеспечивали продолжительное сохранение пироксикама в плазме крови по сравнению с традиционной формой. Увеличение MRT, медленное снижение концентрации после достижения максимума и высокая AUC по сравнение с традиционной формы согласуются с пролонгированным характером высвобождения пироксикама из полимерной матрицы. Эти результаты подтверждают перспективность разработанной системы доставки

лекарственных средств и служат основой для дальнейшей оценки её терапевтических преимуществ.

6.4. Корреляционный анализ *in vitro – in vivo* и *ex vivo – in vivo*

«При разработке лекарственных форм важное значение имеет установление взаимосвязи между результатами исследований *in vitro* и *in vivo*. Такой подход позволяет оценивать поведение препарата в организме на основании лабораторных испытаний и в дальнейшем сокращать количество экспериментов на животных» [313]. «Вместе с тем даже правильно подобранные условия испытания растворения не всегда позволяют точно воспроизвести процессы, происходящие в организме после введения лекарственного средства» [196]. Поэтому в настоящей работе для сравнения профилей высвобождения и абсорбции пироксикама использовали корреляционный анализ *in vitro - in vivo* (IVIVC) и *ex vivo - in vivo* (EVIVC).

Для определения доли абсорбированного пироксикама во времени применяли метод Лоо - Ригельмана. Деконволюцию экспериментальных данных *in vivo* проводили с использованием двухкомпартментной фармакокинетической модели, позволяющей учитывать распределение препарата между центральным и периферическим компартментами.

Корреляцию IVIVC уровня А для пектин-зеиновых микросфер (П/З ВМ) оценивали в соответствии с рекомендациями FDA для пероральных лекарственных форм пролонгированного высвобождения. Для этого строили зависимость доли пироксикама, абсорбированного *in vivo* (fабс), от доли препарата, высвободившегося *in vitro* (fраств). Такой анализ позволял сопоставить кинетику высвобождения пироксикама из полимерной матрицы с его поступлением в системный кровоток [193]. Расчёт основывался на предварительной деконволюции средних концентраций ЛС в плазме крови с получением профилей абсорбции *in vivo.*

Как показали результаты, установление корреляции между растворением *in vitro* и абсорбцией *in vivo* для Рх ТФ вполне возможно (Рисунок 6.4). «Это объясняется тем, что Рх отличается низкой растворимостью в воде, и именно

этот фактор ограничивает его биодоступность» [314]. Таким образом, полученные данные подтверждают, что для традиционной формы Рх растворение является лимитирующей стадией абсорбции, что позволяет выстраивать корректную IVIVC-модель.

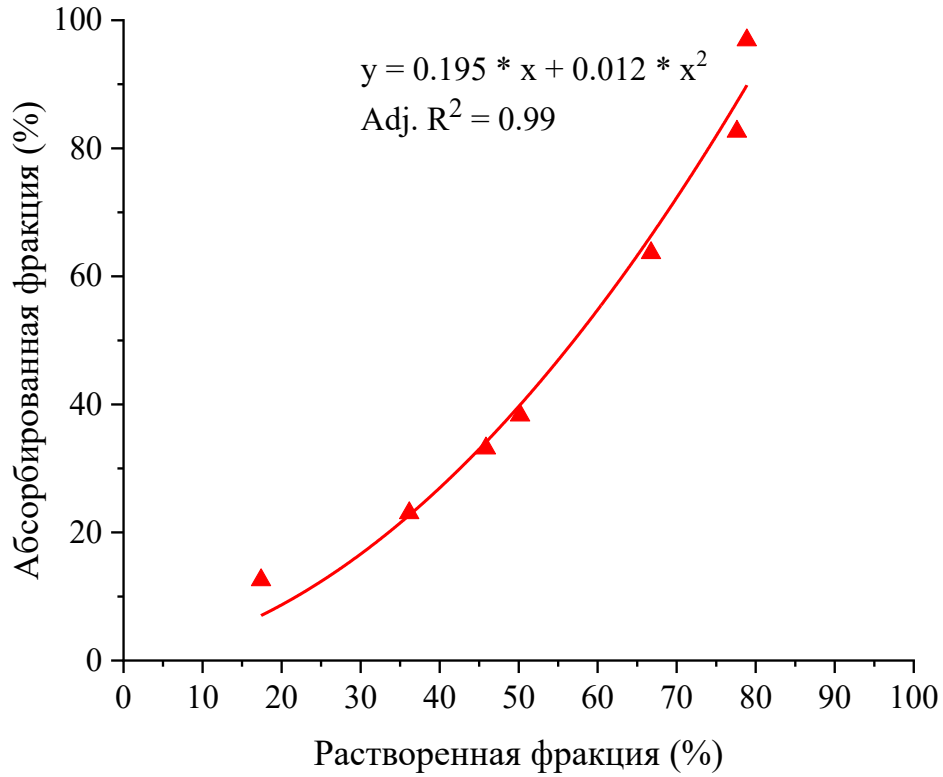


Рисунок 6.4 . - Корреляция данных о растворении *in vitro* и абсорбции *in vivo* для Рх ТФ, полученных методом Лоо-Ригельмана

Кинетика высвобождения Рх из П/З ВМ показана на рисунке 6.5. Как видно из представленных данных, фракция ЛС абсорбированная *in vivo*, увеличивалась быстрее, чем соответствующая ей фракция, растворённая в условиях *in vitro* (Рисунок 6.5а). Иными словами, организм воспринимал и поглощал ЛС быстрее, чем происходило его высвобождение в модельной среде.

При этом скорость растворения Рх в условиях *ex vivo* оказалась очень близкой к данным *in vivo*. Это подтверждает, что *ex vivo*-подход лучше имитирует реальные физиологические условия и следовательно, даёт более надёжное представление о поведении системы доставки в организме.

Однако для того, чтобы корректно сопоставить растворение *in vitro* со скоростью абсорбции *in vivo*, требовалось применение временного

масштабирования. Временное масштабирование позволило учесть неполное высвобождение пироксикама (Px) из пектин-зеиновых микросфер (П/З ВМ) в условиях *in vitro* и использовать полученные данные для построения графика Леви (Рисунок 6.5b).

График Леви показывает взаимосвязь между фракцией лекарственного вещества, высвобождаемой в условиях *in vitro*, и фракцией, абсорбируемой *in vivo*. Полученная линейная зависимость свидетельствует о согласованности процессов высвобождения и абсорбции пироксикама. Иными словами, характер абсорбции лекарственного вещества в организме в значительной степени соответствует кинетике его высвобождения, наблюдаемой в модельных условиях.

Профиль высвобождения пироксикама в условиях *ex vivo* оказался близким к профилю его абсорбции у крыс. Это позволяет предположить, что метод *ex vivo* может быть использован для прогнозирования кумулятивной абсорбции препарата *in vivo*. Для П/З ВМ были выявлены заметные различия между скоростями высвобождения и абсорбции в условиях *in vitro* и *in vivo*, что характерно для полимерных систем доставки лекарственных веществ.

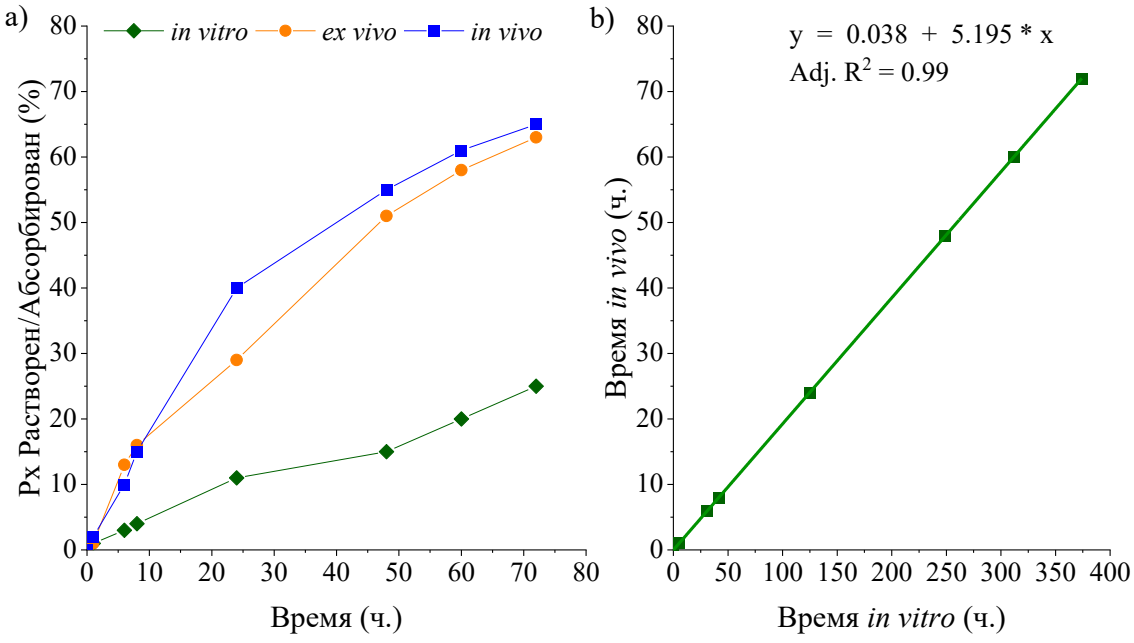


Рисунок 6.5. - Высвобождение Px из П/З ВМ *in vitro, ex vivo* и *in vivo* (a) и график Леви (b)

Сравнение кинетических профилей показало, что данные, полученные в условиях *ex vivo* и *in vivo*, были значительно ближе друг к другу, чем результаты исследований *in vitro* и *in vivo* без временного масштабирования (рисунок 6.5). Угловые коэффициенты линейных зависимостей для *in vitro* и *ex vivo* составляли соответственно 0,33 и 0,93. Значение, близкое к единице, полученное для *ex vivo*, указывает на более высокое соответствие доли высвобожденного пироксикама доле препарата, абсорбированного *in vivo*. Между этими показателями наблюдалась выраженная линейная зависимость с коэффициентом детерминации $R^2 = 0,99$. Следовательно, условия *ex vivo* позволяли точнее воспроизводить характер высвобождения пироксикама из пектин-зеиновых микросфер (П/З ВМ), соответствующий его последующей абсорбции в организме.

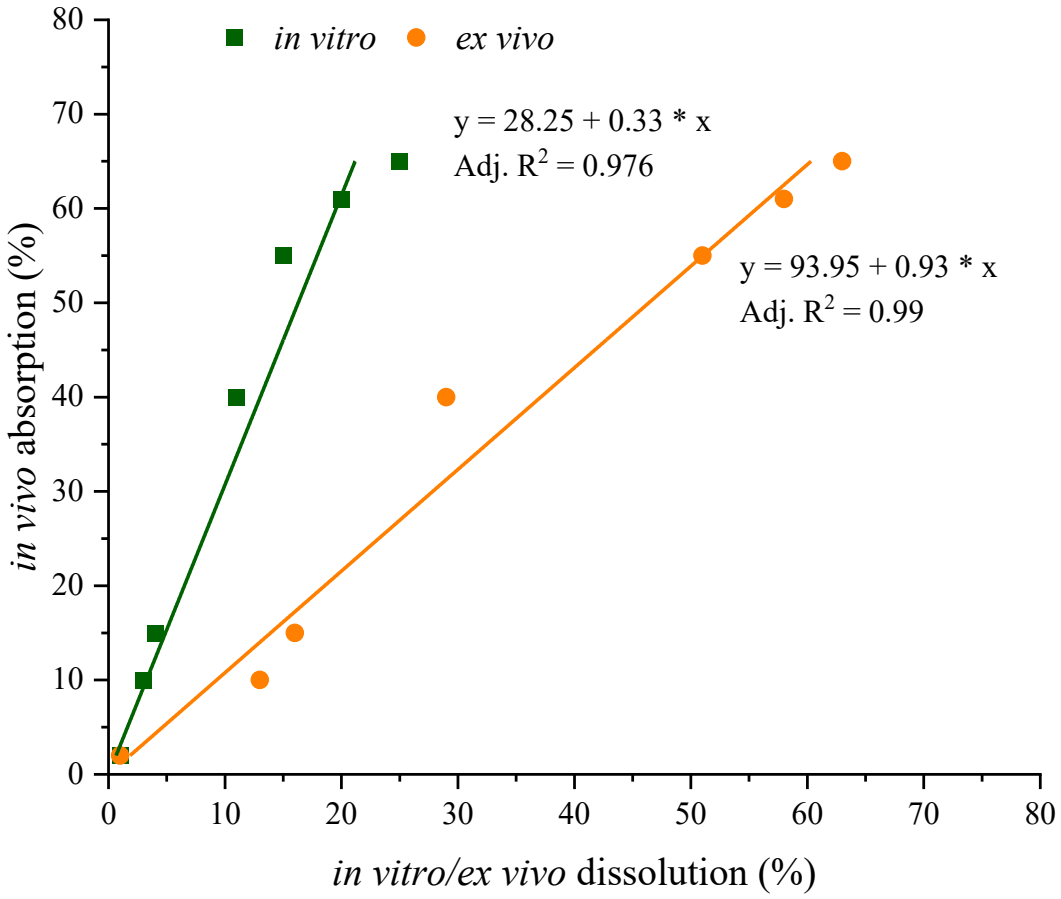


Рисунок 6.6. - Корреляция между долей пироксикама, высвобожденного в условиях *in vitro* и *ex vivo*, и долей препарата, абсорбированного *in vivo*, рассчитанной методом Лоо – Ригельмана

Для оценки прогностической способности разработанных моделей рассчитывали процент ошибки прогнозирования (PE%) фармакокинетических параметров Cmax и AUC. Расчёт проводили путём сопоставления предсказанных значений с экспериментальными данными. Результаты для моделей IVIVC и EVIVC представлены в таблице 6.4. Дополнительно на этом рисунке приведены экспериментальный и прогнозируемые профили концентрации пироксикама в плазме крови, позволяющие оценить соответствие моделей фактической кинетике препарата.

Таблица 6.4. - Ошибки прогнозирования фармакокинетических параметров Cmax и AUC для моделей IVIVC и EVIVC

Модель	Параметр	Предсказанное	Наблюдаемое	%PE
IVIVC	AUC	210,40	211,18	-0,37
IVIVC	C_{max}	3,57	3,82	-6,47
EVIVC	AUC	194,57	211,18	-7,86
EVIVC	C_{max}	3,31	3,82	-13,44

Как видно из таблицы 6.4 для модели IVIVC ошибки прогнозирования AUC и Cmax составлял −0,37 и −6,47% соответственно. Оба значения по абсолютной величине были ниже 10%, что свидетельствует о хорошем соответствии предсказанных и экспериментальных фармакокинетических параметров после применения временного масштабирования в случае *in vitro*.

При использовании модели EVIVC, основанной на сопоставлении доли пироксикама, высвобожденного *ex vivo*, с долей пироксикама, абсорбированного *in vivo*, ошибки прогнозирования составили −7,86% для AUC и −13,44% для Cmax, что также их значения находились в пределах критериев (<15%), принятых для оценки прогнозируемой способности корреляционных моделей [315]. При этом модель IVIVC обеспечивала точное прогнозирование обоих фармакокинетических параметров (только после масштабирование по времени), тогда как EVIVC характеризовалась более высоким коэффициентом

детерминации при непосредственном сопоставлении долей высвобождения и абсорбции.

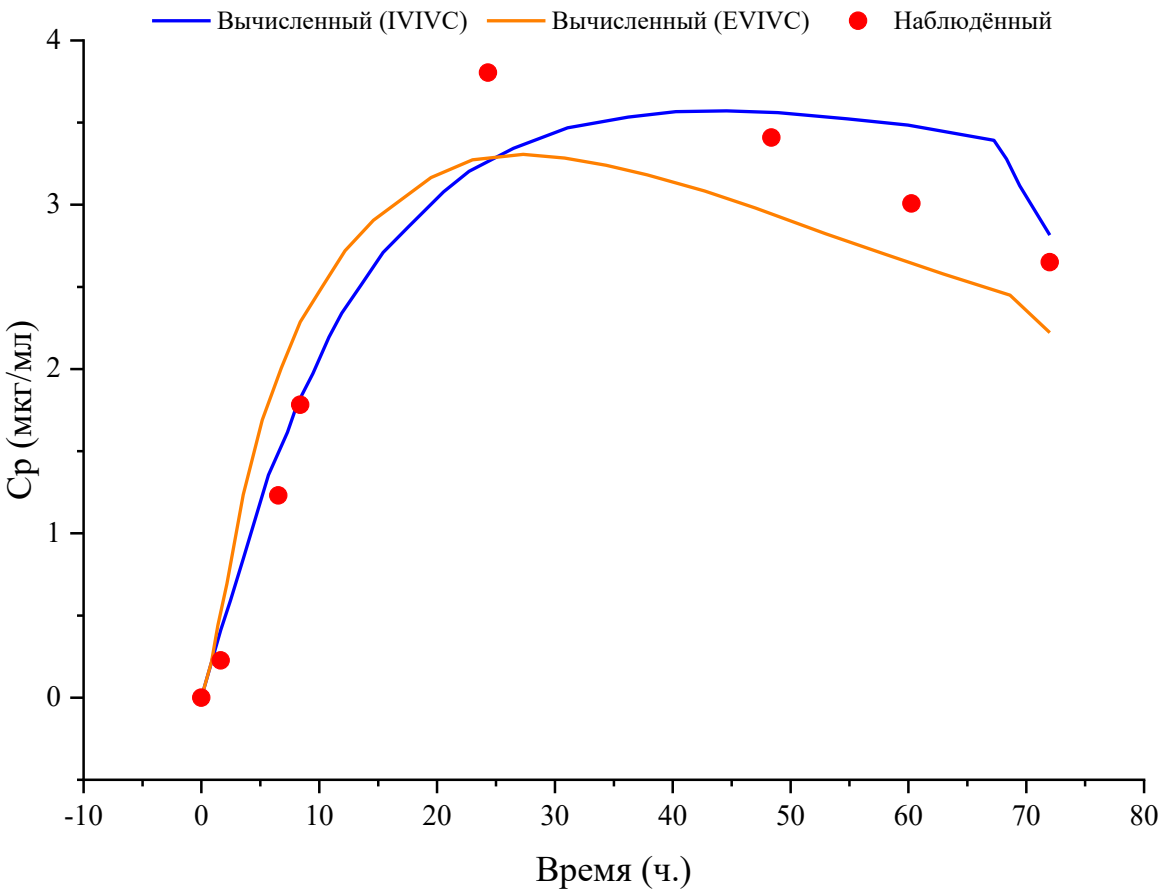


Рисунок 6.7. - Экспериментальные и предсказанные профили концентрации Рх в плазме для П/З ВМ

Высокая скорость высвобождения пироксикама в условиях *ex vivo* по сравнению с *in vitro* связана с активностью кишечных микроорганизмов и их ферментов участвующих в разрушении пектиновой матрицы. Известно, что некоторые представители кишечной микробиоты продуцируют пектат-лиазы, которые расщепляют полисахаридные цепи пектина по механизму β-элиминации [316]. Действие таких ферментов может способствовать постепенному разрушению полимерной матрицы и способствует выходу инкапсулированного лекарственного средства. Дополнительное влияние на процесс высвобождения могли оказывать особенности состава среды *ex vivo*, в том числе присутствие компонентов, изменяющих распределение пироксикама между полимерной матрицей и окружающей средой. В результате сочетанного действия этих

факторов количество высвобожденного препарата в условиях *ex vivo* могло превышать значения, полученные при стандартном испытании *in vitro*. Вместе с тем близость профилей *ex vivo* и абсорбции *in vivo* показывает, что выбранные экспериментальные условия позволяли воспроизводить важные особенности поведения П/З ВМ в кишечной среде.

В заключении, полученные данные подтверждают перспективность пектин-зеиновых микросфер как носителей для пролонгированного высвобождения пироксикама и его доставки в толстый кишечник. При этом разработанные корреляционные модели позволяют сопоставлять результаты лабораторных испытаний с фармакокинетическими данными и могут быть полезны при дальнейшем совершенствовании состава и технологии получения микросфер с другими лекарственными средствами, а для перехода к практическому применению необходимы дополнительные исследования, направленные на уточнение технологических параметров, воспроизводимости характеристик лекарственной формы и требований к её качеству. Представленные результаты служат основой для дальнейшего изучения корреляций IVIVC уровня A и EVIVC применительно к разработанной пектин-зеиновой системе доставки пироксикама особенно на ранних этапах разработки лекарственной формы.

ГЛАВА 7. ПРИМЕНЕНИЕ КОМБИНАЦИИ “ПЕКТИН–АНТИБИОТИК” ПРИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

7.1. Дизайн исследования

Дизайн исследования представлен в таблице 7.1. Далее подробно описаны процедуры клинических испытаний, соответствующие этому дизайну.

Таблица 7.1. - Дизайн исследований

Исследование	Группа пациентов	Схема терапии
Исследование 1	A (n=16)	Метронидазол+ SWS
	B (n=16)	Метронидазол + LMAP
Исследование 2	C (n=15)	Метронидазол + SWS
	D (n=18)	Метронидазол + HMAP

7.2. Исследуемые схемы лечения

В исследовании использовали две схема терапии с применением метронидазола яблочного пектина низкой молекулярной массы и низкой степени метоксилирования (LMAP) и высокой молекулярной массы и высокой степени метоксилирования (HMAP). Первая схема терапии представляла собой смесь 2,0 г яблочного LMAP и 10 г сахарозы, растворённых в 200 мл дистиллированной воды. Вторая схема терапии состояла из 200 мл раствора HMAP, очищенного методом диаультрафильтрации и 10 г сахарозы.

«Контрольный раствор готовили путём растворения 10 г сахарозы в кипячёной охлаждённой воде; она обозначалась как раствор сахарозы в воде (SWS). Пациенты экспериментальных и контрольных групп с острыми заболеваниями ЖКТ, принимали дозу антибиотика один раз в день после приёма пектина или раствора SWS. Состав пектиновой смеси был описан в фармакопейной статье пектина» [317], утверждённой Фармакологическим комитетом Министерства здравоохранения Республики Таджикистан. «Важно отметить, что назначаемое пациентам количество пектина не превышает допустимых уровней суточного потребления, рекомендованных Европейским агентством по безопасности продуктов питания (EFSA) относительно экспозиции пектина» [318].

7.2.1. Характеристика пектинов

Пектин из яблочных выжимок был получен методом флеш-экстракции с последующей очисткой диаультрафильтрацией [232]. Основные характеристики пектиновых образцов, включающие содержание ангидрогалактуроновой кислоты (AGA), степень этерификации (DE), состав нейтральных сахаров (NS), содержание полифенолов (мг галловой кислоты на 1 грамм пектина) и молекулярная масса (Mw) приведены в таблице 7.2.

Таблица 7.2. - Состав и молекулярная масса образцов яблочного пектина

Формула пектина	AGA, %	DE, %	Состав нейтральных сахаров, %					Содержание полифенолов, мг GAE/г	Mw, кДа
			Rha	Ara	Xyl	Gal	Glc		
LMAP	65,5	38,0	2,02	7,50	0,80	4,32	12,68	0,652	113
HMAP	59,4	68,6	5,62	9,58	3,43	4,94	0,70	0,834	165

(Примечание: GAE – эквивалент галловой кислоты)

Показатели содержания токсичных элементов в очищенных образцах LMAP и HMAP (мкг/кг), определённые методом атомно-абсорбционной спектроскопии, были следующими: общий мышьяк – 1,24 ± 0,3; свинец – 1,32 ± 0,4; ртуть – 0,16 ± 0,2; кадмий – 0,17 ± 0,3; алюминий – 1,13 ± 0,6.

Низкое содержание токсичных металлов объясняется удалением микрогеля, образованного комплексами пектин–металл, на стадии центрифугирования. Микробиологические данные (5 партий LMAP и 6 экстрактов HMAP) представлены в документации фармакопейной статьи на пектин. Во всех образцах: общее микробное число < 10 КОЕ/г, дрожжи < 10 КОЕ/г, плесневые грибы < 10 КОЕ/г, *E. coli* – отрицательно в 10 г., Salmonella spp. – отрицательно в 15 г. Анализы проводились в Научно-исследовательском институте профилактической медицины (Минздрав РТ) по стандартам ISO.

7.2.2. Определение метронидазола в крови и фекалиях

Образцы крови получали методом венепункции в объёме 2 мл. Образцы фекалий в количестве 5 г собирали в индивидуальные стерильные контейнеры от каждого пациента. Сыворотку выделяли центрифугированием при 1500 об/мин в течение 30 минут. «Концентрацию метронидазола в плазме и фекалиях

определяли УФ-спектрофотометрическим методом» [319]. Для этого метронидазол растворяли в смеси 0,1 М HCl и ацетонитрила. Максимум поглощения наблюдался при длине волны 278 нм (UV-Vis Spectrometer, Thermo Scientific UV-1, Великобритания). Калибровочный диапазон составил 1–30 мкг/мл ($y = 0{,}035x – 0{,}0073$, $R^2 = 0{,}99$), а раствор сохранял стабильность 36 часов.

Экстракцию метронидазола проводили после осаждения белков плазмы метанолом. Образцы центрифугировали при 10 000 об/мин (Hermle Z 323, Германия) (Hermle Labnet Z 323, Германия) в течение 7 мин, после супернатант фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Концентрацию метронидазола определяли по калибровочному графику.

7.3. Клиническая оценка LMAP

Рандомизированное открытое сравнительное исследование с параллельными группами проводили на базе Инфекционной больницы г. Душанбе. В исследование включали мужчин и женщин с острыми кишечными инфекциями, в том числе амёбиазом и дизентерией. Пациентов с сахарным диабетом исключали в связи с использованием растворов сахарозы. До рандомизации все участники подписывали информированное согласие.

Продолжительность наблюдения составляла 8 дней. В течение этого периода регистрировали температуру тела, частоту стула, наличие патологических примесей (слизи и крови), выраженность клинических симптомов, а также применение пектина и антибактериальных препаратов.

Всего в исследование были включены 32 пациента в возрасте 18–48 лет с диагнозом «кишечный амёбиаз». Пациентов распределили на две сопоставимые группы по 16 человек:

- Группа А (контрольная, n = 16): метронидазол 500 мг и 200 мл SWS три раза в сутки.
- Группа В (основная, n = 16): метронидазол 500 мг и 200 мл LMAP три раза в сутки.

7.4. Клиническая оценка НМАР

Клиническое исследование НМАР проводили на базе Городской клинической инфекционной больницы г. Душанбе. В рандомизированном открытом сравнительном исследовании с параллельными группами участвовали 33 пациента с диагнозом «кишечный амёбиаз». Продолжительность терапии составляла 8 дней. Клиническое состояние пациентов и результаты лечения оценивали по тем же показателям, что и в предыдущем исследовании.

Пациентов распределили на две группы:

- Группа C (контрольная, n = 15): метронидазол 500 мг и 200 мл SWS три раза в сутки.
- Группа D (основная, n = 18): метронидазол 500 мг и 200 мл НМАР три раза в сутки.

«Диагноз кишечного амёбиаза у пациентов подтверждали лабораторным исследованием фекалий на наличие *Entamoeba histolytica*» [320]. Из свежих образцов тёплого кала готовили по 5–6 мазков, окрашивали раствором Люголя и исследовали микроскопически. Состояние пациентов оценивали каждые 4 часа, регистрируя температуру тела, частоту дефекаций, наличие слизи и крови в кале и основные клинические симптомы. Критериями выздоровления служили нормализация температуры и стула, исчезновение тенезмов и патологических примесей.

7.5. Клиническое ведение пациентов и критерии оценки эффективности терапии

В работах Мухидинова З.К. и соавторов изучалось «применение пектина в составе комплексной терапии острых кишечных инфекций, брюшного тифа и жёлчнокаменной болезни» [321]. Полученные результаты авторы связывали с воздействием пектина на кишечную микробиоту, а также с его способностью связывать некоторые соединения, в том числе вторичные жёлчные кислоты, и способствовать их выведению из организма.

Пектины входят в состав повседневного рациона и используются в качестве пищевых добавок. Они практически не расщепляются

пищеварительными ферментами человека, однако могут подвергаться ферментации кишечными микроорганизмами с образованием КЦЖК. Благодаря этому пектин способен влиять на метаболическую активность кишечной микробиоты. Вместе с тем особенности его превращения в кишечнике и характер воздействия на отдельные бактериальные группы изучены ещё недостаточно.

На основании литературного анализа в этой части работы мы предположили гипотезу, что включение яблочного пектина в комплексную терапию острых кишечных инфекций может уменьшать неблагоприятные изменения кишечной среды, сопровождающие заболевание и применение антибактериальных препаратов. В частности, представляло интерес выяснить, способствует ли сочетание пектина с противомикробной схемой терапии уменьшению выраженности клинических симптомов и сокращению сроков выздоровления.

Для проверки этой гипотезы была проведена серия клинических исследований, в которых оценивали действие двух видов яблочного пектина в составе комплексного лечения пациентов с кишечным амёбиазом. Основное внимание уделяли динамике клинических проявлений заболевания и различиям в результатах лечения между исследуемыми группами.

7.6. Лечение острых инфекционных заболеваний с использованием низкометилированного пектина

7.6.1. Оценка эффективности комбинации метронидазола с LMAP при кишечном амебиазе

В обеих сериях исследований пациенты первой и второй групп были сопоставимы по возрасту ($p>0,05$); значительной разницы в длительности пребывания в больнице также не выявлено. Несмотря на то, что у 25% пациентов первой группы и у 75% – второй при кишечном амёбиазе наблюдались характерные симптомы выздоровления в течение 3 – 4 суток, все участники оставались под наблюдением и выписывались в конце 8-го дня.

Диагноз “кишечный амёбиаз” устанавливали на основании микроскопического выявления энтеропатогена *Entamoeba histolytica*. Из 40 пациентов с дизентерией у 18 наличие *Shigella flexneri* было подтверждено бактериологическим исследованием кала, в остальных случаях диагноз выставлялся по клиническим показаниям. Клинически у пациентов наблюдалось снижение температуры, но они страдали от нарастающей боли и чувствительности в нижней части живота в первый день вмешательства, имели позывы к дефекации, тенезмы и выделение кровянистых слизистых испражнений. В первые сутки лечения у больных отмечалось снижение температуры на фоне нарастающего болевого синдрома и чувствительности в нижней части живота; также фиксировались тенезмы и стул с примесью крови и слизи. В обоих случаях интенсивность диареи наблюдалась со 2-го по 7-й день. В обеих сериях эксперимента выраженная диарея наблюдалась со 2-х по 7-е сутки. Частота дефекаций составляла 10–15 раз в сутки у 6 пациентов, 15–20 раз - у 10 и 20–25 раз - у остальных участников исследования.

Таблица 7.3. - Нормализация симптомов у пациентов с кишечным амёбиазом, леченных по схеме (A) метронидазол + SWS и (B) метронидазол + LMAP

Симптомы	Дни													
	1		2		3		4		5		6		7	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Нормализация частоты стула	0	0	2	3	6	8	8	14	10	16	14	-	16	-
Отсутствие слизи в стуле	0	0	0	4	0	8	3	14	8	16	15	-	16	-
Отсутствие крови в стуле	0	0	0	4	2	8	6	12	12	16	16	-	-	-
Прекращение рвоты	1	6	5	12	10	16	14	-	16	-	-	-	-	-
Нормализация температуры тела	0	0	0	8	6	12	10	16	14	-	16	-	-	-

- Пациенты не получили назначенную схему лечения или были выписаны.

Результаты лечения пациентов с кишечным амёбиазом при использовании контрольной комбинации (метронидазол + SWS) и исследуемого комплекса (метронидазол + LMAP) представлены в таблице 7.3. Установлено, что

нормализация частоты стула на 2–3-и сутки после контрольного лечения (метронидазол в сочетании с раствором сахарозы) отмечена у 2 пациентов, а при использовании терапии метронидазол + LMAP - у четырёх пациентов на 2–4-е сутки. Полная нормализация стула у всех обследованных пациентов произошла только после 6–7-х суток.

В отличие от контрольной группы, применение пектина во второй группе привело к нормализации стула у трёх пациентов на 2-е сутки, у восьми - на 3-и, а у остальных участников исследования - на 3–5-е сутки лечения. Более того, купирование прочих клинических признаков наблюдалось на 1–2 суток раньше, чем нормализация частоты стула. У шести пациентов рвота прекратилась в первые сутки после начала приёма пектина, а у остальных пациентов данная симптоматика полностью исчезла к третьему дню терапии.

7.6.2. Оценка эффективности комбинации метронидазола с HMAP при кишечном амебиазе

В рамках данного исследования лечение пациентов с кишечным амёбиазом проводилось в условиях стационара с использованием схемы терапии “метронидазол + SWS” (контроль) и “метронидазол + HMAP”, согласно описанной ранее методике. Схема терапии “антибактериальный препарат + HMAP” хорошо переносилась больными; побочных эффектов зафиксировано не было. «Известно, что при пероральном приёме биодоступность метронидазола составляет около 80%; максимальная концентрация в плазме крови Cmax достигается через 1–2 часа» [322, 323]. «Метронидазол и его метаболиты выводятся в основном через почки (77%) и в меньшей степени через фекалии (14%)» [323].

Концентрация метронидазола в плазме (группа C) достигала 17,93 мг/л через 2 часа и снижалась до 8,26 мг/л через 8 часов после перорального приёма препарата в сочетании с раствором сахарозы (схема M+SWS). В отличие от этого, во второй группе (группа D) после перорального приёма комбинации “метронидазол + HMAP” концентрация лекарственного средства в плазме пациентов составила 18,67 мг/л через 2 часа и 13,38 мг/л - через 8 часов.

Определить содержание метронидазола в фекалиях не удалось из-за низкого уровня экскреции препарата и матричных помех.

«Метронидазол, ципрофлоксацин и их метаболиты в основном выводятся преимущественно через почки и в меньшей степени через кишечник с фекалиями (14%)» [322, 323]. Тем не менее, в этой работе сочетанное применение пектина способствовало повышению биодоступности антибактериального препарата, что привело к улучшению его фармакокинетики и, как следствие, повысило клиническую эффективность лечения. С этой точки зрения композиция “пектин-полифенол-антибиотик” может служить основой для повышения эффективности уже существующих антимикробных препаратов. Таким образом, использование природных полимеров в качестве компонентов комплексной терапии может сыграть положительную роль в повышении эффективности антибактериального лечения и снижении инфекционной нагрузки.

Эффективность лечения в первом исследовании (группы A, B и C, D), выраженная в процентах выздоровевших пациентов, представлена на рисунке 7.1. Результаты исследований продемонстрировали, что комбинированная схема лечения “пектин-антибиотик” значительно уменьшила тяжесть клинических симптомов острых кишечных инфекций и позволила пациентам выздороветь в более короткие сроки по сравнению с традиционной терапией.

Исследование показало, что применение комплекса “метронидазол-НМАР” в лечении кишечного амёбиаза способствует поддержанию стабильной концентрации основного препарата в крови и фекалиях в течение всего курса терапии. Это приводит к ускорению клинического выздоровления пациентов с исчезновением основных симптомов инфекционного процесса. В результате сроки пребывания пациентов в стационаре сократились на 3,0±1,0 дня.

Анализ распределения средних значений концентрации препарата (Рисунок 7.2) показал, что концентрация метронидазола в плазме у пациентов, получавших формулу НМАР, была выше, чем в контрольной группе. Уровень концентрации метронидазола у пациентов контрольной группы достигал максимума через 2 часа после приёма, но в течение наблюдаемых дней (3-й и 6-

й дни) значительно снижался и через 8 часов достигал минимального уровня - 8,26 мг/л.

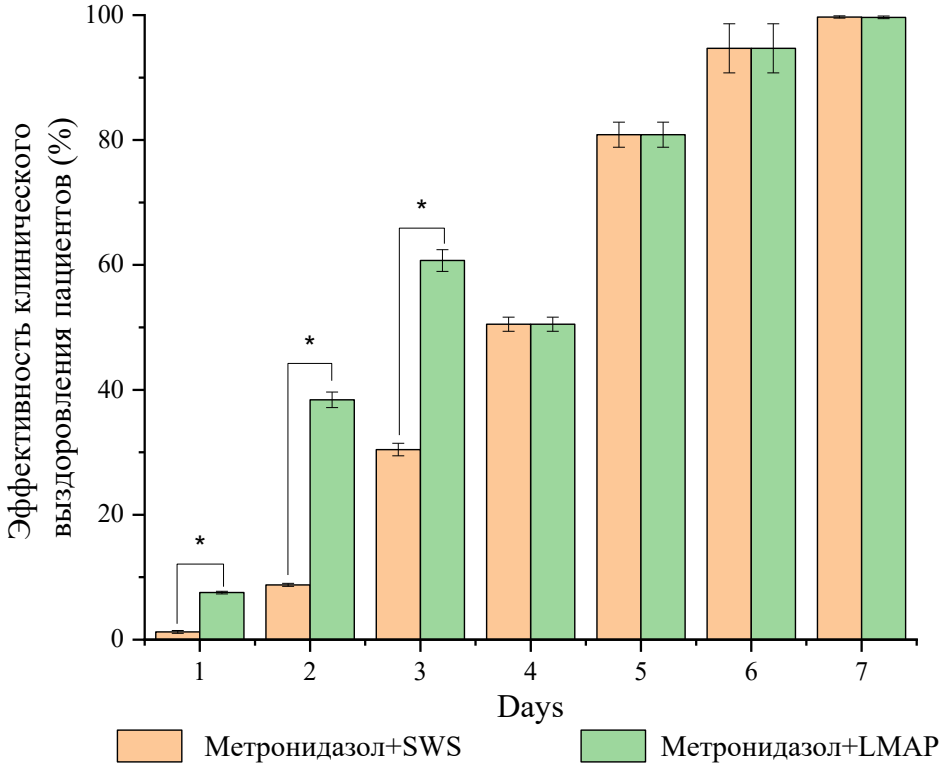


Рисунок 7.1. - Сравнительная эффективность комбинации антибиотик + SWS и антибиотик + LMAP в терапии кишечного амебиаза (среднее значение ± SD, p < 0,05)

«Действие пектина в желудочно-кишечном тракте связано с его физико-химическими свойствами и взаимодействием с кишечной микробиотой. Антибактериальную и иммуномодулирующую активность пектина изучали преимущественно в экспериментах *in vitro* и на моделях животных [7, 232, 324, 325, 326, 327], тогда как клинических исследований недостаточно изученно» [326, 328, 329, 330, 331].

«В литературе описаны четыре основных механизма действия пищевых волокон: ограничение доступа пищеварительных ферментов к питательным веществам за счёт растительных клеточных стенок, изменение реологических свойств кишечного содержимого, связывание отдельных соединений и ферментация кишечной микробиотой» [320, 332, 333, 334]. Для пектина особое значение имеют последние три механизма.

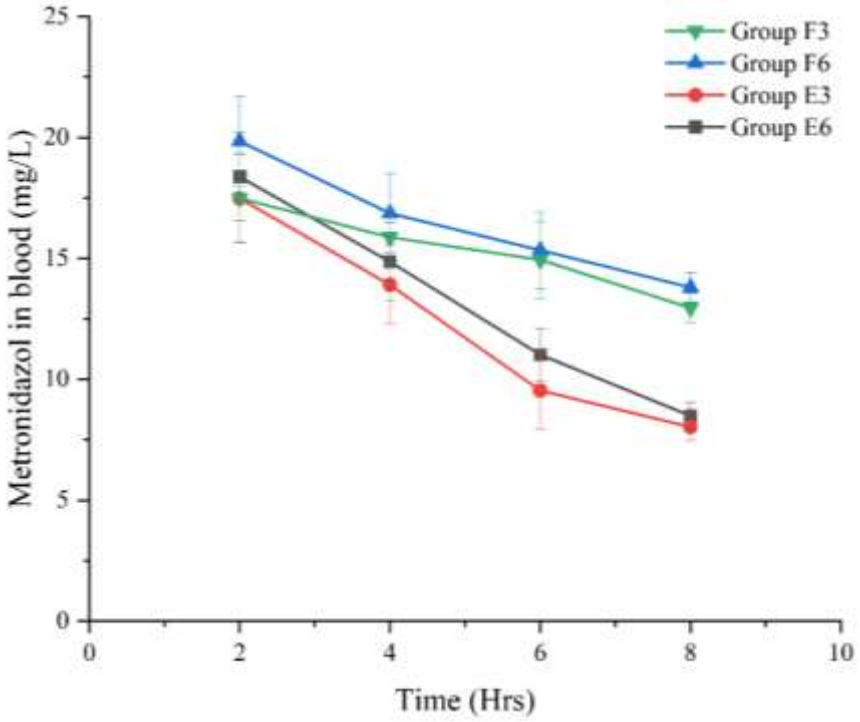


Рисунок 7.2. - Динамика распределения метронидазола в плазме крови пациентов с кишечным амёбиазом на 4-й и 6-й день лечения: (▼) – среднее значение концентрации метронидазола в плазме крови у 6 пациентов группы E на 4-й день лечения, (▲) – среднее значение концентрации метронидазола в плазме крови у пациентов группы E на 6-й день лечения, (●) – среднее значение концентрации метронидазола в плазме крови у пациентов группы F на 4-й день лечения, (□) – среднее значение концентрации метронидазола в плазме крови у пациентов группы F на 6-й день лечения. Примечание: различия значимы (p<0,05)

В рандомизированном исследовании энтеральных смесей с пектином у пациентов отделения интенсивной терапии авторы сообщили об улучшении клинических показателей [335], в частности уменьшение частоты срыгиваний у детей при применении пектинсодержащих детских смесей [329, 330]. Влияние неперевариваемых углеводов на кишечник осуществляться непосредственно через взаимодействие с эпителием и иммунной системой слизистой оболочки [336], либо опосредованно через изменение состава и метаболической активности микробиоты [337]. Пектин также способен влиять на состояние кишечного барьера и свойства защитной слизи [338] и характер такого

взаимодействия зависит от степени этерификации. Низкометилированный пектин содержит больше свободных карбоксильных групп, отрицательный заряд которых может ограничивать электростатическое связывание с муцинами по сравнению с высокометилированным пектином, который имеет меньше таких групп и способен взаимодействовать с компонентами слизистого слоя посредством водородных связей [339].

При совместном применении пектина с антибактериальными препаратами необходимо учитывать присутствие сопутствующих полифенольных соединений, так как в литературе описано усиление антимикробной активности пектин-полифенольных комплексов [22]. Например, IntegroPectin, полученный из цитрусового сырья с сохранением части полифенолов, проявлял высокую антибактериальную активность, чем коммерческий цитрусовый пектин.

Содержание фенольных соединений зависит от растительного сырья и способа получения пектина [340]. Для пектина сахарной свёклы приведено значение до 0,7%, или 7,0 мг в эквивалентах феруловой кислоты на грамм пектина, а в пектине апельсиновой кожуры 0,160 мг/г при кислотной и 0,740 мг/г при водной экстракции. В исследованных нами низко- и высокоэтерифицированных яблочных пектинах содержание полифенолов достигало 6,52 и 8,34 мг GAE/г соответственно. Полифенолы могут взаимодействовать с кишечной микробиотой и влиять на активность антибактериальных препаратов [341, 342]. O. Aprikian и соавторы установили, что совместное применение яблочного экстракта, богатого полифенолами и яблочного пектина оказывало выраженное действие на метаболическую активность кишечной микробиоты и показатели липидного обмена, чем применение самого экстракта [343]. Антимикробную активность выявили также у экстрактов кожуры яблок сортов «Роял Гала» и «Грэнни Смит» в отношении *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 [344].

В проведённом нами клиническом исследовании включение яблочного пектина в комплексное лечение кишечных инфекций, вызванных *Entamoeba*

histolytica и *Shigella flexneri*, сопровождалось более быстрым уменьшением клинических симптомов. У пациентов раньше прекращались рвота и диарея, нормализовалась температура тела и восстанавливался аппетит в сравнении со стандартной терапией, а сроки клинического выздоровления статистически значимо сократились.

Таким образом, в исследованных группах добавление яблочного пектина к стандартному лечению сопровождалось улучшением клинических показателей. Однако по этим результатам нельзя установить, какой именно механизм определял наблюдаемый эффект: сорбционные свойства пектина, его взаимодействие с кишечной микробиотой или действие сопутствующих соединений. Для подтверждения этой гипотезы необходимо исследовать совместное применение пектина с антибактериальными лекарственными средствами и полифенолами. Особого внимания требует способность комплекса «пектин–полифенол–антибиотик» влиять на высвобождение лекарственного вещества и его концентрацию в очаге инфекции. При этом необходимо сравнить действие комбинаций «пектин–антибиотик» и «полифенол–антибиотик», оценить безопасность длительного применения пектинсодержащих препаратов, включая образование токсического метанола и альдегидов при их превращении в кишечнике.

Проведённое нами клиническое исследование показало, что яблочный пектин полезен как дополнительный компонент комплексной терапии кишечного амёбиаза и дизентерии. Дальнейшая работа должна быть направлена на установление механизмов его действия, оценку взаимодействия с лекарственными веществами и определение условий, при которых применение пектина даёт воспроизводимый терапевтический эффект.

ГЛАВА 8. ОБЗОР РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

««Одним из важных вопросов, рассмотренных в данной работе, является изучение влияния способов получения и очистки пектина на его свойства при использовании в системах доставки лекарственных средств. Известно, что свойства пектина зависят от его происхождения, молекулярной массы и степени этерификации» [174, 203, 345]. Однако при получении пектина из одного и того же растительного сырья разными способами его характеристики различаться. Это связано с тем, что условия выделения и очистки оказывают влияние на свойства полученного полисахарида. Поэтому при разработке лекарственных форм необходимо учитывать не только происхождение растительного сырья, но и способ получения пектина, так как от этого зависит свойства и воспроизводимость системы доставки.

«Проведённые нами исследования показали, преимущества тангенциальной диаультрафильтрации по сравнению с вакуумным выпариванием с последующим спиртовым осаждением» [232]. При использовании данного метода содержание галактуроновой кислоты в полученном пектине составило 64,8 %, тогда как при традиционном способе очистки этот показатель равен 50,4 %. Степень этерификации пектина составило соответственно 71,4 и 68,6 %. Кроме того, при использовании тангенциальной диаультрафильтрации снизились полидисперсность пектина, расход этанола и энергозатраты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что способ очистки оказал влияние на физико-химические характеристики пектина. Следовательно, данный результат необходимо учитывать при его дальнейшем стандартизации в фармации, поскольку однородность свойств полисахарида имеет важное значение для получения воспроизводимых лекарственных форм.

Получение зеина из местного кукурузного сырья и оценка возможности его применения совместно с пектином, является одной из важных задач данной исследовательской работы. Было выявлено, что среди исследованных методов, наиболее подходящим оказалась трёхкратная экстракция 75%-м этанолом, которая обеспечивает выход зеина 3,3%. Полученный белок был использован в

качестве структурообразующего компонента пектин-зеиновых микросфер. Из-за гидрофобного свойства зеин ограничил взаимодействие полимерной матрицы с водной средой и повлиял на её способность к набуханию. Данный процесс имеет существенное значение для удерживания пироксикама и регулирования скорости его последующего высвобождения.

«Таким образом, зеин в составе разработанных микросфер был использован не только как структурообразующий компонент. Было выявлено, что изменение его содержания повлияло на структуру микросфер, их устойчивость в водной среде и скорость высвобождения лекарственного вещества. В результате проведённых исследований были получены микросферы, в которых содержание инкапсулированного пироксикама достигало 93,8 %, а высвобождение препарата продолжалось более шести суток. Для сравнения, из традиционной лекарственной формы около 90 % пироксикама высвободилось в течение первых 24 часов» [66, 67].

«В результате исследования было установлено, что соотношение зеина и пектина оказывает влияние на свойства полученных микросфер, т.е., увеличение содержания зеина привело к повышению выхода микросфер и одновременному уменьшению степени их набухания. Так, при массовом соотношении зеина и пектина 5:1 содержание пироксикама в комплексе достигло 93,8 %, степень набухания снизилось до 7,5 %, а выход микросфер составил 64,7 %. Наиболее высокая эффективность инкапсуляции пироксикама, полученная в другой серии экспериментов, составила 95,20 % при соотношении пектина и зеина от 1,0:1 до 1,5:1» [45, 46].

Сравнительный анализ полученных результатов показал, что увеличение содержания зеина не всегда приводит к получению лекарственной формы с оптимальными свойствами. Вот почему при выборе соотношения полимеров следует учитывать выход микросфер, эффективность инкапсуляции лекарственного вещества, степень набухания и скорость высвобождения пироксикама. Следовательно, наиболее подходящее соотношение пектина и зеина следует выбирать с учётом всех этих характеристик, а также

предполагаемого применения разработанной системы доставки лекарственных средств.

«Различия между исследованными композитами, которые были получены в результате экспериментов, связаны с взаимодействием гидрофильных и гидрофобных компонентов полимерной матрицы. При небольшом содержании зеина пектин легче взаимодействовал с водой, что привело к увеличению степени набухания микросфер и потере части пироксикама в процессе их формирования и промывки. При увеличении содержания зеина взаимодействие матрицы с водой уменьшилось, что способствовало лучшему удерживанию лекарственного вещества. Однако при слишком высоком содержании зеина изменились взаимодействия между полимерами, что повлияло на формирование микросфер и их свойств. Поэтому при разработке таких систем необходимо учитывать не только соотношение пектина и зеина, но и структуру полученной полимерной матрицы» [45, 46].

Важно отметить, что выбор сшивающего агента повлиял на свойства полученных микросфер. При сравнении микросфер, полученных с использованием ионов кальция (Ca^{2+}) и цинка (Zn^{2+}), были обнаружены различия в степени набухания и содержания инкапсулированного пироксикама. Выявлено, что при использовании ионов цинка степень набухания микросфер была ниже. Например, при соотношении полимеров 2:1 этот показатель составлял 5,80.

Различия в действии ионов кальция и цинка, связаны с тем, что они по-разному взаимодействуют с карбоксильными группами пектина и функциональными группами зеина. Эти взаимодействия влияют на структуру полимерной матрицы, а также на проникновение воды и высвобождение лекарственного вещества. Таким образом, полученные результаты показывают, что выбор сшивающего агента имеет важное значение не только для получения пектин-зеиновых микросфер, но и для изменения их свойств.

«Степень этерификации пектина имеет важное значение для свойств микросфер. Известно, что низкометилированные пектины содержат больше свободных карбоксильных групп, которые могут взаимодействовать с

двухвалентными катионами и участвовать в образовании полимерной сети» [69, 71]. В результате наших исследований было выявлено, что при использовании пектинов с разной степенью этерификации изменяется степень набухания микросфер и способность удержания пироксикам, так как количество свободных карбоксильных групп влияет на образование и плотность полимерной сети.

Также, была выявлена связь между степенью набухания микросфер и скоростью высвобождения пироксикама. При увеличении набухания вода легче проникает в полимерную матрицу, способствуя высвобождению лекарственного вещества. При меньшей степени набухания этот процесс обычно происходит медленнее. Однако результаты кинетического анализа показали, что высвобождение пироксикама зависет не только от диффузии. В зависимости от состава микросфер на этот процесс также влияют набухание матрицы, изменение подвижности полимерных цепей и её структуры.

«Полученные результаты представляют интерес для разработки систем доставки пироксикама в толстую кишку, так как одним из компонентов микросфер является пектин. Известно, что пектин устойчив к действию пищеварительных ферментов человека, однако расщепляется ферментами кишечных микроорганизмов» [346, 347]. Кроме того, присутствие зеина благодаря его гидрофобным свойствам замедляет проникновение воды в полимерную матрицу и тем самым ограничивает преждевременное высвобождение пироксикама в верхних отделах желудочно-кишечного тракта.

В разработанных нами микросферах пектин и зеин выполняют разные функции, при этом дополняя друг-друга. Зеин уменьшает степень набухания микросфер и замедляет высвобождение пироксикама. В то же время пектин расщепляется под действием ферментов кишечных микроорганизмов. Благодаря сочетанию этих свойств разработанная система обеспечивает пролонгирование пироксикама и представляет интерес для его доставки в толстую кишку. Полученные результаты также показывают, что изменение соотношения пектина и зеина, а также условий получения микросфер влияют на их свойства и высвобождение лекарственного вещества.

В нашей работе также было проведено сравнение высвобождения пироксикама в условиях *in vitro* и *ex vivo* с результатами фармакокинетических исследований *in vivo*. Это позволило оценить, как высвобождение пироксикама из полимерной матрицы связано с его последующим поступлением в системный кровоток.

«Были использовали корреляционные модели IVIVC и EVIVC для изучения связи между высвобождением пироксикама и его поступлением в системный кровоток. При сравнении результатов *in vitro* и *in vivo* после обработки данных с учётом времени была установлена выраженная линейная зависимость. Для модели *ex vivo – in vivo* коэффициент детерминации составлял $R^2 = 0,99$. Ошибки прогнозирования AUC и Cmax для модели IVIVC составляли 0,37 и 6,47 % соответственно, а для EVIVC — 7,86 и 13,44 %. Эти результаты показывают, что данные о высвобождении пироксикама в условиях *in vitro* и *ex vivo* можно использовать для оценки его фармакокинетических показателей *in vivo»* [49].

Важно отметить, что, несмотря на более высокий коэффициент детерминации модели EVIVC, ошибки прогнозирования AUC и Cmax были больше, чем у модели IVIVC. После временного масштабирования модель IVIVC показала лучшее соответствие между расчётными и экспериментальными фармакокинетическими показателями. Таким образом, обе модели позволяют оценивать связь между высвобождением и абсорбцией пироксикама, но с разных сторон. Модель IVIVC обеспечивала более точное прогнозирование фармакокинетических показателей, тогда как EVIVC показала более высокую линейную корреляцию между исследованными данными.

Высокая корреляция между результатами *ex vivo* и *in vivo*, связана с тем, что стандартные исследования растворения не учитывают условия кишечной среды. Так как пектин может расщепляться под действием ферментов кишечных микроорганизмов, в том числе пектат-лиаз. При этом разрушение пектиновой части микросфер облегчает высвобождение пироксикама и влияет на его скорость. Следовательно этим объясняются полученные результаты, однако для

подтверждения роли отдельных ферментов потребуются дополнительные исследования.

Фармакокинетические исследования на крысах показали, что после введения пектин-зеиновых микросфер пироксикам длительнее сохраняется в плазме крови. По сравнению с традиционной лекарственной формой препарат медленнее выводится из организма, а среднее время его пребывания в организме увеличивается. Полученные результаты согласованы с данными исследований *in vitro*, где также наблюдается более длительное высвобождение пироксикама. Это показывает, что использование пектин-зеиновой матрицы влияет не только на скорость высвобождения препарата, но и на его фармакокинетические характеристики.

Следует особо выделить результаты исследования влияния кишечной микробиоты на свойства пектинсодержащих систем. Для этого использовали модели кишечника с разными условиями культивирования микроорганизмов. При сравнении одно- и трёхкамерных моделей было установлено, что различия в pH, количестве доступных питательных веществ и времени пребывания содержимого повлияли на состав кишечной микробиоты и её метаболическую активность.

«В трёхкамерной модели кишечника содержание короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) составило 82,35–110,39 ммоль/л, тогда как в однокамерной модели этот показатель равняется 58,23 ммоль/л. Кроме того, трёхкамерная модель позволило отдельно изучить условия восходящего, поперечного и нисходящего отделов толстой кишки. При сравнении двух моделей было установлено, что даже при использовании одного и того же исходного инокулята состав кишечной микробиоты и её метаболическая активность различаются в зависимости от условий культивирования» [206].

В отдельных экспериментах было изучено влияние pH среды на состав кишечной микробиоты. В результате было установлено, что изменение pH на одну единицу приводит к видимым изменениям в составе микроорганизмов, находящихся в просвете кишечника и связанных со слизистой оболочкой. При

этом изменяется и содержание короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК). Показательно, что при повышении и снижении pH отдельные группы бактерий реагируют по-разному. Полученные результаты показывают, что при изучении взаимодействия пектина с кишечной микробиотой учитывается кислотная среда, так как она может влиять на расщепление пектина микроорганизмами и образование продуктов его ферментации.

В проводимых исследованиях были изучены влияние пектинов с разной молекулярной массой и степенью этерификации на кишечную микробиоту. В результате, установлено, что оба образца пектина увеличили общее содержание короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) в 1,49 и 1,46 раза соответственно. Однако их влияние на микробиоту было разным. При использовании низкомолекулярного высокоэтерифицированного пектина (НМ-ВСЭ) содержание масляной кислоты увеличивалось в 1,41 раза. В то же время высокомолекулярный низкоэтерифицированный пектин (ВМ-НСЭ) вызвал более заметные изменения в составе кишечных микроорганизмов.

«При сравнении двух образцов пектина было выявлено различия в их влиянии на кишечную микробиоту. Оба образца повышали общее содержание короткоцепочечных жирных кислот, однако их действие на отдельные группы бактерий было неодинаковым. Так, при использовании низкомолекулярного высокоэтерифицированного пектина содержание масляной кислоты увеличивалось в 1,41 раза, тогда как высокомолекулярный низкоэтерифицированный пектин вызвал изменения в составе бактерий семейства *Lachnospiraceae*, которые наблюдались у обоих доноров. При этом следует учитывать, что исследованные пектины различались одновременно по молекулярной массе и степени этерификации. Поэтому определить влияние каждого из этих показателей отдельно по полученным данным было невозможно. Однако результаты исследования подтверждают, что пектины с разными физико-химическими характеристиками по-разному влияют на состав и метаболическую активность кишечной микробиоты» [348].

В настоящей работе также нами было изучено влияние растворимых и нерастворимых пищевых волокон на кишечную микробиоту. Исследования проводились в модели SHIME с использованием микробиоты трёх доноров. Было установлено, что обе фракции волокон изменяли состав кишечных микроорганизмов и содержание короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК). Однако эти изменения были неодинаковыми у разных доноров. Например, при добавлении нерастворимых волокон у доноров 1 и 3 увеличивалась относительная численность *Faecalibacterium* в просветной среде проксимального отдела толстой кишки. В то же время растворимые волокна увеличивали относительную численность *Fusobacterium* в дистальном отделе у донора 1. Таким образом, полученные результаты показали, что влияние пищевых волокон на кишечную микробиоту зависит не только от типа волокон, но и от исходного состава микробного сообщества и отдела кишечника.

Полученные результаты показали, что влияние пищевых волокон на кишечную микробиоту во многом зависит от её исходного состава, который различается у разных доноров. Кроме того, было установлено, что не только растворимые, но и нерастворимые пищевые волокна влияют на структуру микробных сообществ и образование короткоцепочечных жирных кислот. Это показывает, что растворимость волокон не является единственным фактором, влияющим на их взаимодействие с кишечной микробиотой. Однако для более полного понимания ферментации нерастворимых волокон и их действия на кишечную микробиоту необходимы дополнительные исследования.

Отдельные исследования были посвящены изучению влияния пробиотического штамма *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG (LGG) на кишечную микробиоту с использованием модели SHIME. Было установлено, что в отдельных условиях численность LGG увеличивалась в 7–540 раз по сравнению с исходным уровнем. Однако, несмотря на такое увеличение, значительных изменений в общем составе кишечной микробиоты не наблюдалось. Влияние LGG на содержание основных короткоцепочечных жирных кислот (КЦЖК) также было небольшим.

Полученные результаты показали, что увеличение численности пробиотического штамма LGG не всегда обусловлено изменениями в составе кишечной микробиоты и образованием короткоцепочечных жирных кислот. Несмотря на то что численность LGG в отдельных условиях значительно увеличивалась, его влияние на метаболическую активность микробного сообщества было ограниченным. Это показывает, что при изучении пробиотических штаммов необходимо учитывать не только их численность, но и влияние на состав кишечной микробиоты и образование её метаболитов [305, 349].

В результате введения пробиотического штамма LGG было изучено изменения в образовании продуктов метаболизма ароматических аминокислот. Было установлено увеличение содержания индол-3-пропионовой кислоты (IPA) и некоторых других метаболитов триптофана в модели SHIME. При этом содержание этих веществ различалось в зависимости от отдела моделируемой толстой кишки. Полученные результаты показывают, что образование метаболитов триптофана зависит не только от присутствия LGG, но и от условий и состава микробного сообщества в разных отделах кишечника.

Проведённый анализ показал, что увеличение содержания индол-3-пропионовой кислоты (IPA) не соответствует численности известных бактерий, образующих это вещество. Поэтому дополнительно изучали метагеномные данные и наличие генов *fldABC*, участвующих в превращении ароматических аминокислот. В результате были обнаружены последовательности генов *fldBC*, связанные с представителями *Enterocloster*, *Fusobacterium*, *Acidaminococcus* и *Megasphaera*. Однако их сходство с известными генами *fldABC* составляло менее 60 %, что не позволяет окончательно подтвердить участие этих бактерий в образовании IPA. Таким образом, полученные результаты показали связь между введением LGG и увеличением содержания IPA, а также указали на возможное участие других кишечных микроорганизмов в образовании этого метаболита.

На заключительном этапе работы нами было изучено применение яблочных пектинов LMAP и HMAP в комплексном лечении кишечных инфекций.

В клинических исследованиях пектиновые препараты применялись совместно с метронидазолом. Полученные результаты сравнивали с показателями контрольных групп. Это позволило оценить действие пектинов не только в экспериментальных условиях, но и при лечении пациентов с кишечными инфекциями.

«Результаты клинических исследований показали, что при совместном применении пектиновых препаратов с метронидазолом основные симптомы кишечных инфекций уменьшались быстрее по сравнению с контрольными группами. При применении пектина совместно с метронидазолом наблюдалось более быстрое исчезновение таких симптомов заболевания, как диарея и рвота, а также более ранняя нормализация температуры тела и восстановление аппетита.

Таким образом, полученные результаты показали положительное влияние яблочных пектинов в составе комплексной терапии кишечных инфекций» [173].

Кроме клинических показателей, в исследовании также тзучено влияние пектина на концентрацию метронидазола в плазме крови пациентов. Было установлено, что при совместном применении метронидазола с НМАР через 8 часов его концентрация составляла 13,38 мг/л, тогда как в контрольной группе этот показатель был равен 8,26 мг/л. При этом у пациентов, получавших комбинированное лечение, наблюдалось более быстрое уменьшение симптомов заболевания, а продолжительность госпитализации сокращалась на 3,0 ± 1,0 дня. Полученные результаты показывают, что применение яблочного пектина совместно с метронидазолом сопровождается изменением концентрации препарата в крови и улучшением клинических показателей лечения.

На основании проведённых исследований можно сделать вывод, что свойства разработанных систем доставки лекарственных средств зависят от нескольких факторов. Прежде всего, влияние способа очистки пектина на его физико-химические характеристики. При получении микросфер важное значение имеют соотношение пектина и зеина, степень этерификации пектина и выбор сшивающего агента. Изменение этих условий влияет на степень набухания микросфер и скорость высвобождения пироксикама. Кроме того, результаты

исследований *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* позволили сравнить высвобождение пироксикама из полимерной матрицы с его поступлением в системный кровоток.

При изучении кишечной микробиоты было установлено, что её состав и метаболическая активность зависят от условий кишечной среды и свойств используемых пектинов. В частности, различия наблюдаются при изменении pH, молекулярной массы и степени этерификации пектина. В клинической части исследования было показано, что совместное применение яблочных пектинов с метронидазолом сопровождаются более быстрым уменьшением симптомов кишечных инфекций по сравнению с контрольными группами.

Таким образом, проведённые исследования показали, что пектин может использоваться не только как вспомогательное вещество, но и как основной компонент систем доставки лекарственных средств. При разработке таких систем необходимо учитывать способ получения и очистки пектина, его физико-химические свойства, состав полимерной матрицы и особенности взаимодействия с биологической средой. Полученные результаты могут служить основой для дальнейшего совершенствования пектинсодержащих лекарственных форм и изучения их эффективности.

ВЫВОДЫ

1. Разработан способ очистки пектина методом тангенциальной диаультрафильтрации, позволяющий получать полисахарид с улучшенными физико-химическими характеристиками. По сравнению с вакуумным выпариванием и спиртовым осаждением содержание галактуроновой кислоты увеличивалось с 50,4 до 64,8%, а степень этерификации с 68,6 до 71,4%. Одновременно снижались полидисперсность получаемого пектина, расход этанола и энергозатраты. Предложенный способ может использоваться при получении стандартизированного пектина для фармацевтических целей [4-А, 12-А].
2. Разработана технология выделения кукурузного белка зеина из обезжиренной муки. Рациональным способом оказалась трёхкратная экстракция 75%-м этанолом, обеспечивавшая выход зеина 3,3%. Установлено, что выделенный белок состоит из нескольких фракций и благодаря своим гидрофобным свойствам пригоден для формирования белковой фазы композиционных систем доставки лекарственных средств [1-А, 14-А, 15-А].
3. Разработана технология получения гидрогелевых микросфер на основе композиции пектин–зеин. В исследованных условиях содержание инкапсулированного лекарственного средства достигало 93,8%, а высвобождение пироксикама продолжалось более шести суток. Для сравнения, из традиционной формы около 90% лекарственного средства переходило в раствор в течение первых 24 часов. Полученные результаты подтверждают возможность использования пектин-зеиновой матрицы для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ [1-А, 14-А, 15-А, 16-А, 26-А].
4. Установлено влияние соотношения пектина и зеина, степени этерификации полисахарида и природы сшивающего катиона на свойства микросфер и кинетику высвобождения пироксикама. Увеличение содержания зеина сопровождалось уменьшением степени набухания, а замена ионов Ca^{2+} на Zn^{2+} позволяла получать микросферы с плотной полимерной матрицей. При

использовании ионов цинка содержание пироксикама в микросферах достигало 71,50%. Эти результаты показывают возможность регулирования характеристик системы путём изменения её состава и условий формирования [1-А, 2-А].

5. Исследования in vitro, ex vivo и in vivo показали, что пектин-зеиновые микросферы обеспечивают продолжительное высвобождение пироксикама по сравнению с традиционной формой и создают условия для его доставки в толстый кишечник. После перорального введения пектин-зеиновых микросфер концентрация пироксикама в плазме крови крыс составляла 1,26 мкг/мл через 6 ч, 3,85 мкг/мл через 24 ч и сохранялась на уровне 2,876 мкг/мл через 72 ч. При этом относительная биодоступность пироксикама в составе микросфер была 192,7% по сравнению с традиционной лекарственной формой [5-А, 21-А, 25-А].
6. Установлена выраженная корреляция между результатами высвобождения пироксикама *in vitro*, *ex vivo* и его абсорбцией *in vivo*. Коэффициенты детерминации для IVIVC и EVIVC были 0,97 и 0,99. Полученные зависимости позволяют прогнозировать отдельные фармакокинетические параметры лекарственного средства и подтверждают возможность применения методов IVIVC и EVIVC при оценке новых пектин-зеиновых систем доставки [5-А, 21-А, 25-А].
7. Установлено, что трёхкамерная модель толстой кишки, в отличие от однокамерной, позволяет воспроизводить региональные различия таксономического состава и метаболической активности кишечной микробиоты. Суммарная концентрация короткоцепочечных жирных кислот последовательно увеличивалась от восходящего к нисходящему отделу и составляла 82,35–110,39 ммоль/л против 58,23 ммоль/л в однокамерной модели. Таким образом, трёхкамерная система предпочтительна для изучения региональных особенностей микробиоты и процессов ферментации, а однокамерная модель может использоваться для исследований, не

требующих воспроизведения различий между отделами толстой кишки. [6-А, 18-А].

8. Установлено, что пектины по-разному влияют на состав и метаболическую активность кишечной микробиоты. Низкомолекулярный высокоэтерифицированный пектин повышал содержание масляной кислоты в 1,41 раза, а высокомолекулярный низкоэтерифицированный пектин относительную численность бактерий семейства *Lachnospiraceae* у обоих доноров. Оба образца повышали суммарное содержание КЦЖК в 1,49 и 1,46 раза соответственно. Полученные результаты указывают на необходимость учитывать молекулярную массу и степень этерификации пектина при разработке пребиотических композиций. [7-А, 17-А, 23-А, 24-А].
9. Установлено, что растворимые и нерастворимые фракции полисахаридов изменяют состав кишечной микробиоты и выработку КЦЖК в зависимости от исходного состава микробных сообществ. При введении LGG в систему его численность превышала исходный уровень в 7–540 раз, значимые изменения содержания КЦЖК выявлены в 14 из 324 сравнений (4,3%). Полученные результаты показывают, что влияние пре- и пробиотиков на кишечную микробиоту зависит от исходного состояния микробного сообщества и не всегда сопровождается одновременными изменениями его состава и метаболической активности [8-А, 9-А, 11-А, 19-А].
10. Клинические исследования показали, что включение пектина в терапию кишечных инфекций ускоряет уменьшение основных симптомов заболевания. У пациентов с амёбиазом стул нормализовался к 5-му дню против 7-го дня в контрольной группе. При совместном применении пектина и метронидазола концентрация последнего в плазме крови через 8 ч составляла 13,38 мг/л против 8,26 мг/л в контроле. Продолжительность госпитализации сокращалась на 3,0 ± 1,0 дня. Полученные результаты указывают на возможность повышения эффективности комплексной терапии кишечных инфекций с использованием пектина [10-А, 13-А, 20-А, 22-А].

РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Разработанная методика очистки пектина с использованием тангенциальной диаультрафильтрации может быть использована в области фармации для получения стандартизированного пектина, предназначенного для применения в разработке систем доставки лекарственных средств, в качестве основного и вспомогательного вещества при создании лекарственных форм.
2. Полученные пектин-зеиновые гидрогелевые микросферы могут быть использованы фармацевтическими предприятиями Республики Таджикистан при разработке лекарственных форм с пролонгированным высвобождением и целенаправленной доставкой лекарственных веществ преимущественно в толстый кишечник. Установленные закономерности влияния состава пектин-зеиновой системы и условий её формирования на свойства микросфер могут быть использованы при разработке и совершенствовании технологий получения биополимерных систем доставки лекарственных средств с регулируемой скоростью высвобождения. Применённые в работе физико-химические и инструментальные методы анализа пектина и зеина могут быть использованы в научно-исследовательских, производственных и контрольно-аналитических лабораториях для оценки качества и структурно-функциональных характеристик биополимеров.
3. Результаты фармакокинетических исследований и установленные корреляции между данными *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* могут быть использованы при доклинической оценке и прогнозировании поведения биополимерных систем доставки лекарственных средств в организме.
4. Полученные данные о влиянии пектинов различной структуры, а также пребиотических и пробиотических компонентов на кишечную микробиоту могут быть использованы при разработке функциональных и лекарственных композиций, предназначенных для коррекции микробиоты кишечника.

5. Результаты клинико-экспериментального исследования комбинации “антибиотик–пектин” могут быть использованы в медицинской практике при разработке подходов к комплексной терапии кишечных инфекций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung, Y. K. Recent advances in polymeric drug delivery systems / Y. K. Sung, S. W. Kim // Biomaterials Research 2020 24:1. – 2020. – Vol. 24. – № 1. – P. 1-12.
2. Advances in Oral Drug Delivery / M. S. Alqahtani, M. Kazi, M. A. Alsenaidy, M. Z. Ahmad // Frontiers in Pharmacology. – 2021. – Vol. 12. – P. 618411.
3. Torchilin, V. P. Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example / V. P. Torchilin. – Text : electronic // Drug Delivery / ed. M. Schäfer-Korting. – Berlin, Heidelberg : Springer, 2010. – P. 3-53. – URL: https://doi.org/10.1007/978-3-642-00477-3_1 (date accessed: 25.01.2025).
4. Advances in drug delivery systems, challenges and future directions / T. C. Ezike, U. S. Okpala, U. L. Onoja [et al.] // Heliyon. – 2023. – Vol. 9. – № 6. – P. e17488.
5. Weersma, R. K. Interaction between drugs and the gut microbiome / R. K. Weersma, A. Zhernakova, J. Fu // Gut. – 2020. – Vol. 69. – № 8. – P. 1510-1519.
6. Pectin in diet: Interactions with the human microbiome, role in gut homeostasis, and nutrient-drug interactions / M. S. Elshahed, A. Miron, A. C. Aprotosoaie, M. A. Farag // Carbohydr Polym. – 2021. – Vol. 255. – P. 117388-117388.
7. Wiese, M. The potential of pectin to impact pig nutrition and health: feeding the animal and its microbiome. / M. Wiese // FEMS microbiology letters. – 2019. – Vol. 366. – № 4.
8. Zein as a Pharmaceutical Excipient in Oral Solid Dosage Forms: State of the Art and Future Perspectives / A. Berardi, L. Bisharat, H. S. AlKhatib, M. Cespi // AAPS PharmSciTech. – 2018. – Vol. 19. – № 5. – P. 2009-2022.
9. Labib, G. Overview on zein protein: a promising pharmaceutical excipient in drug delivery systems and tissue engineering / G. Labib // Expert Opinion on Drug Delivery. – 2018. – Vol. 15. – № 1. – P. 65-75.

10. Diaultrafiltration Concentration and Purification of Pectin Polysaccharides [in Russian] / Z. K. Muhidinov, A. C. Dzhonmurodov, R. M. Gorshkova [et al.] // Journals of Higher Educational Institutions. Series: Chemistry and Chemical Technology. – 2011. – Vol. 54. – № 2. – P. 121-125.

11. Концентрирование и очистка пектиновых полисахаридов на полупромышленной диа-ультрафильтрационной установке / А. С. Джонмуродов, Х. И. Тешаев, З. К. Мухидинов [et al.] // Известия Академии Наук Республики Таджикистан Отделение физико-математических, химических, геологических и технических наук. – 2011. – № 142. – P. 67-73.

12. Obtainment and characterisation of pectin from sunflower heads purified by membrane separation techniques / N. Muñoz-Almagro, M. Prodanov, P. J. Wilde [et al.] // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 318. – P. 126476.

13. Pectin/zein beads for potential colon-specific drug delivery: synthesis and in vitro evaluation. / L. S. Liu, M. L. Fishman, K. B. Hicks [et al.] // Drug delivery. – 2006. – Vol. 13. – № 6. – P. 417-23.

14. Pectin-zein Hydrogels for the Delivery of Drugs and Nutrients / Z. K. Muhidinov, Kh. I. Teshaev, G. F. Kasimova [et al.] // Gums and Stabilisers for the Food Industry 16 / ed. P. A. and P. Williams Glyn O. – Cambridge, UK : The Royal Society of Chemistry, 2012. – P. 401-406.

15. Britton, R. A. Probiotics and Gastrointestinal Infections / R. A. Britton, J. Versalovic // Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 2008. – P. 1-10.

16. Modulation of the microbial ecology of the human colon by probiotics, prebiotics and synbiotics to enhance human health: an overview of enabling science and potential applications. / R. A. Rastall, G. R. Gibson, H. S. Gill [et al.] // FEMS microbiology ecology. – 2005. – Vol. 52. – № 2. – P. 145-52.

17. Gibson, G. R. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics / G. R. Gibson, M. B. Roberfroid // The Journal of Nutrition. – 1995. – Vol. 125. – № 6. – P. 1401-1412.

18. Potential of Pectins to Beneficially Modulate the Gut Microbiota Depends on Their Structural Properties / N. Larsen, C. Bussolo de Souza, L. Krych [et al.] // Front Microbiol. – 2019. – Vol. 10. – P. 223-223.
19. The Potential of Pectins to Modulate the Human Gut Microbiota Evaluated by In Vitro Fermentation: A Systematic Review / N. Pascale, F. Gu, N. Larsen [et al.] // Nutrients. – 2022. – Vol. 14. – № 17.
20. A Pectin-Rich, Baobab Fruit Pulp Powder Exerts Prebiotic Potential on the Human Gut Microbiome In Vitro / M. Foltz, A. C. Zahradnik, P. Van den Abbeele [et al.] // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9. – № 9. – P. 1981.
21. Adepu, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions / S. Adepu, S. Ramakrishna // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – № 19. – P. 5905.
22. Wening, K. Oral drug delivery in personalized medicine: Unmet needs and novel approaches / K. Wening, J. Breitkreutz // International Journal of Pharmaceutics. – 2011. – Vol. 404. – № 1. – P. 1-9.
23. Polymeric drug delivery systems by additive manufacturing / S. Borandeh, B. van Bochove, A. Teotia, J. Seppälä // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2021. – Vol. 173. – P. 349-373.
24. Ashford, M. B. Highway to Success—Developing Advanced Polymer Therapeutics / M. B. Ashford, R. M. England, N. Akhtar // Advanced Therapeutics. – 2021. – Vol. 4. – № 5. – P. 2000285.
25. Advances in Oral Drug Delivery Systems: Challenges and Opportunities / J. Lou, H. Duan, Q. Qin [et al.] // Pharmaceutics. – 2023. – Vol. 15. – № 2. – P. 484.
26. Pharmaceutical dosage forms. Tablets / eds. L. L. Augsburger, S. W. Hoag. – 3rd ed. – New York : Informa Healthcare USA, 2008. – 3 p.
27. Hoag, S. W. Chapter 27 - Capsules Dosage Form: Formulation and Manufacturing Considerations / S. W. Hoag. – Text : electronic // Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition) / eds. Y. Qiu [et al.]. – Boston : Academic Press, 2017. – P. 723-747. – URL:

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128024478000273 (date accessed: 24.01.2025).

28. Dash, A. K. Chapter 9 - Solid Dosage Forms / A. K. Dash. – Text : electronic // Pharmaceutics (Second Edition) / eds. A. K. Dash, S. Singh. – Academic Press, 2024. – P. 239-269. – URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978032399796600014X (date accessed: 24.01.2025).

29. Transdermal Drug Delivery Systems (TDDS): Recent Advances and Failure Modes / M. Ghaferi, S. E. Alavi, K. Phan [et al.] // Molecular Pharmaceutics. – 2024. – Vol. 21. – № 11. – P. 5373-5391.

30. Zaid Alkilani, A. Transdermal Drug Delivery: Innovative Pharmaceutical Developments Based on Disruption of the Barrier Properties of the stratum corneum / A. Zaid Alkilani, M. T. C. McCrudden, R. F. Donnelly // Pharmaceutics. – 2015. – Vol. 7. – № 4. – P. 438-470.

31. Harrison, K. Introduction to polymeric drug delivery systems / K. Harrison // Biomedical Polymers. – Elsevier, 2007. – P. 33-56.

32. Rhoads, C. P. Rational Cancer Chemotherapy / C. P. Rhoads // Science. – 1954. – Vol. 119. – № 3081. – P. 77-80.

33. Institute (U.S.), N. C. Modern Concepts in Brain Tumor Therapy: Laboratory and Clinical Investigations / N. C. Institute (U.S.). – U.S. Department of Health and Human Services, Education, and Welfare, Public Health Service, National Institutes of Health, National Cancer Institute, 1977. – 264 p.

34. Wood, D. A. Biodegradable drug delivery systems / D. A. Wood // International Journal of Pharmaceutics. – 1980. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-18.

35. Reduction in doxorubicin toxicity following liposomal delivery / R. A. Sells, I. T. Gilmore, R. R. Owen [et al.] // Cancer Treatment Reviews. – 1987. – Vol. 14. – № 3-4. – P. 383-387.

36. Xiao, Y. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer / Y. Xiao, D. Yu // Pharmacology & therapeutics. – 2021. – Vol. 221. – P. 107753.

37. Lipid Nanoparticles─From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement | ACS Nano. – URL: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.1c04996 (date accessed: 25.01.2025). – Text : electronic.

38. Gil, E. S. Stimuli-reponsive polymers and their bioconjugates / E. S. Gil, S. M. Hudson // Progress in Polymer Science. – 2004. – Vol. 29. – № 12. – P. 1173-1222.

39. Peters, C. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics / C. Peters, S. Brown // Bioscience Reports. – 2015. – Vol. 35. – № 4. – P. e00225.

40. Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review / U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni, W. Khan // Pharmaceutics. – 2017. – Vol. 9. – № 2. – P. 12.

41. Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery / E. Lagreca, V. Onesto, C. Di Natale [et al.] // Progress in Biomaterials. – 2020. – Vol. 9. – P. 153-174.

42. Szczyglewska, P. Nanotechnology–General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles / P. Szczyglewska, A. Feliczak-Guzik, I. Nowak // Molecules. – 2023. – Vol. 28. – № 13. – P. 4932.

43. Rudin, A. Biopolymers / A. Rudin, P. Choi // The Elements of Polymer Science & Engineering. – 2013. – P. 521-535.

44. Agarwal, P. Injectable implants for the sustained release of protein and peptide drugs / P. Agarwal, I. D. Rupenthal // Drug Discovery Today. – 2013. – Vol. 18. – № 7-8. – P. 337-349.

45. Piroxicam ex vivo release kinetics from zein/pectin delivery systems / D. T. Bobokalonov, Z. K. Mukhidinov, I. F. Rakhimov [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2012. – Vol. 46. – № 6. – P. 378-380.

46. Kinetics of piroxicam release from low-methylated pectin/zein hydrogel microspheres / J. T. Bobokalonov, G. F. Kasimova, Z. K. Muhidinov [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2012. – Vol. 46. – № 1. – P. 50-53.

47. Delivery System from biodegradable polymers for encapsulation of poor water soluble drugs / Z. K. B. Muhidinov J., Kh. Teshaev, Z. K. B. Muhidinov J. [et al.] // 4th International Workshop on Specialty Polymers. – 2011. – P. 65-65.

48. A kinetic study of poorly water soluble drug released from pectin microcapsules using diffusion/dissolution model / Z. Muhidinov, J. S. Bobokalonov, L. S. Liu, R. Fassihi // ACS Symposium Series. – 2008. – Vol. 992. – P. 193-208.

49. Evaluation of Extended-release of Piroxicam-loaded Pectin-zein Hydrogel Microspheres: In vitro, Ex vivo, and In vivo Studies / J. Bobokalonov, Z. Muhidinov, A. Nasriddinov [et al.] // Current Drug Delivery. – 2022. – Vol. 19. – № 10. – P. 1093-1101.

50. Carpita, N. C. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. / N. C. Carpita, D. M. Gibeaut // The Plant journal : for cell and molecular biology. – 1993. – Vol. 3. – № 1. – P. 1-30.

51. Different populations of pectic hairy regions occur in apple cell walls. / H. A. Schols, E. Vierhuis, E. J. Bakx, A. G. Voragen // Carbohydrate research. – 1995. – Vol. 275. – № 2. – P. 343-60.

52. Ridley, B. L. Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling / B. L. Ridley, M. A. O'Neill, D. Mohnen // Phytochemistry. – 2001. – Vol. 57. – № 6. – P. 929-967.

53. Vincken, J.-P. If Homogalacturonan Were a Side Chain of Rhamnogalacturonan I. Implications for Cell Wall Architecture / J.-P. Vincken // PLANT PHYSIOLOGY. – 2003. – Vol. 132. – № 4. – P. 1781-1789.

54. STRUCTURE OF A PECTIN HOMOGALACTURONAN / Z. K. Mukhiddinov, D. Khalikov, E. E. Grigor, V. P. Panov // Translated from Khimiya Prirodnykh Soedeninii. – 1993. – № 1. – P. 77-80.

55. Isolation and structural characterization of a pectin homo and ramnogalacturonan / Z. K. Mukhiddinov, D. Khalikov, F. T. Abdusamiev, C. C. Avloev // Talanta. – 2000. – Vol. 53. – № 1. – P. 171-176.

56. BeMiller, J. N. An Introduction to Pectins: Structure and Properties / J. N. BeMiller. – 1986. – P. 2-12.

57. Redgwell, R. J. Structural features of cell-wall polysaccharides of onion Allium cepa / R. J. Redgwell, R. R. Selvendran // Carbohydrate Research. – 1986. – Vol. 157. – P. 183-199.

58. In muro fragmentation of the rhamnogalacturonan I backbone in potato (Solanum tuberosum L.) results in a reduction and altered location of the galactan and arabinan side-chains and abnormal periderm development / R. J. F. J. Oomen, C. H. L. Doeswijk-Voragen, M. S. Bush [et al.] // The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology. – 2002. – Vol. 30. – № 4. – P. 403-413.

59. Yapo, B. M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model / B. M. Yapo // Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 86. – № 2. – P. 373-385.

60. Pectins from the albedo of immature lemon fruitlets have high water binding capacity / R. Schröder, C. J. Clark, K. Sharrock [et al.] // Journal of Plant Physiology. – 2004. – Vol. 161. – № 4. – P. 371-379.

61. Mualikrishna, G. Characterization of pectic polysaccharides from pulse husks / G. Mualikrishna, R. N. Tharanathan // Food Chemistry. – 1994. – Vol. 50. – № 1. – P. 87-89.

62. Parre, E. Pectin and the role of the physical properties of the cell wall in pollen tube growth of Solanum chacoense / E. Parre, A. Geitmann // Planta. – 2005. – Vol. 220. – № 4. – P. 582-592.

63. Liu, L. Pectin in controlled drug delivery – a review / L. Liu, M. L. Fishman, K. B. Hicks // Cellulose. – 2006. – Vol. 14. – № 1. – P. 15-24.

64. Бобокалонов, Д. Т. Фармакокинетика новых лекарственных форм пироксикама / Д. Т. Бобокалонов. – 2011. – P. 100-100.

65. Пектин-зеиновые микросферы как носители лекарственных средств / З. К. Мухидинов, Г. Ф. Касымова, Д. Т. Бобокалонов [et al.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2010. – Vol. 44. – № 10. – P. 20-24.

66. Кинетика высвобождения пироксикама из гидрогелей на основе низкометилированного цитрусового пектина и зеина / Д. Т. Бобокалонов, Г. Ф. Касымова, З. К. Мухидинов [et al.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Vol. 46. – № 1. – P. 34-37.

67. Кинетика выхода пироксикама из зеин-пектиновых носителей в опытах ex vivo / Д. Т. Бобокалонов, З. К. Мухидинов, И. Ф. Рахимов [et al.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Vol. 46. – № 6. – P. 98-101.

68. Morris, G. A. The effect of the degree of esterification on the hydrodynamic properties of citrus pectin / G. A. Morris, T. J. Foster, S. E. Harding // Food Hydrocolloids. – 2000. – Vol. 14. – № 3. – P. 227-235.

69. Effect of degree of esterification of pectin and calcium amount on drug release from pectin-based matrix tablets / S. Sungthongjeen, P. Sriamornsak, T. Pitaksuteepong [et al.] // AAPS PharmSciTech. – 2004. – Vol. 5. – № 1. – P. 50.

70. Kim, H. A new ternary polymeric matrix system for controlled drug delivery of highly soluble drugs: I. Diltiazem hydrochloride / H. Kim, R. Fassihi // Pharmaceutical Research. – 1997. – Vol. 14. – № 10. – P. 1415-1421.

71. Sriamornsak, P. Calcium pectinate gel beads for controlled release drug delivery: II. Effect of formulation and processing variables on drug release. / P. Sriamornsak, J. Nunthanid // Journal of microencapsulation. – Vol. 16. – № 3. – P. 303-13.

72. Aydin, Z. Preparation and evaluation of pectin beads / Z. Aydin, J. Akbugˇa // International Journal of Pharmaceutics. – 1996. – Vol. 137. – № 1. – P. 133-136.

73. Liu, P. Alginate-pectin-poly-L-lysine particulate as a potential controlled release formulation. / P. Liu, T. R. Krishnan // The Journal of pharmacy and pharmacology. – 1999. – Vol. 51. – № 2. – P. 141-9.

74. Leaching of pectin from mixed pectin/insoluble polymer films intended for colonic drug delivery / R. Semdé, K. Amighi, D. Pierre [et al.] // International Journal of Pharmaceutics. – 1998. – Vol. 174. – № 1-2. – P. 233-241.

75. Krögel, I. Evaluation of an enzyme-containing capsular shaped pulsatile drug delivery system. / I. Krögel, R. Bodmeier // Pharmaceutical research. – 1999. – Vol. 16. – № 9. – P. 1424-9.

76. A novel plug-controlled colon-specific pulsatile capsule with tablet of curcumin-loaded SMEDDS. / Y. Huang, R. Tian, W. Hu [et al.] // Carbohydrate polymers. – 2013. – Vol. 92. – № 2. – P. 2218-23.

77. Drug delivery and tissue engineering applications of biocompatible pectin-chitin/nano CaCO3 composite scaffolds. / P. T. S. Kumar, C. Ramya, R. Jayakumar [et al.] // Colloids and surfaces. B, Biointerfaces. – 2013. – Vol. 106. – P. 109-16.

78. Preparation and chemical and biological characterization of a pectin/chitosan polyelectrolyte complex scaffold for possible bone tissue engineering applications. / P. Coimbra, P. Ferreira, H. C. de Sousa [et al.] // International journal of biological macromolecules. – 2011. – Vol. 48. – № 1. – P. 112-8.

79. Микрокапсулы на основе цитрусовых пектинов и лактоглобулина молочной сыворотки / З. К. Мухидинов, С. Р. Усманова, З. Б. Шарифова [et al.] // Известия АН РТ. – 2010. – Vol. 2. – № 139. – P. 68-73.

80. Получение микрокапсул на основе яблочного пектина и β-лактоглобулина, содержащих рифампицин / З. К. Мухидинов, Г. Ф. Касымова, С. Р. Усманова [et al.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Vol. 46. – № 5. – P. 70-73.

81. Production of rifampicin-containing microcapsules based on apple pectin complexes with β-lactoglobulin / Z. K. Mukhidinov, G. F. Kasymova, S. R. Usmanova [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2012. – Vol. 46. – № 5. – P. 306-309.

82. Выделение и характеристика зеинов кукурузы, произрастающей в Таджикистане / Г. Ф. Касымова, Д. Т. Бобокалонов, М. Д. Халикова [et al.] // Изв. АН РТ. отд. физ-мат, хим. и геол. наук. – 2007. – Vol. 2. – № 127. – P. 42-50.

83. Zein Particle-Stabilized Water-In-Water Emulsion as a Vehicle for Hydrophilic Bioactive Compound Loading of Riboflavin / J. F. Chen, J. Guo, S. H. Liu [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2019. – Vol. 67. – № 35. – P. 9926-9933.

84. Brody, H. The gut microbiome / H. Brody, R. Hodson, J. Rooke // Nature. – 2020. – Vol. 577. – № 7792. – P. S5-S5.

85. Bocci, V. The neglected organ: bacterial flora has a crucial immunostimulatory role. / V. Bocci // Perspectives in biology and medicine. – 1992. – Vol. 35. – № 2. – P. 251-60.

86. Host-bacterial mutualism in the human intestine. / F. Bäckhed, R. E. Ley, J. L. Sonnenburg [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2005. – Vol. 307. – № 5717. – P. 1915-20.

87. Cummings, J. H. Microbial digestion of complex carbohydrates in man. / J. H. Cummings // The Proceedings of the Nutrition Society. – 1984. – Vol. 43. – № 1. – P. 35-44.

88. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. / D. Kelly, J. I. Campbell, T. P. King [et al.] // Nature immunology. – 2004. – Vol. 5. – № 1. – P. 104-12.

89. Hooper, L. V. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. / L. V Hooper, T. Midtvedt, J. I. Gordon // Annual review of nutrition. – 2002. – Vol. 22. – P. 283-307.

90. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? / N. Ottman, H. Smidt, W. M. de Vos, C. Belzer // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2012. – Vol. 2. – № August. – P. 104.

91. Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes / N. Segata, L. Waldron, A. Ballarini [et al.] // Nature Methods. – 2012. – Vol. 9. – № 8. – P. 811-814.

92. Next-Generation Metagenomics: Methodological Challenges and Opportunities / I. Laudadio, V. Fulci, L. Stronati, C. Carissimi // OMICS: A Journal of Integrative Biology. – 2019. – Vol. 23. – № 7. – P. 327-333.

93. A new genomic blueprint of the human gut microbiota / A. Almeida, A. L. Mitchell, M. Boland [et al.] // Nature. – 2019. – Vol. 568. – № 7753. – P. 499-504.

94. The gut microbiota and host health: A new clinical frontier / J. R. Marchesi, D. H. Adams, F. Fava [et al.] // Gut. – 2016. – Vol. 65. – № 2. – P. 330-339.

95. The NIH Human Microbiome Project / J. Peterson, S. Garges, M. Giovanni [et al.] // Genome Research. – 2009. – Vol. 19. – № 12. – P. 2317-2323.

96. Advancing functional and translational microbiome research using meta-omics approaches / X. Zhang, L. Li, J. Butcher [et al.] // Microbiome. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-12.

97. Roeselers, G. The human gut microbiome, diet, and health: “Post hoc non ergo propter hoc” / G. Roeselers, J. Bouwman, E. Levin // Trends in Food Science and Technology. – 2016. – Vol. 57. – P. 302-305.
98. A metagenomic insight into our gut’s microbiome / P. Lepage, M. C. Leclerc, M. Joossens [et al.] // Gut. – 2013. – Vol. 62. – № 1. – P. 146-158.
99. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. / J. E. Koenig, A. Spor, N. Scalfone [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Vol. 108 Suppl. – P. 4578-85.
100. The early settlers: intestinal microbiology in early life. / P. A. M. J. Scholtens, R. Oozeer, R. Martin [et al.] // Annual review of food science and technology. – 2012. – Vol. 3. – P. 425-47.
101. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. / M. Ventura, C. Canchaya, A. Tauch [et al.] // Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. – 2007. – Vol. 71. – № 3. – P. 495-548.
102. The genome of Akkermansia muciniphila, a dedicated intestinal mucin degrader, and its use in exploring intestinal metagenomes. / M. W. J. van Passel, R. Kant, E. G. Zoetendal [et al.] // PloS one. – 2011. – Vol. 6. – № 3. – P. e16876.
103. Phylogenetic analysis of dysbiosis in ulcerative colitis during remission. / M. Rajilić-Stojanović, F. Shanahan, F. Guarner, W. M. de Vos // Inflammatory bowel diseases. – 2013. – Vol. 19. – № 3. – P. 481-8.
104. Eloe-Fadrosh, E. A. The human microbiome: from symbiosis to pathogenesis. / E. A. Eloe-Fadrosh, D. A. Rasko // Annual review of medicine. – 2013. – Vol. 64. – P. 145-63.
105. Foxman, B. Why the human microbiome project should motivate epidemiologists to learn ecology. / B. Foxman, D. Goldberg // Epidemiology (Cambridge, Mass.). – 2010. – Vol. 21. – № 6. – P. 757-9.
106. The Human Microbiota in Health and Disease / B. Wang, M. Yao, L. Lv [et al.] // Engineering. – 2017. – Vol. 3. – № 1. – P. 71-82.

107. Bull, M. J. Part 1: The Human Gut Microbiome in Health and Disease. / M. J. Bull, N. T. Plummer // Integrative medicine (Encinitas, Calif.). – 2014. – Vol. 13. – № 6. – P. 17-22.

108. Metchnikoff, E. The prolongation of Life / E. Metchnikoff. – London : William Heinemann, 1907. – 343 p.

109. Garrett, W. S. Homeostasis and Inflammation in the Intestine / W. S. Garrett, J. I. Gordon, L. H. Glimcher // Cell. – 2010. – Vol. 140. – № 6. – P. 859-870.

110. Translating the human microbiome / J. Brown, W. M. De Vos, P. S. Distefano [et al.] // Nature Biotechnology. – 2013. – Vol. 31. – № 4. – P. 304-308.

111. Broderick, N. A. A common origin for immunity and digestion / N. A. Broderick // Frontiers in Immunology. – 2015. – Vol. 6. – № FEB. – P. 1-3.

112. The role of the gut microbiota in nutrition and health. / H. J. Flint, K. P. Scott, P. Louis, S. H. Duncan // Nature reviews. Gastroenterology & hepatology. – 2012. – Vol. 9. – № 10. – P. 577-89.

113. Host-Gut Microbiota Metabolic Interactions / J. K. Nicholson, E. Holmes, J. Kinross [et al.] // Science. – 2012. – Vol. 336. – № 6086. – P. 1262-1267.

114. A core gut microbiome between lean and obesity twins / P. J. Turnbaugh, M. Hamady, T. Yatsunenko [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 457. – № 7228. – P. 480-484.

115. The effect of diet on the human gut microbiome: A metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice / P. J. Turnbaugh, V. K. Ridaura, J. J. Faith [et al.] // Science Translational Medicine. – 2009. – Vol. 1. – № 6. – P. 1-12.

116. Cani, P. D. Gut microbiota and obesity: causally linked? / P. D. Cani, M. Van Hul // Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. – 2020. – Vol. 14. – № 6. – P. 401-403.

117. Kiberstis, P. A. Gut microbes and obesity / P. A. Kiberstis // Science. – 2020. – Vol. 368. – № 6488. – P. 279.3-280.

118. Knights, D. Advances in inflammatory bowel disease pathogenesis: linking host genetics and the microbiome / D. Knights, K. G. Lassen, R. J. Xavier // Gut. – 2013. – Vol. 62. – № 10. – P. 1505-1510.

119. Huttenhower, C. Inflammatory Bowel Disease as a Model for Translating the Microbiome / C. Huttenhower, A. D. Kostic, R. J. Xavier // Immunity. – 2014. – Vol. 40. – № 6. – P. 843-854.

120. Kostic, A. D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead / A. D. Kostic, R. J. Xavier, D. Gevers // Gastroenterology. – 2014. – Vol. 146. – № 6. – P. 1489-1499.

121. Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease / J. M. Norman, S. A. Handley, M. T. Baldridge [et al.] // Cell. – 2015. – Vol. 160. – № 3. – P. 447-460.

122. Glassner, K. L. The microbiome and inflammatory bowel disease / K. L. Glassner, B. P. Abraham, E. M. M. Quigley // Journal of Allergy and Clinical Immunology. – 2020. – Vol. 145. – № 1. – P. 16-27.

123. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes / J. Qin, Y. Li, Z. Cai [et al.] // Nature. – 2012. – Vol. 490. – № 7418. – P. 55-60.

124. Insights Into the Role of the Microbiome in Obesity and Type 2 Diabetes / A. V. Hartstra, K. E. C. Bouter, F. Bäckhed, M. Nieuwdorp // Diabetes Care. – 2015. – Vol. 38. – № 1. – P. 159-165.

125. Role of gut microbiota in type 2 diabetes pathophysiology / M. Gurung, Z. Li, H. You [et al.] // EBioMedicine. – 2020. – Vol. 51. – P. 102590.

126. Implication of the gut microbiome composition of type 2 diabetic patients from northern China / Q. Li, Y. Chang, K. Zhang [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 5450.

127. Fatty Liver Disease and Gut Microbiota: A Comprehensive Update / L. Campo, S. Eiseler, T. Apfel, N. Pyrsopoulos // Journal of Clinical and Translational Hepatology. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 1-5.

128. Prediction of advanced fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease using gut microbiota-based approaches compared with simple non-invasive tools / S. Lang, F. Farowski, A. Martin [et al.] // Scientific Reports. – 2020. – Vol. 10. – № 1. – P. 9385.

129. The Gut Microbiota and Respiratory Diseases: New Evidence / L. Chunxi, L. Haiyue, L. Yanxia [et al.] // Journal of Immunology Research. – 2020. – Vol. 2020. – P. 1-12.

130. The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases / D. Zhang, S. Li, N. Wang [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11.

131. Anand, S. Diet, Microbiota and Gut-Lung Connection / S. Anand, S. S. Mande // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9.

132. Witkowski, M. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease / M. Witkowski, T. L. Weeks, S. L. Hazen // Circulation Research. – 2020. – Vol. 127. – № 4. – P. 553-570.

133. The intestinal microbiota and cardiovascular disease / T. Katsimichas, A. S. Antonopoulos, A. Katsimichas [et al.] // Cardiovascular Research. – 2019. – Vol. 115. – № 10. – P. 1471-1486.

134. Tun, H. M. Role of Gut Microbiota in Cardiovascular Disease that Links to Host Genotype and Diet / H. M. Tun, F. C. Leung, K. M. Cheng // The Gut Microbiome - Implications for Human Disease. – InTech, 2016.

135. The role of intestinal microbiota in cardiovascular disease. / M. Jin, Z. Qian, J. Yin [et al.] // Journal of Cellular and Molecular Medicine. – 2019. – Vol. 23. – № 4. – P. 2343-2350.

136. Gut Microbiome Toxicity: Connecting the Environment and Gut Microbiome-Associated Diseases / P. Tu, L. Chi, W. Bodnar [et al.] // Toxics. – 2020. – Vol. 8. – № 1. – P. 19.

137. Durack, J. The gut microbiome: Relationships with disease and opportunities for therapy / J. Durack, S. V. Lynch // Journal of Experimental Medicine. – 2019. – Vol. 216. – № 1. – P. 20-40.

138. Shreiner, A. B. The gut microbiome in health and in disease. / A. B. Shreiner, J. Y. Kao, V. B. Young // Current opinion in gastroenterology. – 2015. – Vol. 31. – № 1. – P. 69-75.

139. Revisit gut microbiota and its impact on human health and disease / R. Ding, W.-R. Goh, R. Wu [et al.] // Journal of Food and Drug Analysis. – 2019. – Vol. 27. – № 3. – P. 623-631.
140. Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics / J. Jovel, J. Patterson, W. Wang [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – № APR. – P. 1-17.
141. Staden, R. A strategy of DNA sequencing employing computer programs. / R. Staden // Nucleic acids research. – 1979. – Vol. 6. – № 7. – P. 2601-10.
142. Janda, J. M. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: Pluses, perils, and pitfalls / J. M. Janda, S. L. Abbott // Journal of Clinical Microbiology. – 2007. – Vol. 45. – № 9. – P. 2761-2764.
143. Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. / F. Sanger, A. R. Coulson, G. F. Hong [et al.] // Journal of molecular biology. – 1982. – Vol. 162. – № 4. – P. 729-773.
144. Voelkerding, K. V. Next-generation sequencing:from basic research to diagnostics / K. V. Voelkerding, S. A. Dames, J. D. Durtschi // Clinical Chemistry. – 2009. – Vol. 55. – № 4. – P. 641-658.
145. Metzker, M. L. Sequencing technologies - the next generation. / M. L. Metzker // Nature reviews. Genetics. – 2010. – Vol. 11. – № 1. – P. 31-46.
146. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis / C. Quince, A. W. Walker, J. T. Simpson [et al.] // Nature Biotechnology. – 2017. – Vol. 35. – № 9. – P. 833-844.
147. Bioinformatics for the Human Microbiome Project / D. Gevers, M. Pop, P. D. Schloss, C. Huttenhower // PLoS Computational Biology. – 2012. – Vol. 8. – № 11.
148. Overview of gut flora and probiotics. / W. H. Holzapfel, P. Haberer, J. Snel [et al.] // International journal of food microbiology. – 1998. – Vol. 41. – № 2. – P. 85-101.
149. Hao, W.-L. Microflora of the gastrointestinal tract: a review. / W.-L. Hao, Y.-K. Lee // Methods in molecular biology (Clifton, N.J.). – 2004. – Vol. 268. – P. 491-502.
150. Fernández-García, E. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency / E. Fernández-García, I. Carvajal-Lérida, A. Pérez-Gálvez // Nutrition Research. – 2009. – Vol. 29. – № 11. – P. 751-760.

151. Wickham, M. In vitro digestion methods for assessing the effect of food structure on allergen breakdown / M. Wickham, R. Faulks, C. Mills // Molecular Nutrition and Food Research. – 2009. – Vol. 53. – № 8. – P. 952-958.

152. Fernández-García, E. In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency / E. Fernández-García, I. Carvajal-Lérida, A. Pérez-Gálvez // Nutrition Research. – 2009. – Vol. 29. – № 11. – P. 751-760.

153. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion / A. Guerra, L. Etienne-Mesmin, V. Livrelli [et al.] // Trends in Biotechnology. – 2012. – Vol. 30. – № 11. – P. 591-600.

154. Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome / S. R. Gill, M. Pop, R. T. DeBoy [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2006. – Vol. 312. – № 5778. – P. 1355-1359.

155. Dethlefsen, L. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease / L. Dethlefsen, M. McFall-Ngai, D. A. Relman // Nature. – 2007. – Vol. 449. – № 7164. – P. 811-818.

156. Venema, K. Experimental models of the gut microbiome / K. Venema, P. van den Abbeele // Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology. – 2013. – Vol. 27. – № 1. – P. 115-126.

157. The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®) / T. Van de Wiele, P. Van den Abbeele, W. Ossieur [et al.]. – Text : electronic // The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models / eds. K. Verhoeckx [et al.]. – Cham (CH) : Springer, 2015. – URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500150/ (date accessed: 01.02.2025).

158. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products / M. Minekus, M. Smeets-Peeters, A. Bernalier [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 1999. – Vol. 53. – № 1. – P. 108-114.

159. Application of the dynamic gastrointestinal simulator (simgi®) to assess the impact of probiotic supplementation in the metabolism of grape polyphenols / I. Gil-

Sánchez, C. Cueva, A. Tamargo [et al.] // Food Research International. – 2020. – Vol. 129. – P. 108790.

160. Culturing the human microbiota and culturomics / J.-C. Lagier, G. Dubourg, M. Million [et al.] // Nature Reviews Microbiology. – 2018. – Vol. 16. – № 9. – P. 540-550.

161. Role of the gut microbiota in nutrition and health / A. M. Valdes, J. Walter, E. Segal, T. D. Spector // BMJ. – 2018. – P. k2179.

162. The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism / P. Spanogiannopoulos, E. N. Bess, R. N. Carmody, P. J. Turnbaugh // Nature Reviews Microbiology. – 2016. – Vol. 14. – № 5. – P. 273-287.

163. Wilson, I. D. The role of gut microbiota in drug response / I. D. Wilson, J. K. Nicholson // Current Pharmaceutical Design. – 2009. – Vol. 15. – № 13. – P. 1519-1523.

164. The role of gut microbial beta-glucuronidases (gmGUS) in drug disposition and development / S. Gao, R. Sun, R. Singh [et al.] // Drug discovery today. – 2022. – Vol. 27. – № 10. – P. 103316.

165. The influence of the gut microbiota on the bioavailability of oral drugs / X. Zhang, Y. Han, W. Huang [et al.] // Acta Pharmaceutica Sinica. B. – 2021. – Vol. 11. – № 7. – P. 1789-1812.

166. Li, H. The influence of gut microbiota on drug metabolism and toxicity / H. Li, J. He, W. Jia // Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2016. – Vol. 12. – № 1. – P. 31-40.

167. The Impact of the Gut Microbiota on Drug Metabolism and Clinical Outcome / E. F. Enright, C. G. M. Gahan, S. A. Joyce, B. T. Griffin // The Yale Journal of Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 89. – № 3. – P. 375-382.

168. Koppel, N. Chemical transformation of xenobiotics by the human gut microbiota / N. Koppel, V. Maini Rekdal, E. P. Balskus // Science. – 2017. – Vol. 356. – № 6344. – P. eaag2770.

169. Haiser, H. J. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism / H. J. Haiser, P. J. Turnbaugh // Pharmacological Research. – 2013. – Vol. 69. – № 1. – P. 21-31.

170. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium Eggerthella lenta / H. J. Haiser, D. B. Gootenberg, K. Chatman [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2013. – Vol. 341. – № 6143. – P. 295-298.

171. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors / B. Routy, E. Le Chatelier, L. Derosa [et al.] // Science (New York, N.Y.). – 2018. – Vol. 359. – № 6371. – P. 91-97.

172. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota / K. Forslund, F. Hildebrand, T. Nielsen [et al.] // Nature. – 2015. – Vol. 528. – № 7581. – P. 262-266.

173. A new approach to the treatment of acute infection diseases with antibiotic-pectin formulae / Z. K. Muhidinov, J. T. Bobokalonov, R. S. Kimatov [et al.] // Journal of Infection in Developing Countries. – 2024. – Vol. 18. – № 3. – P. 407-419.

174. Mohnen, D. Pectin structure and biosynthesis : Physiology and Metabolism - Edited by Markus Pauly and Kenneth Keegstra / D. Mohnen // Current Opinion in Plant Biology. – 2008. – Vol. 11. – № 3. – P. 266-277.

175. Pectin recovery and characterization from lemon juice waste streams / M. Dimopoulou, K. Alba, G. Campbell, V. Kontogiorgos // J Sci Food Agric. – 2019. – Vol. 99. – № 14. – P. 6191-6198.

176. Structure and functionality of Rhamnogalacturonan I in the cell wall and in solution: A review / A. Kaczmarska, P. M. Pieczywek, J. Cybulska, A. Zdunek // Carbohydrate polymers. – 2022. – Vol. 278.

177. Lee, H. B. Pectic polysaccharides: Targeting gut microbiota in obesity and intestinal health / H. B. Lee, Y. S. Kim, H. Y. Park // Carbohydr Polym. – 2022. – Vol. 287. – P. 119363-119363.

178. Adak, A. An insight into gut microbiota and its functionalities / A. Adak, M. R. Khan // Cell Mol Life Sci. – 2019. – Vol. 76. – № 3. – P. 473-493.

179. Dietary pectic glycans are degraded by coordinated enzyme pathways in human colonic Bacteroides / A. S. Luis, J. Briggs, X. Zhang [et al.] // Nat Microbiol. – 2018. – Vol. 3. – № 2. – P. 210-219.

180. Challenges of pectic polysaccharides as a prebiotic from the perspective of fermentation characteristics and anti-colitis activity / Y. Chengxiao, W. Dongmei, Z. Kai [et al.] // Carbohydr Polym. – 2021. – Vol. 270. – P. 118377-118377.

181. The Dietary Fiber Pectin: Health Benefits and Potential for the Treatment of Allergies by Modulation of Gut Microbiota / F. Blanco-Perez, H. Steigerwald, S. Schulke [et al.] // Curr Allergy Asthma Rep. – 2021. – Vol. 21. – № 10. – P. 43-43.

182. Dietary fiber intake, the gut microbiome, and chronic systemic inflammation in a cohort of adult men / W. Ma, L. H. Nguyen, M. Song [et al.] // Genome Med. – 2021. – Vol. 13. – № 1. – P. 102-102.

183. Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon / W. S. F. Chung, M. Meijerink, B. Zeuner [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. – 2017. – Vol. 93. – № 11.

184. Pectin and homogalacturonan with small molecular mass modulate microbial community and generate high SCFAs via in vitro gut fermentation / Y. Zhao, J. Bi, J. Yi [et al.] // Carbohydr Polym. – 2021. – Vol. 269. – P. 118326-118326.

185. In vitro fermentation properties of pectins and enzymatic-modified pectins obtained from different renewable bioresources / A. Ferreira-Lazarte, V. Kachrimanidou, M. Villamiel [et al.] // Carbohydrate Polymers. – 2018. – Vol. 199. – P. 482-491.

186. Tingirikari, J. M. R. Microbiota-accessible pectic poly- and oligosaccharides in gut health / J. M. R. Tingirikari // Food Funct. – 2018. – Vol. 9. – № 10. – P. 5059-5073.

187. Establishing a mucosal gut microbial community in vitro using an artificial simulator / L. S. Liu, J. Firrman, C. Tanes [et al.] // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13. – № 7. – P. 1-20.

188. The impact of environmental pH on the gut microbiota community structure and short chain fatty acid production / J. Firrman, L. Liu, K. Mahalak [et al.] // FEMS Microbiol Ecol. – 2022. – Vol. 98. – № 5.

189. Higuchi, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices / T. Higuchi // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 1963. – Vol. 52. – № 12. – P. 1145-1149.

190. Lao, L. L. Modeling of drug release from biodegradable polymer blends / L. L. Lao, S. S. Venkatraman, N. A. Peppas // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2008. – Vol. 70. – № 3. – P. 796-803.

191. Siepmann, J. Mathematical modeling of drug delivery / J. Siepmann, F. Siepmann // International Journal of Pharmaceutics. – 2008. – Vol. 364. – № 2. – P. 328-343.

192. Towards More Realistic In Vitro Release Measurement Techniques for Biodegradable Microparticles / D. Klose, N. Azaroual, F. Siepmann [et al.] // Pharmaceutical Research. – 2009. – Vol. 26. – № 3. – P. 691-699.

193. FDA guidance for industry extended release solid oral dosage forms: Development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations / H. Malinowski, P. Marroum, V. R. Uppoor [et al.] // Dissolution Technologies. – 1997. – Vol. 4. – № 4. – P. 23-32.

194. Diets with and without edible cricket support a similar level of diversity in the gut microbiome of dogs / J. K. Jarett, A. Carlson, M. Rossoni Serao [et al.] // PeerJ. – 2019. – Vol. 2019. – № 9. – P. 1-22.

195. USP 35–NF 30. General Information / 1088 In Vitro and In Vivo Evaluation. – 2012. – 5663 p.

196. In Vitro – In Vivo Correlations of Carbamazepine Nanodispersions for Application in Formulation Development / Z. Warnken, M. Puppolo, J. Hughey [et al.] // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2018. – Vol. 107. – № 1. – P. 453-465.

197. Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis / V. Aguiar-Pulido, W. Huang, V. Suarez-Ulloa [et al.] // Evolutionary Bioinformatics Online. – 2016. – Vol. 12. – № Suppl 1. – P. 5-16.

198. Microbiome at the Frontier of Personalized Medicine / P. C. Kashyap, N. Chia, H. Nelson [et al.] // Mayo Clinic proceedings. – 2017. – Vol. 92. – № 12. – P. 1855-1864.

199. Physico-Chemical Characterization of Pectic Polysaccharides from Various Sources Obtained by Steam Assisted Flash Extraction (SAFE) / Z. Muhidinov, K. Teshaev, A. Jonmurodov [et al.] // Macromolecular Symposia. – 2012. – Vols. 317-318. – № 1. – P. 142-148.

200. Muhidinov, Z. K. Method for purification of pectin hydrolizate solution and pectin gel production / Z. K. Muhidinov. – Tajikistan : Tajik National Patent Center, 1998.

201. Filisetti-Cozzi, T. M. C. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. / T. M. C. C. Filisetti-Cozzi, N. C. Carpita // Analytical biochemistry. – 1991. – Vol. 197. – № 1. – P. 157-162.

202. CPKelco. Control methods. Determination of pectins degree of esterification / CPKelco. – 2001.

203. Effect of temperature on the intrinsic viscosity and conformation of different pectins / Z. K. Muhidinov, M. L. Fishman, Kh. Kh. Avloev [et al.] // Polymer Science Series A. – 2011. – Vol. 52. – № 12. – P. 1257-1263.

204. Solvent effects on the molecular properties of pectins. / M. L. Fishman, H. K. Chau, F. Kolpak, J. Brady // Journal of agricultural and food chemistry. – 2001. – Vol. 49. – № 9. – P. 4494-4501.

205. Qi, P. X. Molecular characterization of interacting complexes and conjugates induced by the dry-state heating of β-lactoglobulin and sugar beet pectin / P. X. Qi, H. K. Chau, A. T. Hotchkiss // Food Hydrocolloids. – 2019. – Vol. 91. – P. 10-18.

206. Comparative analysis of the gut microbiota cultured in vitro using a single colon versus a 3-stage colon experimental design / J. Firrman, L. Liu, K. Mahalak [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Vol. 105. – № 8. – P. 3353-3367.

207. Applying Advanced In Vitro Culturing Technology to Study the Human Gut Microbiota / J. Firrman, L. S. Liu, P. Van den Abbeele [et al.] // Journal of visualized experiments : JoVE. – 2019. – № 144. – P. 1-12.

208. Metabolic analysis of regionally distinct gut microbial communities using an in vitro platform / J. Firrman, L. Liu, C. Tanes [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2019.
209. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR / T. Rinttila, A. Kassinen, E. Malinen [et al.] // J Appl Microbiol. – 2004. – Vol. 97. – № 6. – P. 1166-1177.
210. Analysis of the Ability of Capsaicin to Modulate the Human Gut Microbiota In Vitro / K. K. Mahalak, J. Bobokalonov, J. Firrman [et al.] // Nutrients. – 2022. – Vol. 14. – № 6.
211. Dhaliwal, A. DNA Extraction and Purification / A. Dhaliwal // Materials and Methods. – 2013. – Vol. 3. – P. 191.
212. Qiagen. DNeasy PowerSoil Kit.
213. Sampling and pyrosequencing methods for characterizing bacterial communities in the human gut using 16S sequence tags / G. D. Wu, J. D. Lewis, C. Hoffmann [et al.] // BMC Microbiology. – 2010. – Vol. 10. – № 1. – P. 206.
214. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data / B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen [et al.] // Nature Methods. – 2016. – Vol. 13. – № 7. – P. 581-583.
215. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea / D. McDonald, M. N. Price, J. Goodrich [et al.] // The ISME Journal. – 2012. – Vol. 6. – № 3. – P. 610-618.
216. Katoh, K. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability / K. Katoh, D. M. Standley // Molecular Biology and Evolution. – 2013. – Vol. 30. – № 4. – P. 772-780.
217. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST / R. C. Edgar // Bioinformatics. – 2010. – Vol. 26. – № 19. – P. 2460-2461.
218. Shamsara, O. Development of double layered emulsion droplets with pectin/β-lactoglobulin complex for bioactive delivery purposes / O. Shamsara, S. M. Jafari, Z. K. Muhidinov // Journal of Molecular Liquids. – 2017. – Vol. 243. – P. 144-150.

219. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. – Washington, D.C. : National Academies Press, 1996.

220. Klopas, A. Determination of piroxicam and its major metabolite 5-hydroxypiroxicam in human plasma by zero-crossing first-derivative spectrophotometry / A. Klopas, I. Panderi, M. Parissi-Poulou // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 1998. – Vol. 17. – № 3. – P. 515-524.

221. Roskos, L. K. Effects of dose and sex on the pharmacokinetics of piroxicam in the rat / L. K. Roskos, F. D. Boudinot // Biopharmaceutics & Drug Disposition. – 1990. – Vol. 11. – № 3. – P. 215-225.

222. Muhidinov, Z. Process for sunflower pectin production / Z. Muhidinov, M. Fishman, L. Liu. – 2012.

223. Physico-Chemical Characterization of Pectic Polysaccharides from Various Sources Obtained by Steam Assisted Flash Extraction (SAFE) / Z. Muhidinov, K. Teshaev, A. Jonmurodov [et al.] // Macromolecular Symposia. – 2012. – Vols. 317-318. – № 1. – P. 142-148.

224. Мухидинов, З. К. Физико-химические аспекты получения и применения пектиновых полисахаридов / З. К. Мухидинов. – 2003. – P. 238-238.

225. Флеш способ экстракции пектина из растительного сырья / З. К. Мухидинов, Х. И. Тешаев, А. С. Джонмуродов, Л. Ш. Лиу. – 2013. – P. 12-12.

226. Мухиддинов, З. К. Структура гомогалактуронана и физико-химические аспекты получения высокоочищенного пектина / З. К. Мухиддинов. – 1992. – P. 155-155.

227. Characterization of pectin, flash-extracted from orange albedo by microwave heating, under pressure. / M. L. Fishman, H. K. Chau, P. Hoagland, K. Ayyad // Carbohydrate research. – 2000. – Vol. 323. – № 1-4. – P. 126-38.

228. Моделирование технологических процессов производства пектина из выжимок яблок / Ш. Ё. Холов, Н. И. Юнусов, А. С. Джонмуродов [et al.] // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. – 2017. – Vol. 60. – № 3-4. – P. 178-183.

229. Холов, Ш. Ё. Оптимизация физико-химических параметров производства пектиновых полисахаридов путем моделирования технологических процессов : Автореферат диссертации на соискание ученой степени технических наук / Ш. Ё. Холов. – Душанбе : Технологический университет Таджикистана, 2018. – 30 p.
230. Diaultrafiltration concentration and purification of pectic polysaccharides / Z. K. Muhidinov, A. S. Jonmurodov, D. Kh. Khalikov [et al.] // Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol. – 2011. – Vol. 54. – P. 121-125.
231. Pectic Polysaccharides from Pumpkin Fruit / A. S. Jonmurodov, Z. K. Muhidinov, G. D. Strahan [et al.] // Gums and Stabilisers for the Food Industry 18: Hydrocolloid Functionality for Affordable and Sustainable Global Food Solutions. – The Royal Society of Chemistry, 2016. – P. 23-36.
232. Structural characterization of pectin obtained by different purification methods / Z. K. Muhidinov, K. I. Ikromi, A. S. Jonmurodov [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 183. – P. 2227-2237.
233. Sozinov, A. A. Protein polymorphism and its importance in genetics, breeding and evolution / A. A. Sozinov // Molekulyarnye mekhanizmy geneticheskikh protsessov Molekulyarnaya genetika, evolyutsiya i molekulyarno geneticheskie osnovy selektsii. – 1985. – P. 219-238.
234. Protein and polysaccharide conjugates as emerging scaffolds for drug delivery systems / A. Y. Xu, L. D. Melton, M. A. K. K. Williams, D. J. McGillivray // International Journal of Nanotechnology. – 2017. – Vol. 14. – № 1-6. – P. 470-480.
235. Zein Batch Extraction from Dry-Milled Corn: Cereal Disintegration by Dissolving Fluid Shear / L. C. Dickey, M. F. Dallmer, E. R. Radewonuk [et al.] // Cereal Chemistry. – 1998. – Vol. 75. – № 4. – P. 443-448.
236. Human gut microbes associated with obesity / R. E. Ley, P. J. Turnbaugh, S. Klein, J. I. Gordon // Nature. – 2006. – Vol. 444. – № 7122. – P. 1022-1023.
237. Thursby, E. Introduction to the human gut microbiota / E. Thursby, N. Juge // Biochemical Journal. – 2017. – Vol. 474. – № 11. – P. 1823-1836.

238. Vernocchi, P. Gut microbiota profiling: Metabolomics based approach to unravel compounds affecting human health / P. Vernocchi, F. Del Chierico, L. Putignani // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – № JUL.
239. GPCR-Mediated Signaling of Metabolites / A. S. Husted, M. Trauelsen, O. Rudenko [et al.] // Cell Metabolism. – 2017. – Vol. 25. – № 4. – P. 777-796.
240. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases / E. Rinninella, P. Raoul, M. Cintoni [et al.] // Microorganisms. – 2019. – Vol. 7. – № 1. – P. 14.
241. Gut Microbiota Dysbiosis as Risk and Premorbid Factors of IBD and IBS Along the Childhood-Adulthood Transition / L. Putignani, F. Del Chierico, P. Vernocchi [et al.] // Inflammatory Bowel Diseases. – 2016. – Vol. 22. – № 2. – P. 487-504.
242. Benjamini, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing / Y. Benjamini, Y. Hochberg // Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological). – 1995. – Vol. 57. – № 1. – P. 289-300.
243. Allen-Vercoe, E. Fusobacterium nucleatum: an emerging gut pathogen? / E. Allen-Vercoe, J. Strauss, K. Chadee // Gut Microbes. – 2011. – Vol. 2. – № 5. – P. 294-298.
244. Brennan, C. A. Fusobacterium nucleatum - symbiont, opportunist and oncobacterium / C. A. Brennan, W. S. Garrett // Nature Reviews. Microbiology. – 2019. – Vol. 17. – № 3. – P. 156-166.
245. Donaldson, G. P. Gut biogeography of the bacterial microbiota / G. P. Donaldson, S. M. Lee, S. K. Mazmanian // Nature Reviews. Microbiology. – 2016. – Vol. 14. – № 1. – P. 20-32.
246. The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota / A. E. Kaoutari, F. Armougom, J. I. Gordon [et al.] // Nature Reviews Microbiology. – 2013. – Vol. 11. – № 7. – P. 497-504.
247. Fallingborg, J. Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract / J. Fallingborg // Danish Medical Bulletin. – 1999. – Vol. 46. – № 3. – P. 183-196.
248. Biomass utilization by gut microbiomes / B. A. White, R. Lamed, E. A. Bayer, H. J. Flint // Annual Review of Microbiology. – 2014. – Vol. 68. – P. 279-296.

249. Triclosan has a robust, yet reversible impact on human gut microbial composition in vitro / K. K. Mahalak, J. Firrman, J.-J. Lee [et al.] // Plos One. – 2020. – Vol. 15. – № 6. – P. e0234046-e0234046.

250. Macfarlane, G. T. Comparison of fermentation reactions in different regions of the human colon / G. T. Macfarlane, G. R. Gibson, J. H. Cummings // The Journal of Applied Bacteriology. – 1992. – Vol. 72. – № 1. – P. 57-64.

251. Cummings, J. H. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon / J. H. Cummings, G. T. Macfarlane // The Journal of Applied Bacteriology. – 1991. – Vol. 70. – № 6. – P. 443-459.

252. Cockburn, D. W. Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease / D. W. Cockburn, N. M. Koropatkin // Journal of Molecular Biology. – 2016. – Vol. 428. – № 16. – P. 3230-3252.

253. Bhattacharya, T. Global Profiling of Carbohydrate Active Enzymes in Human Gut Microbiome / T. Bhattacharya, T. S. Ghosh, S. S. Mande // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 11. – P. e0142038.

254. pH-Mediated Microbial and Metabolic Interactions in Fecal Enrichment Cultures / Z. E. Ilhan, A. K. Marcus, D.-W. Kang [et al.] // mSphere. – 2017. – Vol. 2. – № 3. – P. e00047-17.

255. Yadav, M. A review of metabolic potential of human gut microbiome in human nutrition / M. Yadav, M. K. Verma, N. S. Chauhan // Archives of Microbiology. – 2018. – Vol. 200. – № 2. – P. 203-217.

256. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota / S. H. Duncan, P. Louis, J. M. Thomson, H. J. Flint // Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 11. – № 8. – P. 2112-2122.

257. Trabulsiella guamensis, a new genus and species of the family Enterobacteriaceae that resembles Salmonella subgroups 4 and 5 / A. C. McWhorter, R. L. Haddock, F. A. Nocon [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 1991. – Vol. 29. – № 7. – P. 1480-1485.

258. An acid-tolerance response system protecting exponentially growing Escherichia coli / Y. Xu, Z. Zhao, W. Tong [et al.] // Nature Communications. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 1496.

259. Jin, Q. pH as a Primary Control in Environmental Microbiology: 1. Thermodynamic Perspective / Q. Jin, M. F. Kirk. – Text : electronic // Frontiers in Environmental Science. – 2018. – Vol. 6. – URL: https://www.frontiersin.org/journals/environmental-science/articles/10.3389/fenvs.2018.00021/full (date accessed: 14.12.2024).

260. The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae / M. Vacca, G. Celano, F. M. Calabrese [et al.] // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8. – № 4. – P. 573.

261. Modulation of gut microbiota from obese individuals by in vitro fermentation of citrus pectin in combination with Bifidobacterium longum BB-46 / F. Bianchi, N. Larsen, T. de Mello Tieghi [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 102. – № 20. – P. 8827-8840.

262. Prebiotic effects of pectooligosaccharides obtained from lemon peel on the microbiota from elderly donors using an in vitro continuous colon model (TIM-2) / B. Míguez, C. Vila, K. Venema [et al.] // Food & Function. – 2020. – Vol. 11. – № 11. – P. 9984-9999.

263. Impact of Steviol Glycosides and Erythritol on the Human and Cebus apella Gut Microbiome / K. K. Mahalak, J. Firrman, P. M. Tomasula [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2020. – P. acs.jafc.9b06181-acs.jafc.9b06181.

264. The role of diet on gut microbiota composition / S. Bibbo, G. Ianiro, V. Giorgio [et al.] // Eur Rev Med Pharmacol Sci. – 2016. – Vol. 20. – № 22. – P. 4742-4749.

265. Impact of Preservation Method and 16S rRNA Hypervariable Region on Gut Microbiota Profiling / Z. Chen, P. C. Hui, M. Hui [et al.] // mSystems. – 2019. – Vol. 4. – № 1.

266. Morrison, D. J. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism / D. J. Morrison, T. Preston // Gut Microbes. – 2016. – Vol. 7. – № 3. – P. 189-200.

267. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites / A. Koh, F. De Vadder, P. Kovatcheva-Datchary, F. Backhed // Cell. – 2016. – Vol. 165. – № 6. – P. 1332-1345.

268. Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin / S. Zhang, H. Hu, L. Wang [et al.] // Food Chemistry. – 2018. – Vol. 244. – P. 232-237.

269. Prebiotic effects of citrus pectic oligosaccharides / P. Foti, G. Ballistreri, N. Timpanaro [et al.] // Natural Product Research. – 2022. – Vol. 36. – № 12. – P. 3173-3176.

270. Goji Berry Modulates Gut Microbiota and Alleviates Colitis in IL-10-Deficient Mice / Y. Kang, G. Yang, S. Zhang [et al.] // Mol Nutr Food Res. – 2018. – Vol. 62. – № 22. – P. e1800535-e1800535.

271. Metagenomic analysis of gut microbiota modulatory effects of jujube (Ziziphus jujuba Mill.) polysaccharides in a colorectal cancer mouse model / X. Ji, C. Hou, Y. Gao [et al.] // Food Funct. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 163-173.

272. The influence of in vitro pectin fermentation on the human fecal microbiome / S. J. Bang, G. Kim, M. Y. Lim [et al.] // AMB Express. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 98-98.

273. Roediger, W. E. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man / W. E. Roediger // Gut. – 1980. – Vol. 21. – № 9. – P. 793-798.

274. Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro / W. Scheppach, P. Bartram, A. Richter [et al.] // JPEN J Parenter Enteral Nutr. – 1992. – Vol. 16. – № 1. – P. 43-48.

275. Wilson, A. J. Short-chain fatty acids promote the migration of colonic epithelial cells in vitro / A. J. Wilson, P. R. Gibson // Gastroenterology. – 1997. – Vol. 113. – № 2. – P. 487-496.

276. The role of short-chain fatty acids in health and disease / J. Tan, C. McKenzie, M. Potamitis [et al.] // Adv Immunol. – 2014. – Vol. 121. – P. 91-119.

277. Short-chain fatty acids and ketones directly regulate sympathetic nervous system via G protein-coupled receptor 41 (GPR41) / I. Kimura, D. Inoue, T. Maeda [et al.] //

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2011. – Vol. 108. – № 19. – P. 8030-8035.

278. Pentanoic acid induces thymic stromal lymphopoietin production through Gq/11 and Rho-associated protein kinase signaling pathway in keratinocytes / N. Mizuno, K. Abe, Y. Morishita [et al.] // Int Immunopharmacol. – 2017. – Vol. 50. – P. 216-223.

279. Sonnenburg, E. D. Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates / E. D. Sonnenburg, J. L. Sonnenburg // Cell Metabolism. – 2014. – Vol. 20. – № 5. – P. 779-786.

280. Jew, S. Evolution of the human diet: linking our ancestral diet to modern functional foods as a means of chronic disease prevention / S. Jew, S. S. AbuMweis, P. J. H. Jones // Journal of Medicinal Food. – 2009. – Vol. 12. – № 5. – P. 925-934.

281. Diet-induced extinctions in the gut microbiota compound over generations / E. D. Sonnenburg, S. A. Smits, M. Tikhonov [et al.] // Nature. – 2016. – Vol. 529. – № 7585. – P. 212-215.

282. Effect of soybean insoluble dietary fiber on prevention of obesity in high-fat diet fed mice via regulation of the gut microbiota / B. Wang, H. Yu, Y. He [et al.] // Food & Function. – 2021. – Vol. 12. – № 17. – P. 7923-7937.

283. Insoluble dietary fiber from soy hulls regulates the gut microbiota in vitro and increases the abundance of bifidobacteriales and lactobacillales / L. Yang, Y. Zhao, J. Huang [et al.] // Journal of Food Science and Technology. – 2020. – Vol. 57. – № 1. – P. 152-162.

284. Ferreira-Halder, C. V. Action and function of *Faecalibacterium prausnitzii* in health and disease : Gut Microbiome in Health and Disease / C. V. Ferreira-Halder, A. V. de S. Faria, S. S. Andrade // Best Practice & Research Clinical Gastroenterology. – 2017. – Vol. 31. – № 6. – P. 643-648.

285. Untangling the Genetic Basis of Fibrolytic Specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in Diverse Gut Communities. – URL: https://www.mdpi.com/1424-2818/5/3/627 (date accessed: 12.11.2024). – Text : electronic.

286. Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD / J. Wong, Y. M. Piceno, T. Z. DeSantis [et al.] // American Journal of Nephrology. – 2014. – Vol. 39. – № 3. – P. 230-237.

287. The human gut Firmicute Roseburia intestinalis is a primary degrader of dietary β-mannans / S. L. La Rosa, M. L. Leth, L. Michalak [et al.] // Nature Communications. – 2019. – Vol. 10. – № 1. – P. 905.

288. Gut microbiota remodeling improves natural aging-related disorders through Akkermansia muciniphila and its derived acetic acid / J. Ma, Z. Liu, X. Gao [et al.] // Pharmacological Research. – 2023. – Vol. 189. – P. 106687.

289. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health / E. E. Blaak, E. E. Canfora, S. Theis [et al.] // Beneficial Microbes. – 2020. – Vol. 11. – № 5. – P. 411-455.

290. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway / T.-H. Jung, J. H. Park, W.-M. Jeon, K.-S. Han // Nutrition Research and Practice. – 2015. – Vol. 9. – № 4. – P. 343-349.

291. Biological effects of propionic acid in humans; metabolism, potential applications and underlying mechanisms / S. H. Al-Lahham, M. P. Peppelenbosch, H. Roelofsen [et al.] // Biochimica Et Biophysica Acta. – 2010. – Vol. 1801. – № 11. – P. 1175-1183.

292. The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome / L. Chen, D. Wang, S. Garmaeva [et al.] // Cell. – 2021. – Vol. 184. – № 9. – P. 2302-2315.e12.

293. Microbial Community Development in a Dynamic Gut Model Is Reproducible, Colon Region Specific, and Selective for Bacteroidetes and Clostridium Cluster IX / P. Van den Abbeele, C. Grootaert, M. Marzorati [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – Vol. 76. – № 15. – P. 5237-5246.

294. Optimal control of a bioreactor - ScienceDirect. – URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0096300310003516 (date accessed: 12.11.2024). – Text : electronic.

295. Mucosal Adhesion Properties of the Probiotic Lactobacillus rhamnosus GG SpaCBA and SpaFED Pilin Subunits / I. von Ossowski, J. Reunanen, R. Satokari [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2010. – Vol. 76. – № 7. – P. 2049-2057.

296. Walter, J. Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research / J. Walter // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 74. – № 16. – P. 4985-4996.

297. Nishiyama, K. Adhesion Properties of Lactic Acid Bacteria on Intestinal Mucin / K. Nishiyama, M. Sugiyama, T. Mukai // Microorganisms. – 2016. – Vol. 4. – № 3. – P. 1-18.

298. Hardin, G. The Competitive Exclusion Principle: An idea that took a century to be born has implications in ecology, economics, and genetics. / G. Hardin // Science. – 1960. – Vol. 131. – № 3409. – P. 1292-1297.

299. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? / F. Magne, M. Gotteland, L. Gauthier [et al.] // Nutrients. – 2020. – Vol. 12. – № 5. – P. 1474.

300. Mucosal Prevalence and Interactions with the Epithelium Indicate Commensalism of Sutterella spp. / K. Hiippala, V. Kainulainen, M. Kalliomäki [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7.

301. Ma, N. Dietary Amino Acids and the Gut-Microbiome-Immune Axis: Physiological Metabolism and Therapeutic Prospects / N. Ma, X. Ma // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2019. – Vol. 18. – № 1. – P. 221-242.

302. Lectin-Like Molecules of Lactobacillus rhamnosus GG Inhibit Pathogenic Escherichia coli and Salmonella Biofilm Formation / M. I. Petrova, N. C. E. Imholz, T. L. A. Verhoeven [et al.] // PLOS ONE. – 2016. – Vol. 11. – № 8. – P. e0161337.

303. Lactobacillus rhamnosus GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants / R. Berni Canani, N. Sangwan, A. T. Stefka [et al.] // The ISME Journal. – 2016. – Vol. 10. – № 3. – P. 742-750.

304. A Selected Lactobacillus rhamnosus Strain Promotes EGFR-Independent Akt Activation in an Enterotoxigenic Escherichia coli K88-Infected IPEC-J2 Cell Model / W. Zhang, Y.-H. Zhu, J.-C. Yang [et al.] // PLOS ONE. – 2015. – Vol. 10. – № 4. – P. e0125717.

305. Persistence of the Probiotic Lacticaseibacillus rhamnosus Strain GG (LGG) in an In Vitro Model of the Gut Microbiome / K. K. Mahalak, J. Firrman, J. Bobokalonov [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 21. – P. 12973.

306. Indole Propionic Acid, an Unusual Antibiotic Produced by the Gut Microbiota, With Anti-inflammatory and Antioxidant Properties / D. A. Negatu, M. Gengenbacher, V. Dartois, T. Dick // Frontiers in Microbiology. – 2020. – Vol. 11. – P. 575586.

307. The Gut Microbiota-Produced Indole-3-Propionic Acid Confers the Antihyperlipidemic Effect of Mulberry-Derived 1-Deoxynojirimycin / Y. Li, W. Xu, F. Zhang [et al.] // mSystems. – 2020. – Vol. 5. – № 5. – P. e00313.

308. Konopelski, P. Biological Effects of Indole-3-Propionic Acid, a Gut Microbiota-Derived Metabolite, and Its Precursor Tryptophan in Mammals' Health and Disease / P. Konopelski, I. Mogilnicka // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23. – № 3. – P. 1222.

309. Roager, H. M. Microbial tryptophan catabolites in health and disease / H. M. Roager, T. R. Licht // Nature Communications. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 3294.

310. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites / D. Dodd, M. H. Spitzer, W. Van Treuren [et al.] // Nature. – 2017. – Vol. 551. – № 7682. – P. 648-652.

311. Role of dietary fiber in the recovery of the human gut microbiome and its metabolome: Cell Host & Microbe. – URL: https://www.cell.com/cell-host-microbe/fulltext/S1931-3128(20)30674-0 (date accessed: 14.11.2024). – Text : electronic.

312. Salmela, L. A continuous flow method for estimation of drug release rates from emulsion formulations / L. Salmela, C. Washington // International Journal of Pharmaceutics. – 2014. – Vol. 472. – № 1-2. – P. 276-281.
313. Uppoor, V. R. S. Regulatory perspectives on in vitro (dissolution)/in vivo (bioavailability) correlations. / V. R. S. Uppoor // Journal of Controlled Release. – 2001. – Vol. 72. – № 1-3. – P. 127-132.
314. Limberg, J. Regulatory status on the role of in vitro dissolution testing in quality control and biopharmaceutics in Europe / J. Limberg, H. Potthast // Biopharmaceutics & Drug Disposition. – 2013. – Vol. 34. – № 5. – P. 247-253.
315. USFDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry—extended release oral dosage forms: development, evaluation, and application of in vitro/in vivo correlations / USFDA Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – 1997.
316. Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. Bacterial pectate lyases, structural and functional diversity / N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, G. Condemine, V. E. Shevchik // Environmental Microbiology Reports. – 2014. – Vol. 6. – № 5. – P. 427-440.
317. Pharmacopeia of Apple Pectin. VPHS-42-0395. Health Ministry, Tajikistan Republic. – 1995.
318. Opinion on the re-evaluation of pectin (E 440i) and amidated pectin (E 440ii) as food additives in foods for infants below 16 weeks of age and follow-up of their re-evaluation as food additives for uses in foods for all population groups / M. Younes, G. Aquilina, L. Castle [et al.] // EFSA Journal. – 2021. – Vol. 19. – № 1.
319. Das, J. UV-Spectrophotometric Assay Method Development and Validation of Metronidazole in Bulk and Tablet Formulation / J. Das, M. Dhua // Journal of PharmaSciTech. – 2014. – Vol. 3. – № 2. – P. 106-109.
320. Value of microscopy in the diagnosis of dysentery associated with invasive Entamoeba histolytica. / A. Gonzalez-Ruiz, R. Haque, A. Aguirre [et al.] // Journal of Clinical Pathology. – 1994. – Vol. 47. – № 3. – P. 236-239.
321. Muhidinov, Z. K. Pectin- Prophylactic product in Health and Diseases / Z. K. Muhidinov, D. K. Khalikov. – Dushanbe : National Center for Patents and Information

Ministry of Economic Development and Trade of the Republic of Tajikistan (NCPI), 2005. – 60 p.

322. Turgut, E. H. Bioavailability File: Metronidazole / E. H. Turgut, M. Özyazici // FABAD J. Pharm. Sci. – 2004. – Vol. 29. – P. 39-49.

323. Flagyl, Flagyl ER (metronidazole) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more.

324. Pectins as a universal medicine / O. Zaitseva, A. Khudyakov, M. Sergushkina [et al.] // Fitoterapia. – 2020. – Vol. 146. – P. 104676-104676.

325. Nakeeb, M. A. el-. Study of the antimicrobial action of pectin. II. Factors affecting the bactericidal activity of pectin. / M. A. el-Nakeeb, R. T. Yousef // Planta medica. – 1970. – Vol. 18. – № 4. – P. 295-302.

326. Gut dysbiosis induced by antibiotics is improved by tangerine pith extract in mice / X. Bian, T. Shi, Y. Wang [et al.] // Nutrition Research. – 2022. – Vol. 101. – P. 1-13.

327. Detection and characterization of Shigella species isolated from food and human stool samples in Nabeul, Tunisia, by molecular methods and culture techniques / W. Mokhtari, S. Nsaibia, D. Majouri [et al.] // Journal of Applied Microbiology. – 2012. – Vol. 113. – № 1. – P. 209-222.

328. Pectin enhances the effect of fecal microbiota transplantation in ulcerative colitis by delaying the loss of diversity of gut flora / Y. Wei, J. Gong, W. Zhu [et al.] // BMC Microbiology. – 2016. – Vol. 16. – № 1. – P. 255-255.

329. Dupont, C. Different thickening complexes with pectin in infant anti-regurgitation formula / C. Dupont, Y. Vandenplas // Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics. – 2020. – Vol. 109. – № 3. – P. 471-480.

330. Dupont, C. Efficacy and Tolerance of a New Anti-Regurgitation Formula / C. Dupont, Y. Vandenplas // Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition. – 2016. – Vol. 19. – № 2. – P. 104-104.

331. Herbal formula improves upper and lower gastrointestinal symptoms and gut health in Australian adults with digestive disorders / K. Ried, N. Travica, R. Dorairaj, A. Sali // Nutrition Research. – 2020. – Vol. 76. – P. 37-51.

332. Olive Biophenols as New Antioxidant Additives in Food and Beverage / R. Ciriminna, F. Meneguzzo, R. Delisi, M. Pagliaro // ChemistrySelect. – 2017. – Vol. 2. – № 4. – P. 1360-1365.

333. Pectin: A Long-Neglected Broad-Spectrum Antibacterial / R. Ciriminna, A. Fidalgo, F. Meneguzzo [et al.] // ChemMedChem. – 2020. – Vol. 15. – № 23. – P. 2228-2235.

334. Advantages and Pitfalls of Capillary Electrophoresis of Pharmaceutical Compounds and Their Enantiomers in Complex Samples: Comparison of Hydrodynamically Opened and Closed Systems / M. Masár, J. Hradski, M. G. Schmid, R. Szucs // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – № 18. – P. 6852-6852.

335. Efficacy and safety of pectin-supplemented enteral nutrition in intensive care: a randomized controlled trial. / F. Xi, X. Xu, S. Tan [et al.] // Asia Pacific journal of clinical nutrition. – Vol. 26. – № 5. – P. 798-803.

336. Clinical Effects of a Pectin-Containing Oligomeric Formula in Tube Feeding Patients: A Multicenter Randomized Clinical Trial / M. Maruyama, S. Goshi, Y. Kashima [et al.] // Nutrition in Clinical Practice. – 2020. – Vol. 35. – № 3. – P. 464-470.

337. Microbiota-dependent and -independent effects of dietary fibre on human health / Y. Cai, J. Folkerts, G. Folkerts [et al.] // British Journal of Pharmacology. – 2020. – Vol. 177. – № 6. – P. 1363-1381.

338. Structure and function of non-digestible carbohydrates in the gut microbiome / R. A. Rastall, M. Diez-Municio, S. D. Forssten [et al.] // Beneficial microbes. – 2022. – Vol. 13. – № 2. – P. 95-168.

339. Beukema, M. The effects of different dietary fiber pectin structures on the gastrointestinal immune barrier: impact via gut microbiota and direct effects on immune cells / M. Beukema, M. M. Faas, P. de Vos // Experimental & molecular medicine. – 2020. – Vol. 52. – № 9. – P. 1364-1376.

340. Enzymatically Extracted Apple Pectin Possesses Antioxidant and Antitumor Activity / A. Wikiera, M. Grabacka, Ł. Byczyński [et al.] // Molecules (Basel, Switzerland). – 2021. – Vol. 26. – № 5.

341. Teng, H. Polyphenols and bioavailability: an update. / H. Teng, L. Chen // Critical reviews in food science and nutrition. – 2019. – Vol. 59. – № 13. – P. 2040-2051.

342. Lavefve, L. Berry polyphenols metabolism and impact on human gut microbiota and health / L. Lavefve, L. R. Howard, F. Carbonero // Food & function. – 2020. – Vol. 11. – № 1. – P. 45-65.

343. Apple Pectin and a Polyphenol-Rich Apple Concentrate Are More Effective Together Than Separately on Cecal Fermentations and Plasma Lipids in Rats / O. Aprikian, V. Duclos, S. Guyot [et al.] // The Journal of Nutrition. – 2003. – Vol. 133. – № 6. – P. 1860-1865.

344. Apples: content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties / M. Kalinowska, A. Bielawska, H. Lewandowska-Siwkiewicz [et al.] // Plant physiology and biochemistry : PPB. – 2014. – Vol. 84. – P. 169e188-188.

345. BeMiller, J. N. An Introduction to Pectins: Structure and Properties / J. N. BeMiller. – 1986. – P. 2-12.

346. Modified Pectins for Colon-Specific Drug Delivery / A. Muvva, I. A. Chacko, V. Ghate, S. A. Lewis // Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. – 2020. – Vol. 54. – № 2s. – P. s12-s18.

347. Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. / L. Liu, M. L. Fishman, J. Kost, K. B. Hicks // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24. – № 19. – P. 3333-43.

348. Modulation of the Gut Microbiota Structure and Function by Two Structurally Different Lemon Pectins / J. Firrman, K. Mahalak, J. Bobokalonov [et al.] // Foods. – 2022. – Vol. 11. – № 23. – P. 3877.

349. Lacticaseibacillus rhamnosus Strain GG (LGG) Regulate Gut Microbial Metabolites, an In Vitro Study Using Three Mature Human Gut Microbial Cultures in

a Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) / L. Liu, A. B. Narrowe, J. A. Firrman [et al.] // Foods. – 2023. – Vol. 12. – № 11. – P. 2105.

.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, индексируемых в международных базах данных (Web of Science и Scopus и иностранные издания) и рекомендованных ВАК при Президенте Республики Таджикистан

[1-А]. Бобокалонов, Дж. Т. Пектин-зеиновые гели для инкапсуляции лекарственных средств и пищевых ингредиентов [Текст] / Х. И. Тешаев, Дж. Т. Бобокалонов, А. С. Джонмуродов, З. К. Мухидинов, Г. Ф. Касымова, L. S. Liu // Известия вузов. Химия и химическая технология. – 2011. – Т. 54, № 11. – С. 97–100. ISSN 0579-2991.

[2-А]. Бобокалонов, Дж. Т. Кинетика выхода пироксикама из зеин-пектиновых носителей в опытах ex vivo [Текст] / Дж. Т. Бобокалонов, З. К. Мухидинов, Ф. М. Ходжаева, Г. Ф. Касымова, L. S. Liu // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т. 46, № 6. – С. 98–101. ISSN 0023-1134.

[3-А]. Bobokalonov, J. T. Comparative analysis of the gut microbiota cultured in vitro using a single colon versus a 3-stage colon experimental design [Text] / J. Firrman, L. S. Liu, K. Mahalak, C. Tanes, K. Bittinger, J. T. Bobokalonov // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2021. – Vol. 105, No. 8. – P. 3353–3367. ISSN 0175-7598.

[4-А]. Bobokalonov, J. T. Structural characterization of pectin obtained by different purification methods [Text] / Z. Muhidinov, J. T. Bobokalonov, K. I. Ikromi, A. S. Jonmurodov, A. S. Nasriddinova, S. R. Usmanova, G. D. Strahan, LinShu Liu // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – Vol. 183. – P. 2227–2237. ISSN 0141-8130.

[5-А]. Bobokalonov, J. T. Evaluation of extended-release of piroxicam loaded pectin–zein hydrogel microspheres: in vitro, ex vivo, and in vivo studies [Text] / Z. Muhidinov, J. T. Bobokalonov, S. Jonmurodov, A. S. Nasriddinova, F. Khojaeva, G. Komilova, L. S. Liu // Current Drug Delivery. – 2022. – Vol. 19, No. 10. – P. 1093–1101. ISSN 1567-2018.

[6-А]. Bobokalonov, J. T. The impact of environmental pH on the gut microbiota community structure and short chain fatty acid production [Text] / J. Firrman, L. S.

Liu, K. Mahalak, C. Tanes, K. Bittinger, V. Tu, J. T. Bobokalonov [et al.] // FEMS Microbiology Ecology. – 2022. – Vol. 98. – P. 1–9. ISSN 0168-6496.

[7-A]. Bobokalonov, J. T. Modulation of the gut microbiota structure and function by two structurally different lemon pectins [Text] / J. Firrman, K. Mahalak, L. S. Liu, J. J. Lee, K. Bittinger, J. T. Bobokalonov [et al.] // Foods. – 2022. – Vol. 11, No. 23. – Article 3877. eISSN 2304-8158.

[8-A]. Bobokalonov, J. T. Persistence of the probiotic Lacticaseibacillus rhamnosus strain GG (LGG) in an in vitro model of the gut microbiome [Text] / K. K. Mahalak, J. Firrman, J. Bobokalonov, A. B. Narrowe, K. Bittinger, S. Daniel, C. Tanes, L. M. Mattei, W.-B. Zeng, J. W. Soares, M. Kobori, J. M. S. Lemons, P. M. Tomasula, L. Liu [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, No. 21. – Article 12973. eISSN 1422-0067.

[9-A]. Bobokalonov, J. T. Lacticaseibacillus rhamnosus GG regulates gut microbial metabolites: an in vitro study using SHIME [Text] / L. Liu, J. T. Bobokalonov, A. B. Narrowe, J. A. Firrman, K. K. Mahalak, J. M. S. Lemons, K. Bittinger, S. Daniel, C. Tanes, L. Mattei [et al.] // Foods. – 2023. – Vol. 12. – Article 2105. eISSN 2304-8158.

[10-A]. Bobokalonov, J. T. A new approach to the treatment of acute infection diseases with antibiotic–pectin formulae [Text] / Z. K. Muhidinov, J. T. Bobokalonov, R. S. Kimatov, E. R. Rahmonov, G. I. Komilova, Z. U. Sherova, L. Liu // Journal of Infection in Developing Countries. – 2024. – Vol. 18. – P. 407–419. ISSN 2036-6590.

[11-A]. Bobokalonov, J. T. Supplementation with rice-bran fibers increases SCFA-producing bacteria in gut microbiota in vitro [Text] / K. K. Mahalak, L. Liu, J. T. Bobokalonov, A. B. Narrowe, J. Firrman, K. Bittinger, W. Hu, S. M. Jones, A. M. Moustafa // Frontiers in Nutrition. – 2024. – Vol. 11. – Article 1304045. eISSN 2296-861X.

Статьи, опубликованные в других изданиях, рекомендованных ВАК при Президенте Республики Таджикистан

[12-A]. Бобокалонов, Дж. Т. Применение пектинов в медицине и фармации [Текст] / Дж. Т. Бобокалонов, З. К. Мухидинов, С. Д. Исупов, Г. И. Комилова //

Вестник Академии медицинских наук Таджикистана. – 2013. – № 4. – С. 39–52. ISSN 2221-7355.

[13-А]. Бобокалонов, Дж. Т. Лечение острых инфекционных заболеваний в комплексной терапии антибиотика с пектином [Текст] / Р. С. Киматов, Э. Р. Рахманов, З. К. Мухидинов, Г. И. Комилова, Дж. Т. Бобокалонов // Наука и инновация. – 2021. – № 4. – С. 191–197. ISSN 2312-3648.

Список работ в материалах международных конференций

[14-A]. Bobokalonov J.T. Pectin–zein microspheres for colon-specific drug delivery [Text] / J.T. Bobokalonov, Z.K. Muhidinov, J. Liesiene, G.F. Kasimova, A.S. Nasriddinov // Book of Abstracts “Smithy of Idea”, International Conference, July 4–7, 2013. – Rusne, Lithuania, 2013.

[15-A]. Bobokalonov J.T. Formation and characterization of pectin–zein microspheres [Text] / J.T. Bobokalonov, Z.K. Muhidinov, J. Liesiene, G.F. Kasimova, A.S. Nasriddinov // Baltic Polymer Symposium, September 18–21, 2013. – Trakai, Lithuania, 2013. – P. 123.

[16-A]. Bobokalonov J.T. Application of pectin–zein microspheres for controlled drug release [Text] / J.T. Bobokalonov, Z.K. Muhidinov, J. Liesiene, A. Nasriddinov, G. Komilova // 3rd EPNOE International Polysaccharide Conference, October 21–24, 2013. – Nice, France, 2013. – P. 384.

[17-A]. Bobokalonov J.T. Citrus pectins modulate the gut microbiota and increase short-chain fatty acid production in vitro [Text] / J. Firrman, J. Bobokalonov, L. Liu, J.-J. Lee, K. Bittinger, L. Mattei, R. Gadaingan, K. Mahalak // ACS Fall 2021: Resilience of Chemistry, August 22–26, 2021. – Atlanta, GA, USA; Virtual, 2021.

[18-A]. Bobokalonov J.T. Environmental pH is a determinant of the gut microbiota community composition and production of short-chain fatty acids [Text] / J. Firrman, L. Liu, K. Mahalak, C. Tanes, K. Bittinger, V. Tu, J. Bobokalonov, L. Mattei, H. Zhang, P. Van den Abbeele // ACS Fall 2021: Resilience of Chemistry, August 22–26, 2021. – Atlanta, GA, USA; Virtual, 2021.

[19-A]. Bobokalonov J.T. The differential effect of soluble and insoluble rice fiber on the human gut microbiota in vitro [Text] / K. Mahalak, J. Firrman, J. Bobokalonov, L.

Liu // ACS Fall 2022: Sustainability in a Changing World, August 21–25, 2022. – Chicago, IL, USA; Virtual, 2022.

[20-A]. Bobokalonov J.T. A new approach on the treatment of acute infection diseases by antibiotic-pectin formulae [Text] / Z.K. Muhidinov, J.T. Bobokalonov, E. Rahmonov, R. Kimatov, G. Komilova, O. Shomirzoeva, A. Jonmurodov, D.Kh. Khalikov, L. Liu // ACS Fall 2022: Sustainability in a Changing World, August 21–25, 2022. – Chicago, IL, USA; Virtual, 2022. – Presentation, August 23, 2022.

[21-A]. Bobokalonov J.T. Pectin–zein hydrogel microspheres: in vitro, ex vivo, and in vivo studies [Text] / J.T. Bobokalonov, Kh. Ikromi, Z.K. Muhidinov, F. Khojaeva, G. Komilova, S. Yusufi, L. Liu // ACS Fall 2022: Sustainability in a Changing World, August 21–25, 2022. – Chicago, IL, USA; Virtual, 2022. – Presentation, August 24, 2022.

[22-A]. Bobokalonov J.T. Pectin–antibiotics: a new nutritional formula in the treatment of acute infection diseases [Text] / J.T. Bobokalonov, R. Kimatov, E.R. Rahmonov, G.I. Komilova, Z.K. Muhidinov // 31st International Conference of FFC, September 29 – October 1, 2023. – Yerevan, Armenia, 2023. – P. 355–357.

[23-A]. Бобокалонов Дж.Т. Влияние молекулярной массы и степени этерификации пектина на кишечную микробиоту и производство короткоцепочечных жирных кислот [Текст] / Дж.Т. Бобокалонов, С.Дж. Юсуфи, Г.А. Кодирова, С.Р. Усманова, З.К. Мухидинов // Материалы международной научно-практической конференции “Биофармацевтические аспекты разработки лекарственных препаратов”, 15 октября 2024 г. – Душанбе, 2024. – С. 20–27.

[24-A]. Bobokalonov J.T. Prebiotic potential of sunflower pectin: an ex vivo analysis across multiple age groups [Text] / J. Firrman, L. Liu, K. Mahalak, J. Lemons, A. Narrowe, P. Van den Abbeele, A. Baudot, S. Deyaert, J.T. Bobokalonov, Z.K. Muhidinov, A. Moustafa, S. Higgins // ACS Fall 2025, August 17–21, 2025. – Washington, DC, USA, 2025. – Presentation, August 20, 2025.

[25-A]. Bobokalonov J.T. Computational modeling of colon-targeted polymeric drug delivery systems based on in vitro–in vivo correlation [Text] / J.T. Bobokalonov, G.A. Kodirova, G.I. Komilova, S.J. Yusufi, Z.K. Muhidinov // Сборник тезисов докладов

научно-практической конференции учёных Таджикистана и Узбекистана, 25 марта 2026 г. – Ташкент, Узбекистан, 2026. – С. 10.

Монография

[1-А]. Бобокалонов Дж. Т. Пектин – основа для создания функциональной пищи [Текст] : монография / З. К. Мухидинов, С. Р. Усманова, Дж. Т. Бобокалонов. – Душанбе : Сифат-Офсет, 2019. – 192 с.

Патенты на изобретения

[1-А]. Способ формирования гидрогелевых микросфер для создания систем доставки лекарственных веществ [Текст] : пат. TJ 971 Респ. Таджикистан / З.К. Мухидинов, Дж. Т. Бобокалонов, А. С. Насриддинов, Ли Шу Лю. – Опубл. 05.10.2018, Бюл. № 143. – Душанбе : НПЦ Респ. Таджикистан, 2018.