

УДК 616.348-002-053.3

Кишечная микробиота и короткоцепочечные жирные кислоты в патогенезе некротизирующего энтероколита у глубоко недоношенных новорожденных

Е. Н. Кукаев^{1,2*}, А. О. Токарева¹, О. А. Крог-Йенсен^{1,3}, А. А. Лёнюшкина¹,
Н. Л. Стародубцева^{1,4}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997 Россия

²Институт энергетических проблем химической физики им. В.Л. Тальрозе ФГБУН Федерального исследовательского центра химической физики имени Н.Н. Семёнова РАН, Москва, 119991 Россия

³Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), Москва, 119048 Россия

⁴Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия

*E-mail: e_kukaev@oparina4.ru

Поступила в редакцию 29.01.2025

Принята к печати 25.06.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27623

РЕФЕРАТ Формирование симбиотической кишечной экосистемы – необходимый этап адаптации новорожденного ребенка. Микробиом кишечника глубоко недоношенных новорожденных характеризуется нестабильностью, снижением микробного разнообразия с преобладанием грамотрицательных *Proteobacteria*, что сопряжено с одним из ключевых патогенетических механизмов развития некротизирующего энтероколита (НЭК). Короткоцепочечные жирные кислоты (КЦЖК) представляют собой основные бактериальные метаболиты, играющие важную роль в поддержании целостности кишечного барьера и регуляции иммунологической реактивности кишечника. В обзоре обсуждается роль кишечной микробиоты и КЦЖК при некротизирующем энтероколите у новорожденных в аспекте потенциальных диагностических и терапевтических возможностей. В клинических исследованиях содержания КЦЖК в кале недоношенных новорожденных с НЭК обнаружено выраженное снижение общего уровня КЦЖК и большинства бактериальных метаболитов в отдельности, что подтверждено в ряде модельных экспериментов. Для уточнения роли КЦЖК в развитии НЭК, определения их диагностического потенциала и возможностей создания комплексных про- и постбиотических формул необходимо проведение многоцентровых мультиомиксных исследований на большой выборке глубоко недоношенных новорожденных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА некротизирующий энтероколит, глубоко недоношенные новорожденные, диагностика, газовая хроматография с масс-спектрометрией, короткоцепочечные жирные кислоты, микробиота.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГХ – газовая хроматография; ЖХ – жидкостная хроматография; КЦЖК – короткоцепочечные жирные кислоты; МС – масс-спектрометрия; НЭК – некротизирующий энтероколит; ОРИТН – отделение реанимации и интенсивной терапии новорожденных; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Некротизирующий энтероколит (НЭК) – тяжелое заболевание желудочно-кишечного тракта новорожденных, в основе которого лежит выраженное воспаление стенки кишечника с последующим некрозом и возможной перфорацией. НЭК является наиболее часто встречающимся серьезным желудочно-кишечным осложнением недоношенных детей и редко встречается у детей, рожденных после 32 недель [1]. Основными предрасполагающими факторами развития чрезмерного воспаления в кишечнике являются незрелость желудочно-кишечного тракта, нарушение процесса бактериальной колонизации и отсутствие энтерального питания грудным молоком [2]. Заболеваемость НЭК обратно пропорциональна гестационному возрасту, составляя от 2 до 10% у глубоко недоношенных детей (28–32 недели гестации) и достигая 55% среди экстремально недоношенных новорожденных [3].

Несмотря на достижения современной медицины, на протяжении многих лет заболеваемость НЭК остается относительно стабильной среди детей с очень низкой массой тела при рождении и является одной из основных причин неблагоприятных исходов в этой когорте детей. Необходимость хирургического вмешательства по поводу перфорации кишечника или подозрения на нее при НЭК составляет от 20 до 52%. Летальность у детей очень низкой массы тела при развитии хирургического НЭК в развитых странах составляет в среднем 30%, достигая 50–72% среди новорожденных с экстремально низкой массой тела (ЭНМТ) [4, 5]. Клинические наблюдения также демонстрируют крайне неблагоприятное течение НЭК при сочетании таких факторов, как врожденная пневмония, гемодинамически значимый артериальный проток и экстремально низкая масса тела при рождении [6]. У 22.7–35% новорожденных, перенесших хирургическую стадию НЭК, развивается синдром кишечной недостаточности – снижение функции кишечника ниже уровня, необходимого для абсорбции макронутриентов и/или воды и электролитов [7]. Помимо поражения желудочно-кишечного тракта, реализация НЭК значительно повышает риск неблагоприятных неврологических исходов. Воспаление в кишечнике, как в органе с поверхностью большой площади, обширной васкуляризацией и высокой степенью концентрации иммунных клеток, может способствовать не только перфорации кишечной стенки, но и развитию системных эффектов заболевания, оказывающих влияние на другие ткани и органы [8]. Согласно проспективным когортным исследованиям, изучавшим отдаленные исходы НЭК, задержка нейропсихического развития отмечается у 37.6–56.8%

недоношенных массой менее 1000 г при рождении, что значительно превышает показатели у детей без НЭК [9].

С учетом высокой распространенности НЭК и значительного риска неблагоприятных исходов одним из приоритетных направлений в изучении этого заболевания является разработка инновационных предиктивных и диагностических методов. Идентификация ранних специфичных биомаркеров НЭК открывает возможность выявления чрезмерного воспалительного процесса в кишечнике еще до появления клинических симптомов [10]. Такой подход позволит своевременно выделять группы наибольшего риска, что, в свою очередь, обеспечит раннее начало консервативного лечения и перспективное внедрение таргетных инновационных методов терапии. Особенно важным представляется использование неинвазивных методов предикции и диагностики, которые исключают флегботомические потери и болевые раздражители, что критично для новорожденных с очень низкой массой тела. Одним из таких методов считается определение уровня фекального кальпротектина как потенциального раннего биомаркера НЭК у недоношенных детей. Однако его диагностическая ценность остается предметом научных дискуссий [11].

В последние два десятилетия микробиом кишечника стал объектом интенсивного изучения благодаря его ключевой роли в поддержании здоровья и ассоциации с различными патологиями, такими как сахарный диабет, астма, воспалительные заболевания кишечника, включая НЭК [12]. Пониженная частота воспалительных заболеваний у людей с высоким содержанием бактерий-продуцентов КЦЖК и, соответственно, с более высокими концентрациями КЦЖК стимулировала активное развитие исследований в этой области [13]. В то время как анализ состава микробиоты кишечника требует применения дорогостоящих и затратных по времени исполнения методов, таких как секвенирование 16S рРНК, которое предоставляет большой массив данных, сложный для интерпретации врачом-клиницистом, количественный анализ метаболической активности микроорганизмов по уровням КЦЖК в кале методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) заслуживает особого внимания [14, 15]. Этот метод является быстрым, точным и неинвазивным, что делает его оптимальным для использования в отделениях реанимации и интенсивной терапии новорожденных (ОРИТН), особенно у глубоко недоношенных детей с высоким риском развития НЭК.

Целью данного обзора является обобщение и анализ современных данных о патогенетической роли

КЦЖК, ключевых метаболитов микробиоты кишечника, в развитии НЭК у глубоко недоношенных новорожденных (менее 32 недель гестации). Это направление представляется перспективным как для понимания патогенеза заболевания, так и для разработки новых диагностических и профилактических стратегий.

МИКРОБИОТА КИШЕЧНИКА В ПАТОГЕНЕЗЕ НЭК

Бактериальное сообщество желудочно-кишечного тракта представляет собой огромную популяцию микроорганизмов (около 10^{12} – 10^{14} клеток), которые относятся к 100–1000 видов. Это экосистема, которую часто называют «вторым геномом» или даже «вторым мозгом», из-за ее способности влиять на различные функции организма, высвобождая в кровоток тысячи веществ [14].

У новорожденного микробиом начинает формироваться с самого рождения и зависит от множества факторов, таких как способ родоразрешения (естественные роды или кесарево сечение), режим питания (грудное или искусственное вскармливание) и окружающая среда [16]. Поначалу состав микробиоты новорожденного очень пластичен и изменчив, но стабилизируется в раннем детстве [17]. Длительное пребывание в медицинских учреждениях, антибактериальная терапия, питание через оро- или назогастральный зонд, отсутствие контакта с материнской микрофлорой, а также недостаток материнского молока являются ключевыми факторами, влияющими на особенности формирования микробиоты кишечника у недоношенных детей, микробный профиль которой отличается от профиля у доношенных новорожденных [18]. Считается, что колонизация желудочно-кишечного тракта младенцев в условиях отделения реанимации и интенсивной терапии (ОРИТН) приводит к снижению альфаразнообразия микробного сообщества с одновременным обогащением генами, отвечающими за устойчивость к антибиотикам [19–22].

Кишечник глубоко недоношенных новорожденных преимущественно колонизируется условно патогенными факультативными анаэробами, такими как представители типов Proteobacteria и Firmicutes. Это происходит одновременно со снижением численности комменсальных бактерий, например, типов Actinobacteria и Bacteroidota [23, 24]. В частности, бактерии семейства Enterobacteriaceae, к которому относятся представители *Enterobacter*, *Escherichia* и *Klebsiella* (тип Proteobacteria), облашают значительно более высокой относительной численностью. Напротив, полезные бактерии рода *Bifidobacterium* (тип Actinobacteria) представлены в значительно меньшем объеме, чем у доношенных

детей [23, 24]. Интересно, что при развитии микробного сообщества у глубоко недоношенных новорожденных часто происходит переход от доминирования одного рода бактерий к другому, что отражает большую динамичность и неустойчивость микробиоты у таких младенцев [22, 25, 26]. Подобные изменения могут быть связаны с воздействием внешних факторов, например, с использованием антибиотиков и особенностями питания [22]. Высокая индивидуальная вариабельность микробиома кишечника недоношенных новорожденных, а также малые численности исследуемых групп затрудняют выделение бактерий, ответственных за развитие НЭК [26].

Ранее обнаружили снижение разнообразия кишечного микробиома у глубоко недоношенных детей, а при этом показано, что уменьшение этого разнообразия еще более выражено у младенцев, у которых развивается НЭК [27]. Следует отметить, что снижение количества комменсальных бактерий, в частности, представителей рода *Bifidobacterium* (тип Actinobacteria) и *Bacteroides* (тип Bacteroidota), и увеличение численности условно-патогенных микроорганизмов типа Proteobacteria (в особенности, семейства Enterobacteriaceae) и Firmicutes (роды *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Streptococcus* и *Blautia*) становится все более выраженным [27–31]. Связь класса Gammaproteobacteria, включающего семейство Enterobacteriaceae, с развитием НЭК показана в одном из крупнейших продольных исследований среди недоношенных детей с массой тела менее 1500 г при рождении [31]. Повышение численности потенциально патогенных Gammaproteobacteria при одновременном снижении численности *Bacteroides* еще до манифестиации НЭК подтверждено и в других работах [27, 32, 33].

Группа под руководством Stewart C.J. и соавт. (2016) предложила рассматривать в аспекте патогенеза НЭК у глубоко недоношенных не отдельные микроорганизмы как потенциальные патогены, а нестабильность формирующегося кишечного микробиома [25]. Эта нестабильность проявляется в частых переходах между доминирующими бактериальными сообществами. В продольном исследовании микробиома кишечника 35 глубоко недоношенных новорожденных НЭК наблюдался исключительно при доминировании бактерий родов *Klebsiella* и *Escherichia* (семейство Enterobacteriaceae, тип Proteobacteria), либо *Staphylococcus* и *Enterococcus* (тип Firmicutes). При этом НЭК не возникал при большем разнообразии бактериального сообщества с высоким относительным содержанием *Bifidobacterium*. Эти данные свидетельствуют о том, что в патогенезе НЭК следует рассматривать не только и не столько фактор

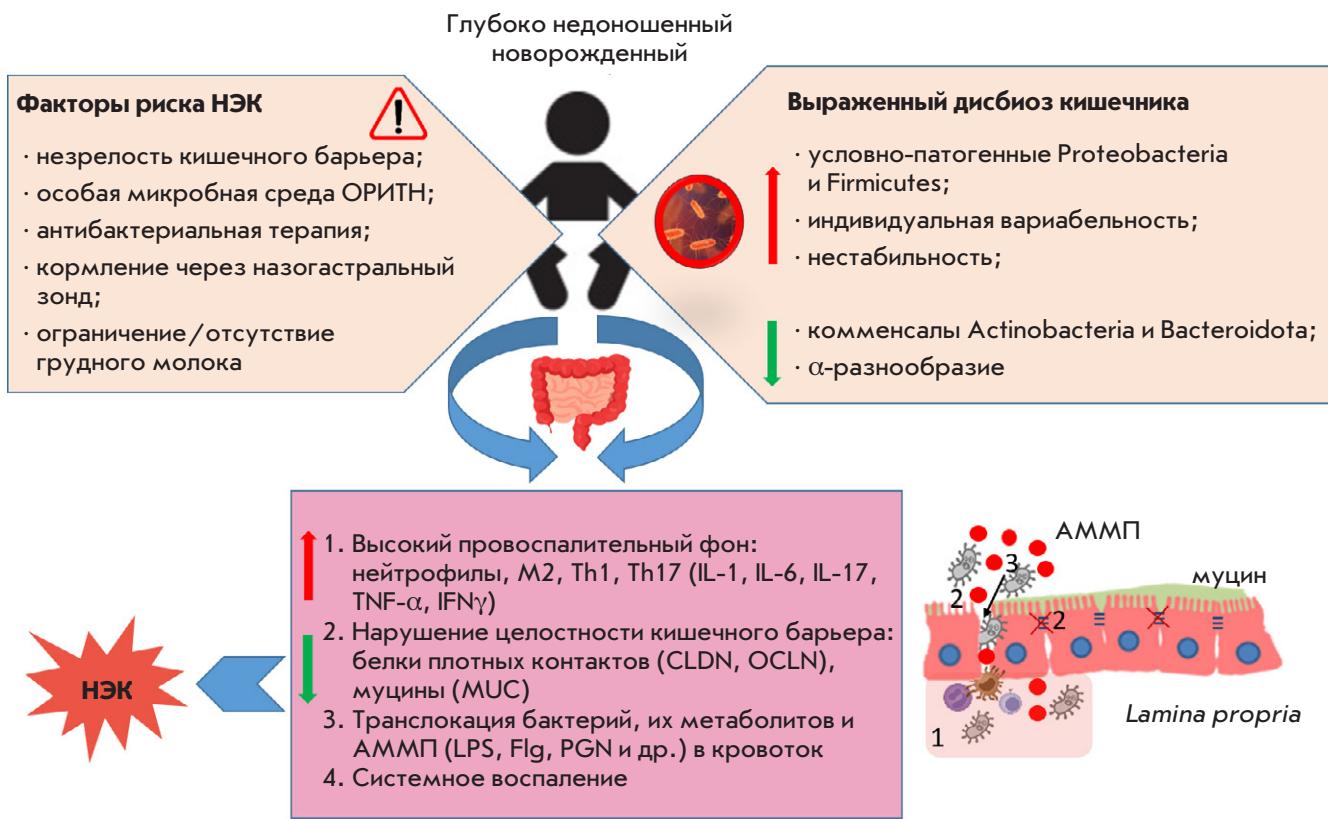


Рис. 1. Схема патогенеза НЭК у глубоко недоношенных новорожденных

колонизации кишечника тем или иным видом патогенных бактерий, а более широко – фактор стабильности и разнообразия микробиома, что подчеркивает многофакторную природу данной патологии [25].

Функциональная незрелость кишечника у глубоко недоношенных новорожденных проявляется в ограниченной способности эпителиальных клеток к полной дифференцировке и снижении количества клеток Панета, что сопровождается уменьшением синтеза защитной слизи [34]. Недостаточное образование кишечной слизи, незрелый иммунитет кишечника, снижение эндогенной продукции antimикробных факторов могут привести к усилиению бактериальной адгезии и повышенному воздействию бактериального эндотоксина (липополисахарида, ЛПС) грамотрицательных бактерий (в частности, превалирующего у таких детей типа *Proteobacteria*), стимулирующему Toll-4-рецепторы (TLR4) эпителиальных клеток, приводя к их апоптозу и нарушению целостности эпителиального барьера кишечника, а также вызывая выраженную воспалительную реакцию, опосредованную TNF α , IL-1 β и другими провоспалительными цитокинами [35]. В конечном итоге, эти процессы повышают риск развития неонатального сепсиса или локально-го воспаления (рис. 1) [6, 36, 37].

При НЭК патоген может и не быть идентифицирован [25]. Диагностика основана на клинических и рентгенологических признаках и не требует выделения конкретного микроорганизма. Тем не менее изучение роли нарушений микробиома в патогенезе НЭК необходимо для того, чтобы профилирование микробиома стало частью клинической практики. Раннее выявление избыточного роста бактерий, особенно видов, связанных с НЭК и поздним началом сепсиса, а также анализ временных изменений структуры микробиома могут быть перспективными подходами к лечению глубоко недоношенных детей [36]. Особое значение придается микробиологическому исследованию отделяемого со слизистой верхних дыхательных путей и ЖКТ в первые сутки жизни как фактору, ассоциированному с реализацией раннего неонатального сепсиса и НЭК у глубоко недоношенных детей [38]. Однако интеграция информации о микробиоте кишечника и ее изменениях в рутинную клиническую практику сталкивается с рядом препятствий, включая значительное разнообразие и сложность состава микробиоты, а также отсутствие стандартных методов и пайплайн для анализа. Эти факторы значительно усложняют интерпретацию полученных данных и требуют дальнейших исследований.

Культуральные методы традиционно используются для изучения микробиоты через выращивание микроорганизмов на различных питательных средах. Такие методы позволяют детально изучать живые культуры бактерий и проводить функциональные тесты, например, на чувствительность к антибиотикам. Однако они имеют серьезные ограничения: только небольшая часть микроорганизмов кишечника может культивироваться в лабораторных условиях, и процесс культивирования может занимать значительное время. В результате культуральные методы ограниченно отражают видовой состав микробиоты и предоставляют качественные, а не количественные данные [39].

Для амплификации и выявления определенных участков ДНК используется полимеразная цепная реакция (ПЦР) – мощный высокочувствительный молекулярный инструмент, позволяющий быстро обнаруживать присутствие определенных микроорганизмов. Однако ПЦР преимущественно используется для поиска известных видов и не позволяет судить о видовом разнообразии и богатстве состава микробиоты [40].

Метод секвенирования нового поколения (NGS) 16S рРНК приобрел широкую популярность для изучения микробиоты благодаря возможности анализа генетического материала как культивируемых, так и некультивируемых микроорганизмов [40]. Этот метод позволяет идентифицировать видовую принадлежность бактерий, оценивать их относительное количество и потенциальную метаболическую активность. Однако NGS 16S рРНК имеет свои недостатки, такие как сложность в дифференциации близкородственных видов, отсутствие детальной информации о функциональных аспектах бактериальных сообществ, высокая стоимость и временные затраты на анализ, а также сложность обработки и интерпретации данных (табл. 1) [41].

Даже зная состав микробного сообщества и его генетический профиль, 16S рРНК-секвенирование

не позволяет полностью раскрыть функциональную роль каждого вида в микробиоме. Микроорганизмы способны адаптироваться, изменяя уровень синтеза ферментов и их активность, что позволяет им влиять на окружающую среду, членов сообщества, клетки и сам организм хозяина. Для решения этих задач разрабатываются мультиомиксные подходы, объединяющие метагеномику, метатранскриптомику, протеомику и метаболомику. Они предоставляют более полную информацию о выраженности дисбактериоза кишечника, уровнях взаимодействия и метаболической активности микробного сообщества, что может быть особенно полезно в клинических исследованиях и при лечении сложных заболеваний, связанных с изменениями микробиома [42].

КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ – КЛЮЧЕВЫЕ МЕТАБОЛИТЫ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ

Бактерии способны синтезировать около 15000 молекул, уникальных для организма человека, к которым иммунные клетки и клетки кишечника экспрессируют специфические рецепторы [43]. Бактериальные метаболиты могут проникать через кишечный барьер и оказывать системное воздействие [44, 45]. Среди таких биоактивных соединений микробного происхождения выделяются антимикробные пептиды, конъюгированная линолевая кислота, гамма-аминомасляная кислота и КЦЖК [45].

В организме человека эти соединения выполняют множество важных функций, включая ингибирование синтеза провоспалительных цитокинов, поддержание целостности эпителиального барьера кишечника, а также стимуляцию пролиферации и дифференцировки колоноцитов [45]. КЦЖК являются универсальными энергетическими субстратами для различных клеток, причем масляная кислота выступает в качестве предпочтительного источника энергии для колоноцитов, обеспечивая 60–70% их энергетических потребностей [46]. Как конечные продукты бактериального метаболизма, КЦЖК

Таблица 1. Сравнение основных методов исследования состава микробиоты: преимущества и ограничения

Метод	Преимущества	Ограничения
Культуральные методы	Позволяют получать живые культуры; возможно проведение функциональных тестов, включая тесты на чувствительность к антибиотикам	Ограничено число культивируемых видов; трудоемкость и длительность; данные в основном качественные [39]
ПЦР	Высокая чувствительность; быстрое выявление известных микроорганизмов	Определяет только заранее известные микроорганизмы; не позволяет оценить общее видовое разнообразие [40]
Секвенирование 16S рРНК	Анализ культивируемых и некультивируемых видов; оценка относительного количества; профиль микробиоты	Не различает близкородственные виды; ограниченная функциональная информация; высокая стоимость; сложности интерпретации [40, 41]

представляют собой более информативный индикатор состояния кишечника, чем отдельные микроорганизмы или их комбинации. Раскрытие механизмов действия этих метаболитов является ключевым для идентификации потенциальных биомаркеров НЭК и разработки новых терапевтических мишеней.

Только 5% КЦЖК, продуцируемых в кишечнике, обнаруживаются в фекалиях, поскольку основная часть поглощается колоноцитами [47]. В среднем уровни КЦЖК в фекалиях составляют единицы–десятки ммоль/кг [48]. Лишь небольшая часть (около 1%) КЦЖК в виде солей всасывается в воротную вену [49]. Уксусная кислота (ацетат) является одним из ключевых конечных продуктов гликолиза у множества комменсальных микроорганизмов, включая представителей *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Blautia* (тип Firmicutes), *Bacteroides* и *Prevotella* (тип Bacteroidota), а также *Bifidobacterium* (тип Actinobacteria) [30]. Пропионовая кислота (пропионат) синтезируется ограниченным числом бактерий кишечника через метаболизм сукцината, акрилата и пропандиола. К этим микроорганизмам относятся представители рода *Clostridium*, *Veillonella* (тип Firmicutes), *Propionibacterium* (тип Actinobacteria) и *Bacteroides* (тип Bacteroidota) [4]. Бактерии, производящие масляную кислоту (бутират), в основном относятся к типу Firmicutes, включая семейства Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Erysipelotrichaceae и Clostridiaceae [50]. Особенно много производителей бутиратов у видов класса Clostridia [51]. Кроме того, в кишечнике присутствуют бактерии, которые используют конечные продукты метаболизма других микроорганизмов для синтеза масляной кислоты, что предотвращает накопление лактата и ацетата [5]. Например, ацетат, производимый *Bifidobacterium*, преобразуется в бутират бактериями класса Clostridia [52].

Уксусная кислота служит субстратом для биосинтеза жирных кислот, участвует в цикле Кребса [53] и обладает противовоспалительными свойствами [54]. Пропионат способствует улучшению барьерной функции и целостности кишечного эпителия, а также играет важную роль в регуляции гомеостаза глюкозы и липидов в печени [55]. Масляная кислота (бутират) является ключевым источником энергии для эпителиальных и иммунных клеток толстого кишечника [56, 57], повышает экспрессию белков плотных контактов, способствуя поддержанию целостности кишечного барьера [56], и обладает выраженным противовоспалительным эффектом [58].

Для определения взаимосвязи между микробиотой кишечника и состоянием здоровья необходимо обладать надежными количественными методами

определения концентраций метаболитов в различных биологических матрицах, таких как плазма и сыворотка крови, моча, а также фекалии. В современных исследованиях используются подходы, основанные на технике капиллярного электрофореза (КЭ), ядерного магнитного резонанса (ЯМР), жидкостной и газовой хроматографии, соединенных с масс-спектрометрией (ЖХ-МС и ГХ-МС) [59–64]. Методы масс-спектрометрии считаются наиболее предпочтительными для количественного анализа низкомолекулярных соединений благодаря их высокой чувствительности и специфичности [59, 60, 63–66]. Однако применение этих методов к анализу КЦЖК в фекалиях сопряжено с определенными трудностями. Во-первых, высокий уровень содержания липидов в фекалиях снижает эффективность экстракции водорастворимых соединений. Во-вторых, летучие и частично гидрофильные свойства КЦЖК значительно усложняют их анализ методом ЖХ-МС, который требует многоступенчатой пробоподготовки, включая этапы экстракции и дериватизации [67]. Это не только усложняет и удлиняет анализ, но и повышает техническую вариабельность [68]. ГХ-МС является надежным методом количественного определения низкомолекулярных соединений [64, 69, 70]. Благодаря летучей природе КЦЖК их анализ методом ГХ-МС может быть выполнен без дериватизации, если используются хроматографические колонки с высокополярными фазами и особые условия жидкостно-жидкостной экстракции [59, 69].

Что касается анализа фекальных образцов новорожденных, то точность и воспроизводимость количественных исследований могут быть снижены по сравнению с анализом образцов, полученных от взрослых. Это связано с высокой вариабельностью содержания воды, сложностью нормирования массы образца, использованием подгузников и стимуляторов дефекации в ОРИТН, а также с ограниченным объемом доступного биологического материала.

Сравнительная характеристика наиболее часто используемых аналитических методов для определения КЦЖК в фекалиях приведена в табл. 2. Показаны основные подходы, применяемые в клинических и исследовательских условиях, с акцентом на их применимость к анализу фекальных образцов новорожденных. Особое внимание удалено таким параметрам, как чувствительность, специфичность, требования к пробоподготовке и потенциальные ограничения каждого метода. Учитывая летучую природу КЦЖК, ГХ-МС при правильной настройке может представлять собой оптимальный выбор, несмотря на требования к подготовке образца.

Таблица 2. Сравнительная характеристика методов количественного определения КЦЖК в фекалиях

Метод анализа	Принцип	Преимущества	Ограничения
Капиллярный электрофорез [61]	Разделение ионов в электрическом поле в капилляре	- Простота метода - Низкий расход реагентов - Возможность одновременного анализа нескольких соединений	- Низкая чувствительность - Требуется высокая степень очистки образца
ЯМР-спектроскопия [62]	Регистрирует магнитные свойства ядер атомов	- Неразрушающий метод - Одновременный анализ многих метаболитов - Не требует дериватизации	- Низкая чувствительность - Высокая стоимость оборудования
ЖХ-МС [60, 63, 65, 66]	Разделение соединений в жидкой фазе с последующим ионным анализом	- Высокая чувствительность и специфичность - Широкий диапазон определяемых КЦЖК - Возможность изотопного нормирования	- Многоступенчатая пробоподготовка - Необходима дериватизация и/или использование внутренних стандартов - Трудности с летучими соединениями
ГХ-МС [59, 62, 64, 69, 71]	Разделение летучих соединений в газовой фазе и их масс-спектрометрический анализ	- Высокая точность и чувствительность - Подходит для анализа летучих КЦЖК - Возможность анализа без дериватизации (при оптимальных условиях)	- Длительная пробоподготовка - Необходима дериватизация для нелетучих соединений - Варьирующая воспроизводимость при анализе фекалий новорожденных

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ КЦЖК

Ключевой функцией КЦЖК является обеспечение энергией клеток кишечника, включая колоноциты и клетки иммунной системы, что способствует активации их метаболизма, пролиферации и дифференцировки [72, 73]. Масляная кислота (бутират), один из ключевых представителей КЦЖК, устраниет дефицит митохондриального дыхания и предотвращает аутофагию в безмикробных колоноцитах, испытывающих дефицит энергии [74].

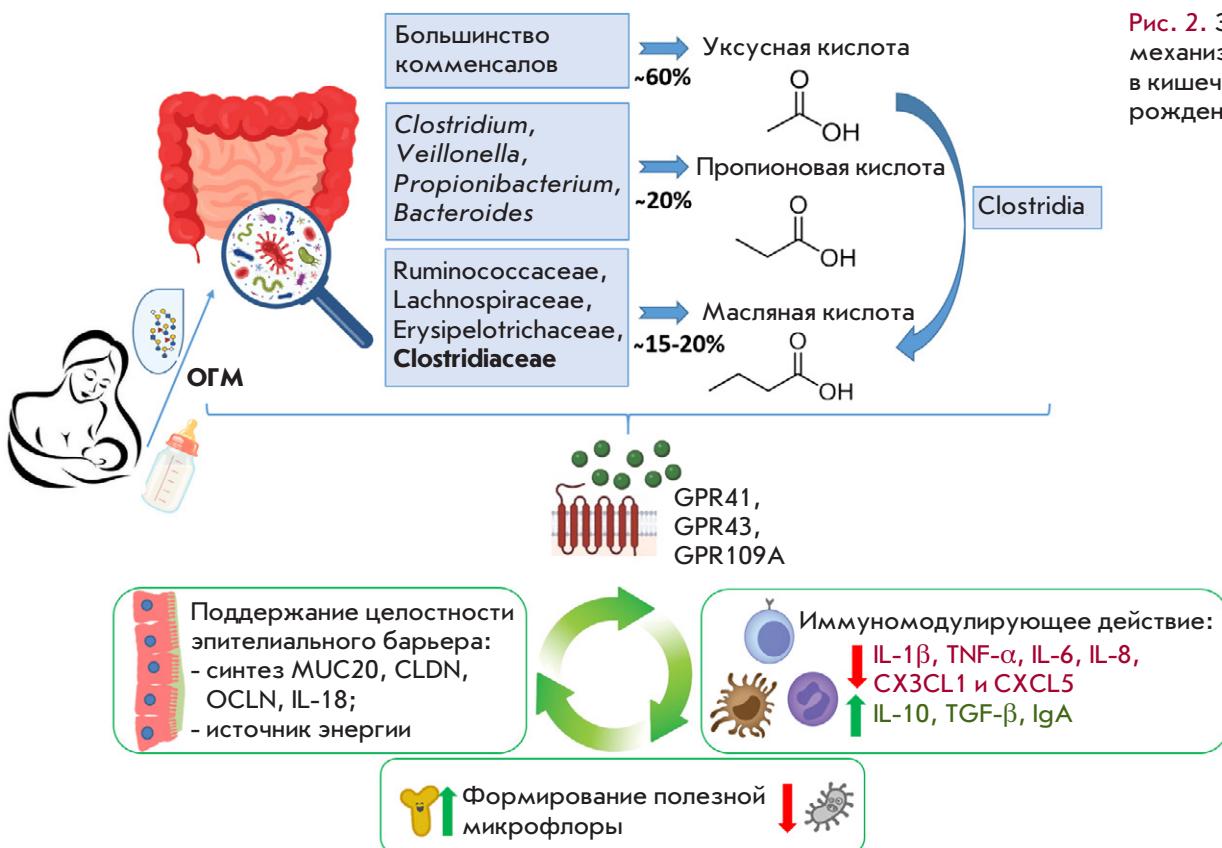
КЦЖК играют решающую роль в поддержании целостности кишечного барьера, препятствуя развитию синдрома повышенной кишечной проницаемости, известного как «дырявый кишечник». Этот синдром облегчает бактериальную транслокацию, усиливает воспалительные процессы и может стать причиной системных осложнений [75]. Добавление бутирата к эпителиальным клеткам нейроглиомы (Н4) и включение его в рацион питания мышей увеличивает локальное потребление кислорода, что стабилизирует фактор, индуцируемый гипоксией (HIF). В результате активируется транскрипция генов, участвующих в синтезе ключевых компонентов плотных контактов, таких как муцин (MUC20), клаудины (CLDN2, 4, 11 и 15) и окклюдин (OCLN) [76]. Эти изменения способствуют укреплению межклеточных контактов и предотвращают проникновение патогенов через кишечный барьер.

КЦЖК играют ключевую роль в регуляции иммунного ответа в кишечнике, что делает их важными медиаторами взаимодействия между микробиотой и иммунной системой [45]. Бутират стимулирует синтез колоноцитами противовоспалительного цито-

кина IL-18, который не только способствует продукции муцина, но и активирует синтез антимикробных пептидов, таких как дефензины и кателицидины, активные против широкого спектра патогенов [77]. Одновременно бактериальный метаболит подавляет индуцированную IL-1 экспрессию провоспалительных генов, включая IL-6, CX3CL1 и CXCL5, что позволяет контролировать состав микробиоты и предотвращать развитие дисбиоза [78, 79].

Будучи лигандами рецепторов, связанных с G-белком (GPR43/FFAR2, GPR41/FFAR3), КЦЖК влияют на активацию и дифференцировку клеток как врожденного, так и адаптивного иммунитета [58, 80]. Бутират направляет дифференцировку макрофагов к M2-иммуносупрессивному фенотипу, который участвует в подавлении воспалительных процессов и поддержании тканевого гомеостаза [81]. Уксусная кислота снижает воспаление кишечника за счет активации рецептора GPR43/FFAR2 гранулоцитов, способствуя уменьшению их воспалительной активности [82].

КЦЖК влияют на уровень экспрессии генов в иммунных клетках посредством эпигенетических механизмов. Например, бутират и пропионат ингибируют гистон-деацетилазы (HDAC), что способствует деконденсации хроматина и активации транскрипции генов, ответственных за иммунорегуляцию [72, 83]. Бутират направляет дифференцировку Т-клеток в Foxp3+ регуляторные Т-клетки (Treg) через ингибирование HDAC [84]. Treg играют центральную роль в подавлении чрезмерного иммунного ответа на комменсалльные микроорганизмы и в предотвращении развития хронического вос-



паления. Более того, активация рецепторов GPR43 и GPR109A на дендритных клетках под действием бутират способствует дифференцировке Treg через индукцию синтеза противовоспалительного цитокина IL-10 [85].

КЦЖК также влияют на функцию В-клеток. Исследования Kim M. и соавт. (2016) продемонстрировали, что КЦЖК, особенно ацетат, напрямую стимулируют дифференцировку В-клеток в IgA-продуцирующие клетки [86]. Секреция иммуноглобулина A (IgA) обеспечивает защиту слизистой оболочки кишечника, предотвращая избыточный рост патогенных микроорганизмов и защищая комменсальные [86].

КЦЖК ингибируют рост и колонизацию патогенной микрофлоры кишечника, включая микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, такие как *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* [87]. Они изменяют внутриклеточный уровень pH у патогенов, что создает неблагоприятные условия для их выживания. Это происходит благодаря способности КЦЖК проникать в неионизированной форме внутрь бактериальной клетки, где они диссоциируют, снижая внутриклеточный pH и нарушая метаболические процессы в клетках патогенов [88].

В колоноцитах бутират активирует рецептор-гамма, активируемый пролифераторами пероксисом-

гамма (PPAR γ), который играет важную роль в регуляции метabolизма жирных кислот. Активация PPAR γ индуцирует β -окисление и увеличивает потребление кислорода колоноцитами, что снижает доступность кислорода в просвете кишечника. Такое изменение кислородной среды ограничивает рост аэробных патогенных микроорганизмов, особенно входящих в семейство Enterobacteriaceae, которые нуждаются в кислороде для пролиферации [89].

Таким образом, КЦЖК, особенно масляная кислота, выступают не только универсальными энергетическими субстратами для клеток кишечника, но и мощными регуляторами местного иммунитета, барьерной функции и микробного гомеостаза (рис. 2). Эффекты КЦЖК особенно важны для глубоко недоношенных детей, у которых из-за незрелости кишечного барьера и иммунной системы повышен риск колонизации патогенными микроорганизмами. Это делает данные метаболиты ключевыми компонентами в предотвращении и лечении таких состояний, как НЭК.

КЦЖК В ПАТОГЕНЕЗЕ НЭК

Дисбиоз кишечника признан одним из ключевых факторов патогенеза НЭК [90]. Многочисленные исследования, проведенные на модельных организмах, подтверждают значимость микробиоты и ее мета-

Таблица 3. Особенности микробиома кишечника и КЦЖК при НЭК у недоношенных новорожденных

Ссылка	Клинические группы	Гестационный возраст, недели	Сутки реализации НЭК	Преобладающие микроорганизмы, тип и доля (%), контроль vs НЭК	КЦЖК, направление изменения и кратность
Liu X.C. и соавт., 2022 [30]	НЭК за 7.0 ± 7.6 дней ($n = 17$) и при манифестиации ($n = 12$)	30.5 ± 2.1	30.2 ± 15.9	Proteobacteria ↑ (с 40 до 53%) Firmicutes ↓ (с 55 до 35%) Actinobacteriota ↑ (с 5 до 10%) Bacteroidota ↑ (с 0.5 до 4%)	*Уксусная 1.8↓ **Пропионовая 1.2↓ **Масляная 1.1↓ **Изовалериановая 2.3↓ *КЦЖК 2.4↓
	Контроль ($n = 17$)	30.5 ± 1.9	-		
He Y. и соавт., 2021 [15]	НЭК ($n = 81$)	31.0 (29.4–33.7)	15 (12–19)	***Proteobacteria ↑ (с 27 до 55%) ***Firmicutes ↓ (с 57 до 37%) ***Actinobacteriota ↓ (с 4 до 1%) ***Bacteroidota ↓ (с 10 до 3%)	**Масляная 1.4↓
	Контроль ($n = 81$)	31.1 (29.3–33.2)	-		
Xiong J., 2022 [98]	НЭК ($n = 22$)	35.5 ± 2.2	11.6 (6.8–16.0)	Proteobacteria ↓ (с 50 до 37%) Firmicutes ↑ (с 45 до 57%) *Actinobacteriota ↑ (с 3 до 5%) **Bacteroidota ↓ (с 4 до 1%)	**Уксусная 1.5↓ **Пропионовая 2.3↓ **Масляная 2.7↓ **Изовалериановая 2.0↓ **Капроновая 2.7↑ **КЦЖК 1.6↓
	FPIAP ($n = 21$)	36.5 ± 1.4	15.2 (11.0–22.0)		
Casaburi G. и соавт., 2023 [100]	НЭК ($n = 3$)	~29	-	Proteobacteria ↑	*Муравьиная 6.7↑
	Контроль ($n = 10$)	~29	-		
	НЭК, лечение ($n = 3$)	~29	через 3 недели лечения	Proteobacteria ↓ Bacteroidetes ↑ по сравнению с дебютом НЭК	-
Huang H., 2022 [99]	НЭК ($n = 9$)	31.6 (28.35–37.45)		Proteobacteria ↑ (с 30 до 65%) Firmicutes ↓ (с 65 до 30%) Actinobacteriota ↓ (с 5 до 1%) Bacteroidota ↑ (с 0 до 5%)	Не проводилось
	Контроль ($n = 10$)	37.75 (32.03–39.05)			
Pourcyroux M. и соавт., 2014 [101]	Смесь ($n = 9$)	27	-	Не проводилось	**КЦЖК 1.9↑ **Ацетат 3.1↑ **Пропионат 3.4↑
	Сцеженное молоко ($n = 10$)	27	-		

Примечание. Жирным выделены изменения более чем в 2 раза уровней фекальных КЦЖК в группе НЭК по сравнению с группой контроля. * – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ – при парном сравнении группы НЭК и контроля или группы сравнения.

болитов в развитии данного заболевания [91, 92]. В частности, колонизация безмикробных мышей бактериями, выделенными из фекалий пациентов с НЭК, провоцирует НЭК-подобные повреждения кишечника [15].

Дисбиоз кишечника приводит к нарушению синтеза КЦЖК, что особенно актуально для глубоко недоношенных детей [93], минимальный уровень КЦЖК при рождении у которых постепенно увеличивается с постконцептуальным возрастом при отсутствии НЭК [94–97]. Однако метаболизм КЦЖК у глубоко недоношенных новорожденных остается малоизученным.

Клинические исследования микробиоты кишечника и продуцируемых КЦЖК у глубоко недоношенных новорожденных с НЭК остаются весьма

немногочисленными. В работах 2021–2023 гг. (табл. 3) [15, 30, 98–100] результаты 16S рРНК- секвенирования подтвердили данные о доминировании в микробиоте незрелого кишечника протеобактерий, ассоциируемых с развитием НЭК [27–29, 31]. Одновременно выявлено выраженное снижение численности представителей типа Firmicutes, включающего основные штаммы-продуценты бутиратата, еще до манифестации клинических симптомов заболевания [30].

У новорожденных с НЭК обнаружено достоверное снижение уровней КЦЖК ($p < 0.05$), особенно муравьиной, пропионовой, масляной, изовалериановой и капроновой [15, 30, 98, 100]. Примечательно, что у глубоко недоношенных детей, получавших сцеженное грудное молоко, концентрация КЦЖК

в кале оказалась достоверно выше, чем у детей на искусственном вскармливании [101]. Хотя прямая причинно-следственная связь между уровнем КЦЖК и развитием НЭК требует дальнейшего изучения, полученные данные указывают на потенциальную протективную роль этих метаболитов в поддержании целостности кишечного барьера и модуляции воспалительного ответа.

Однако результаты исследований выявляют значительную вариабельность в абсолютных концентрациях КЦЖК. Например, в работе Liu X.C. и соавт. (2022) средний уровень бутиратта в кале детей контрольной группы составил 41 мкг/г [30], в исследовании He Y. и соавт. (2021) этот показатель достигал 225 мкг/г [15]. Подобные расхождения могут быть обусловлены различиями в применяемых аналитических методах, характеристиках когорт и протоколах сбора и хранения биоматериала.

Обзоры Alsharairi N.A. и соавт. (2023), а также Cifuentes M.P. и соавт. (2024) указывают, что роль бутиратта в развитии неонатального НЭК остается неоднозначной [93, 102]. Однако детальный анализ клинических работ (табл. 3) демонстрирует выраженное снижение уровня бутиратта в кале глубоко недоношенных новорожденных за неделю до появления клинических симптомов НЭК и при дебюте заболевания, что подтверждает его потенциальную диагностическую ценность [15, 30]. У взрослых масляная кислота также ассоциируется с уменьшением риска развития воспалительных заболеваний кишечника, таких как язвенный колит и болезнь Крона [103, 104]. Экспериментальные исследования подчеркивают, что бутират способствует укреплению барьерной функции эпителиальных клеток кишечника и снижает воспалительные реакции иммунных клеток.

В то же время в ряде модельных экспериментов была выявлена негативная роль бутиратта при НЭК [92, 105–108]. Неполное переваривание углеводов в тонком кишечнике приводит к их ферментации в толстом кишечнике с образованием КЦЖК, лактата и газов, таких как углекислый газ, метан и водород [109]. У недоношенных поросят, моделирующих НЭК, избыточное образование бактериальных метаболитов вследствие высокого уровня непереваренной лактозы может запускать воспалительную реакцию [108].

Противоречивые эффекты бутиратта могут быть объяснены его дозозависимым действием, впервые описанным Lin и соавт. (2002) [106]. Более поздние исследования подтвердили, что высокие концентрации бутиратта (более 16 мМ) стимулируют синтез провоспалительного цитокина IL-6, в то время как низкие дозы оказывают защитное действие,

снижая экспрессию IL-6 и NF- κ B, усиливая синтез белка плотных контактов клаудина-7 [57, 110]. На модели НЭК у новорожденных мышей показано, что существует оптимальный уровень масляной кислоты, при котором риск развития НЭК минимизируется [111].

Трудности сопоставления данных, полученных в разных исследованиях, обусловлены разнообразием применяемых методов анализа, небольшим размером выборки глубоко недоношенных новорожденных и вариативностью экспериментальных моделей НЭК. Проведение многоцентровых рандомизированных исследований с унифицированным подходом к сбору биоматериала и анализу микробиологических и метаболических данных может помочь в уточнении роли КЦЖК в патогенезе НЭК, а также в определении оптимальных терапевтических доз этих метаболитов. Вместе с тем, использование ГХ-МС для определения концентраций КЦЖК в фекалиях представляет собой точный, неинвазивный, быстрый и экономически эффективный метод, который можно легко внедрить в рутинную неонатальную практику для ранней диагностики и мониторинга метаболической активности кишечной микрофлоры у глубоко недоношенных новорожденных [102].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование симбиотической экосистемы кишечника является ключевым процессом, необходимым для успешной адаптации новорожденного ребенка. Малый гестационный возраст при рождении, врожденная физиологическая незрелость кишечника, высокая частота родоразрешения путем кесарева сечения, длительная госпитализация с пребыванием в микроокружении отделения интенсивной терапии, антибактериальная терапия, отсутствие контакта с материнской микрофлорой, а также отсутствие или недостаток поступления материнского молока являются ключевыми факторами, способствующими формированию дисбиотической микробной сигнатуры. Микробиом кишечника глубоко недоношенных новорожденных характеризуется преобладанием грамотрицательных бактерий типа *Proteobacteria*, снижением микробного разнообразия и общей нестабильностью. Исследования связывают подобные изменения с повышенным риском жизнеугрожающих состояний, таких как НЭК.

Современные данные подчеркивают важность метаболитов микробиоты, таких как КЦЖК, в поддержании метаболического и иммунного гомеостаза кишечника. Однако большая часть данных получена с использованием мышиных моделей и клеточных линий. Кроме того, все больше данных свидетель-

ствует о том, что метаболизм КЦЖК находится в динамическом равновесии, и отклонения в любую сторону – как избыточно высокие, так и низкие уровни – могут негативно сказываться на здоровье.

Для более глубокого понимания роли КЦЖК и микробиома в патогенезе НЭК необходимы многоцентровые исследования, способные охватить достаточное количество случаев редких заболеваний. Интеграция мультиомиксных подходов, таких как метагеномное секвенирование, транскриптомика и таргетная метаболомика, необходима для определения специфических микробных сообществ и метаболических биомаркеров, включая КЦЖК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Neu J, Mshvildadze M, Mai V. A roadmap for understanding and preventing necrotizing enterocolitis. *Current Gastroenterology Reports*. 2008;10(5):450–457. doi: 10.1007/s11894-008-0084-x
2. Ahearn-Ford S, Berrington JE, Stewart CJ. Development of the gut microbiome in early life. *Experimental Physiology*. 2022;107(5):415–421. doi: 10.1113/EP089919
3. Thänert R, Sawhney SS, Schwartz DJ, Dantas G. The resistance within: Antibiotic disruption of the gut microbiome and resistome dynamics in infancy. *Cell Host and Microbe*. 2022;30(5):675–683. doi: 10.1016/j.chom.2022.03.013
4. Reichardt N, Duncan SH, Young P, et al. Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME Journal*. 2014;8(6):1323–1335. doi: 10.1038/ismej.2014.14
5. Scheiman J, Luber JM, Chavkin TA, et al. Meta'omic analysis of elite athletes identifies a performance-enhancing microbe that functions via lactate metabolism. *Nature Medicine*. 2019;25(7):1104–1109. doi: 10.1038/s41591-019-0485-4. Meta
6. Nikitina IV, Lenyushkina AA, Krogh-Jensen OA, et al. Recurrent necrotizing enterocolitis: predictors, biological markers, diagnostic signs, and therapeutic approaches – a year-long case study. *Neonatology: News, Opinions, Training*. 2024;12(3):66–77. doi: 10.33029/2308-2402-2024-12-3-66-77
7. Jones IH, Hall NJ. Contemporary Outcomes for Infants with Necrotizing Enterocolitis—A Systematic Review. *Journal of Pediatrics*. 2020;220:86–92.e3. doi: 10.1016/j.jpeds.2019.11.011
8. Scheese DJ, Sodhi CP, Hackam DJ. New insights into the pathogenesis of necrotizing enterocolitis and the dawn of potential therapeutics. *Seminars in Pediatric Surgery*. 2023;32(3):151309. doi: 10.1016/j.semepedsurg.2023.151309
9. Zhou Q, Niño DF, Yamaguchi Y, et al. Necrotizing enterocolitis induces T lymphocyte-mediated injury in the developing mammalian brain. *Science Translational Medicine*. 2021;13(575):1–30. doi: 10.1126/SCITRANSLMED.AAY6621
10. Fullerton BS, Hong CR, Velazco CS, et al. Severe neurodevelopmental disability and healthcare needs among survivors of medical and surgical necrotizing enterocolitis: A prospective cohort study. *Journal of Pediatric Surgery*. 2018;53(1):101–107. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2017.10.029
11. Pupyshcheva AF, Savelyeva EI, Piskunova VV, et al. Fecal Calprotectin Levels Dynamics in Newborns with High-Risk of Necrotizing Enterocolitis. *Pediatric Pharmacology*. 2023;20(1):51–55. doi: 10.15690/pfv20i1.2529
12. Thakkar HS, Lakhou K. Necrotizing enterocolitis. *Surgery (United Kingdom)*. 2022;40(11):713–716. doi: 10.1016/j.mp-
- sur.2022.09.007
13. Hsu CY, Khachatrian LG, Younis NK, et al. Microbiota-derived short chain fatty acids in pediatric health and diseases: from gut development to neuroprotection. *Frontiers in Microbiology*. 2024;15(October):1456793. doi: 10.3389/fmicb.2024.1456793
14. Facchin S, Bertin L, Bonazzi E, et al. Short-Chain Fatty Acids and Human Health: From Metabolic Pathways to Current Therapeutic Implications. *Life*. 2024;14(5):1–44. doi: 10.3390/life14050559
15. He Y, Du W, Xiao S, et al. Colonization of fecal microbiota from patients with neonatal necrotizing enterocolitis exacerbates intestinal injury in germfree mice subjected to necrotizing enterocolitis-induction protocol via alterations in butyrate and regulatory T cells. *Journal of Translational Medicine*. 2021;19(1):510. doi: 10.1186/s12967-021-03109-5
16. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell Host and Microbe*. 2015;17(5):690–703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004
17. Cuna A, Morowitz MJ, Ahmed I, Umar S, Sampath V. Dynamics of the preterm gut microbiome in health and disease. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2021;320(4):G411–G419. doi: 10.1152/AJPGI.00399.2020
18. Yao Y, Cai X, Ye Y, Wang F, Chen F, Zheng C. The Role of Microbiota in Infant Health: From Early Life to Adulthood. *Frontiers in Immunology*. 2021;12(October):708472. doi: 10.3389/fimmu.2021.708472
19. Olm MR, Brown CT, Brooks B, et al. Identical bacterial populations colonize premature infant gut, skin, & oral microbiomes & exhibit different in situ growth rates. *Genome Research*. 2017;27(4):601–612. doi: 10.1101/gr.213256.116
20. Gibson MK, Wang B, Ahmadi S, et al. Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome. *Nature Microbiology*. 2016;1:16024. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.24. Developmental
21. Gasparri AJ, Wang B, Sun X, et al. Metagenomic signatures of early life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome persist long after discharge. *Nature Microbiology*. 2016;4(12):2285–2297. doi: 10.1038/s41564-019-0550-2. Metagenomic
22. Wandro S, Osborne S, Enriquez C, Bixby C, Arrieta A, Whiteson K. The Microbiome and Metabolome of Preterm Infant Stool Are Personalized and Not Driven by Health Outcomes, Including Necrotizing Enterocolitis and Late-Onset Sepsis. *mSphere*. 2018;3(3):e00104–18. doi: 10.1128/mSphere.3.3.e00104-18

Разработка быстрых и неинвазивных методов функционального профилирования микробиома для применения в клинических условиях позволит создать систему оценки риска развития НЭК у глубоко недоношенных новорожденных. Ассоциация микробных метаболитов с патологиями у новорожденных открывает возможности для создания комплексных проприетарных формул. ●

*Исследование выполнено за счет гранта Российской научного фонда (№ 24-25-00068):
<https://rscf.ru/project/24-25-00068/>.*

- msphere.00104-18
23. Young GR, Van Der Gast CJ, Smith DL, Berrington JE, Embleton ND, Lanyon C. Acquisition and Development of the Extremely Preterm Infant Microbiota Across Multiple Anatomical Sites. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2020;70(1):12-19. doi: 10.1097/MPG.0000000000002549
 24. Patel AL, Mutlu EA, Sun Y, et al. Longitudinal Survey of Microbiota in Hospitalized Preterm Very Low Birth Weight Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016;62(2):292-303. doi: 10.1097/MPG.0000000000000913.Longitudinal
 25. Stewart CJ, Embleton ND, Marrs ECL, et al. Temporal bacterial and metabolic development of the preterm gut reveals specific signatures in health and disease. *Microbiome*. 2016;4(1):67. doi: 10.1186/s40168-016-0216-8
 26. Unger S, Stintzi A, Shah P, Mack D, O'Connor DL. Gut microbiota of the very-low-birth-weight infant. *Pediatric Research*. 2015;77(1):205-213. doi: 10.1038/pr.2014.162
 27. Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, et al. 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *Isme*. 2009;3(8):944-954. doi: 10.1038/ismej.2009.37.16S
 28. Lemme-Dumit JM, Song Y, Lwin HW, et al. Altered Gut Microbiome and Fecal Immune Phenotype in Early Preterm Infants With Leaky Gut. *Frontiers in Immunology*. 2022;13(February):815046. doi: 10.3389/fimmu.2022.815046
 29. Torrazza RM, Ukhanova M, Wang X, et al. Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. *PLoS One*. 2013;8(12):e83304. doi: 10.1371/journal.pone.0083304
 30. Liu XC, Du TT, Gao X, et al. Gut microbiota and short-chain fatty acids may be new biomarkers for predicting neonatal necrotizing enterocolitis: A pilot study. *Frontiers in Microbiology*. 2022;13(August):969656. doi: 10.3389/fmicb.2022.969656
 31. Warner PBB, Deych E, Zhou Y, et al. Gut bacteria dysbiosis and necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: a prospective case-control study. *Lancet*. 2017;387(10031):1928-1936. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00081-7.Gut
 32. Morrow AL, Lagomarcino AJ, Schibler KR, et al. Early microbial and metabolomic signatures predict later onset of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome*. 2013;1(1):13. doi: 10.1186/2049-2618-1-13
 33. Olm MR, Bhattacharya N, Crits-Christoph A, et al. Necrotizing enterocolitis is preceded by increased gut bacterial replication, Klebsiella, and fimbriae-encoding bacteria. *Science Advances*. 2019;5(12):eaax5727. doi: 10.1126/sciadv.aax5727
 34. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in Immunology*. 2007;19(2):70-83. doi: 10.1016/j.smim.2007.04.002
 35. Mih B, Good M. Impact of Toll-like receptor 4 signaling in necrotizing enterocolitis: The state of the science. *Clinics in Perinatology*. 2019;46(1):145-157. doi: 10.1177/0022146515594631. Marriage
 36. Healy DB, Ryan CA, Ross RP, Stanton C, Dempsey EM. Clinical implications of preterm infant gut microbiome development. *Nature Microbiology*. 2022;7(January):22-33. doi: 10.1038/s41564-021-01025-4 Clinical
 37. Nikitina IV, Donnikov AE, Krogh-Jensen OA, et al. Genetic predictors of necrotizing enterocolitis in neonates. *Obstetrics and Gynecology*. 2020;12(12):150-158. doi: 10.18565/aig.2020.12.150-158
 38. Krogh-Jensen OA, Nikitina IV, Bragina ON, et al. Body surface cultures in preterm neonates on the first day of life: clinical usefulness. *Obstetrics and Gynecology* 2023;(8):108-123. doi: 10.18565/aig.2022.8.108-123
 39. Gupta S, Mortensen MS, Schjørring S, et al. Amplicon sequencing provides more accurate microbiome information in healthy children compared to culturing. *Communications Biology*. 2019;2:291. doi: 10.1038/s42003-019-0540-1
 40. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *Journal of Biotechnology*. 2017;243:16-24. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.12.022
 41. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tse H, Yuen KY. Then and now: Use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14(10):908-934. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02070.x
 42. Sher Y, Olm MR, Raveh-Sadka T, et al. Combined analysis of microbial metagenomic and metatranscriptomic sequencing data to assess *in situ* physiological conditions in the premature infant gut. *PLoS One*. 2020;15(3):e0229537. doi: 10.1371/journal.pone.0229537
 43. Wishart DS, Oler E, Peters H, et al. MiMeDB: the Human Microbial Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*. 2023;51(1 D):D611-D620. doi: 10.1093/nar/gkac868
 44. Liu M, Lu Y, Xue G, et al. Role of short-chain fatty acids in host physiology. *Animal Models and Experimental Medicine*. 2024;(June):641-652. doi: 10.1002/ame.212464
 45. Takeuchi T, Nakanishi Y, Ohno H. Microbial Metabolites and Gut Immunology. *Annual review of immunology*. 2024;42(1):153-178. doi: 10.1146/annurev-immunol-090222-102035
 46. Martin-Gallausiaux C, Marinelli L, Blottière HM, Larraufie P, Lapaque N. SCFA: Mechanisms and functional importance in the gut. *Proceedings of the Nutrition Society*. 2021;80(1):37-49. doi: 10.1017/S0029665120006916
 47. den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*. 2013;54(9):2325-2340. doi: 10.1194/jlr.R036012
 48. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*. 2016;7(3):189-200. doi: 10.1080/19490976.2015.1134082
 49. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. In: *Advances in Immunology*. Vol 121. 1st ed. Elsevier Inc.; 2014:91-119. doi: 10.1016/B978-0-12-800100-4.00003-9
 50. Barcenilla A, Pryde SE, Martin JC, et al. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(4):1654-1661. doi: 10.1128/AEM.66.4.1654-1661.2000
 51. Louis P, Young P, Holtrop G, Flint HJ. Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA:acetate CoA-transferase gene. *Environmental Microbiology*. 2010;12(2):304-314. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02066.x
 52. Turroni F, Milani C, Duranti S, Mahony J, van Sinderen D, Ventura M. Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. *Trends in Microbiology*. 2018;26(4):339-350. doi: 10.1016/j.tim.2017.10.001
 53. Liu L, Fu C, Li F. Acetate affects the process of lipid metabolism in rabbit liver, skeletal muscle and adipose tissue. *Animals*. 2019;9(10):799. doi: 10.3390/ani9100799

54. Ma J, Liu Z, Gao X, et al. Gut microbiota remodeling improves natural aging-related disorders through Akkermansia muciniphila and its derived acetic acid. *Pharmacological Research*. 2023;189(February):106687. doi: 10.1016/j.phrs.2023.106687
55. Langfeld LQ, Du K, Bereswill S, Heimesaat MM. A review of the antimicrobial and immune-modulatory properties of the gut microbiota-derived short chain fatty acid propionate - What is new? *European Journal of Microbiology and Immunology*. 2021;11(2):50-56. doi: 10.1556/1886.2021.00005
56. Rivière A, Selak M, Lantin D, Leroy F, De Vuyst L. Bifidobacteria and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(JUN):979. doi: 10.3389/fmicb.2016.00979
57. Liu J, Zhu H, Li B, et al. Beneficial effects of butyrate in intestinal injury. *Journal of Pediatric Surgery*. 2020;55(6):1088-1093. doi: 10.1016/j.jpedsurg.2020.02.036
58. Liu P, Wang Y, Yang G, et al. The role of short-chain fatty acids in intestinal barrier function, inflammation, oxidative stress, and colonic carcinogenesis. *Pharmacological Research*. 2021;165(September 2020):105420. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105420
59. Yao L, Davidson EA, Shaikh MW, Forsyth CB, Prenni JE, Broeckling CD. Quantitative analysis of short-chain fatty acids in human plasma and serum by GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2022;414(15):4391-4399. doi: 10.1007/s00216-021-03785-8
60. Saha S, Day-Walsh P, Shehata E, Kroon PA. Development and validation of a lc-ms/ms technique for the analysis of short chain fatty acids in tissues and biological fluids without derivatisation using isotope labelled internal standards. *Molecules*. 2021;26(21):6444. doi: 10.3390/molecules26216444
61. Garcia A, Olmo B, Lopez-Gonzalvez A, Cornejo L, Rupérez FJ, Barbas C. Capillary electrophoresis for short chain organic acids in faeces. Reference values in a Mediterranean elderly population. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;46(2):356-361. doi: 10.1016/j.jpba.2007.10.026
62. Cai J, Zhang J, Tian Y, et al. Orthogonal Comparison of GC-MS and 1 H NMR Spectroscopy for Short Chain Fatty Acid Quantitation. *Analytical Chemistry*. 2017;89(15):7900-7906. doi: 10.1002/hep.30150.Ductular
63. Zheng J, Zheng SJ, Cai WJ, Yu L, Yuan BF, Feng YQ. Stable isotope labeling combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for comprehensive analysis of short-chain fatty acids. *Analytica Chimica Acta*. 2019;1070:51-59. doi: 10.1016/j.aca.2019.04.021
64. Hoving LR, Heijink M, van Harmelen V, van Dijk KW, Giera M. GC-MS analysis of short-chain fatty acids in feces, cecum content, and blood samples. *Methods in Molecular Biology*. 2018;1730:247-256. doi: 10.1007/978-1-4939-7592-1_17
65. Dei Cas M, Paroni R, Saccardo A, et al. A straightforward LC-MS/MS analysis to study serum profile of short and medium chain fatty acids. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2020;1154:1-12. doi: 10.1016/j.jchromb.2020.121982
66. Trivedi N, Erickson HE, Bala V, Chhonker YS, Murry DJ. A Concise Review of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry-Based Quantification Methods for Short Chain Fatty Acids as Endogenous Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(21):13486. doi: 10.3390/ijms232113486
67. Primec M, Mičetić-Turk D, Langerholc T. Analysis of short-chain fatty acids in human feces: A scoping review. *Analytical Biochemistry*. 2017;526:9-21. doi: 10.1016/j.ab.2017.03.007
68. Tumanov S, Bulusu V, Gottlieb E, Kamphorst JJ. A rapid method for quantifying free and bound acetate based on alkylation and GC-MS analysis. *Cancer & Metabolism*. 2016;4(1):17. doi: 10.1186/s40170-016-0157-5
69. Kim KS, Lee Y, Chae W, Cho JY. An Improved Method to Quantify Short-Chain Fatty Acids in Biological Samples Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Metabolites*. 2022;12(6):4-15. doi: 10.3390/metabo12060525
70. Zhang C, Tang P, Xu H, Weng Y, Tang Q, Zhao H. Analysis of Short-Chain Fatty Acids in Fecal Samples by Headspace-Gas Chromatography. *Chromatographia*. 2018;81(9):1317-1323. doi: 10.1007/s10337-018-3572-7
71. Kukaev E, Kirillova E, Tokareva A, et al. Impact of Gut Microbiota and SCFAs in the Pathogenesis of PCOS and the Effect of Metformin Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024;25(19):10636. doi: 10.3390/ijms251910636
72. Luu M, Visekruna A. Short-chain fatty acids: Bacterial messengers modulating the immunometabolism of T cells. *European Journal of Immunology*. 2019;49(6):842-848. doi: 10.1002/eji.201848009
73. Moffett JR, Puthillathu N, Vengilote R, Jaworski DM, Namboodiri AM. Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics and Oncogenesis—Part 1: Acetyl-CoA, Acetogenesis and Acyl-CoA Short-Chain Synthetases. *Frontiers in Physiology*. 2020;11(November):580167. doi: 10.3389/fphys.2020.580167
74. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg Effect Dictates the Mechanism of Butyrate Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Molecular Cell*. 2012;48(4):611-626. doi: 10.1016/j.molcel.2012.08.033.The
75. Baldassarre ME, Di Mauro A, Capozza M, et al. Dysbiosis and prematurity: Is there a role for probiotics? *Nutrients*. 2019;11(6):1273. doi: 10.3390/nu11061273
76. Zhao J, Hu J, Ma X. Sodium caprylate improves intestinal mucosal barrier function and antioxidant capacity by altering gut microbial metabolism. *Food and Function*. 2021;12(20):9750-9762. doi: 10.1039/d1fo01975a
77. Levy M, Thaiss CA, Zeevi D, et al. Microbiota-modulated metabolites shape the intestinal microenvironment by regulating NLRP6 inflammasome signaling. *Cell*. 2015;163(6):1428-1443. doi: 10.1002/hep.30150.Ductular
78. Tian P, Yang W, Guo X, et al. Early life gut microbiota sustains liver-resident natural killer cells maturation via the butyrate-IL-18 axis. *Nature Communications*. 2023;14(1):1710. doi: 10.1038/s41467-023-37419-7
79. Beisner J, Filipe Rosa L, Kaden-Volynets V, Stolzer I, Günther C, Bischoff SC. Prebiotic Inulin and Sodium Butyrate Attenuate Obesity-Induced Intestinal Barrier Dysfunction by Induction of Antimicrobial Peptides. *Frontiers in Immunology*. 2021;12(June):678360. doi: 10.3389/fimmu.2021.678360
80. van der Hee B, Wells JM. Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids. *Trends in Microbiology*. 2021;29(8):700-712. doi: 10.1016/j.tim.2021.02.001
81. Schulthess J, Pandey S, Capitani M, et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity*. 2019;50(2):432-445.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2018.12.018
82. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and

- chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-1286. doi: 10.1038/nature08530
83. Thomas SP, Denu JM. Short-chain fatty acids activate acetyltransferase p300. *eLife*. 2021;10:e72171. doi: 10.7554/eLife.72171
84. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature*. 2013;504(7480):446-450. doi: 10.1038/nature12721
85. Sun M, Wu W, Chen L, et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids promote Th1 cell IL-10 production to maintain intestinal homeostasis. *Nature Communications*. 2018;9(1):3555. doi: 10.1038/s41467-018-05901-2
86. Kim M, Qie Y, Park J, Kim CH. Gut Microbial Metabolites Fuel Host Antibody Responses. *Cell Host and Microbe*. 2016;20(2):202-214. doi: 10.1016/j.chom.2016.07.001
87. Kumar M, Singh P, Murugesan S, et al. Microbiome as an Immunological Modifier. *Methods in Molecular Biology*. 2020;2055(1):595-638. doi: 10.1007/978-1-4939-9773-2
88. Sorbara MT, Dubin K, Littmann ER, et al. Inhibiting antibiotic-resistant Enterobacteriaceae by microbiota-mediated intracellular acidification. *Journal of Experimental Medicine*. 2019;216(1):84-98. doi: 10.1084/jem.20181639
89. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, et al. Microbiota-activated PPAR- γ signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science*. 2017;357(6351):570-575. doi: 10.1126/science.aam9949
90. Fundora JB, Guha P, Shores DR, Pammi M, Maheshwari A. Intestinal dysbiosis and necrotizing enterocolitis: assessment for causality using Bradford Hill criteria. *Pediatric Research*. 2020;87(2):235-248. doi: 10.1038/s41390-019-0482-9
91. Jilling T, Simon D, Lu J, et al. The Roles of Bacteria and TLR4 in Rat and Murine Models of Necrotizing Enterocolitis. *Journal of Immunology*. 2006;177(5):3273-3282. doi: 10.4049/jimmunol.177.5.3273
92. Waligora-Dupriet AJ, Dugay A, Auzeil N, Huerre M, Butel MJ. Evidence for clostridial implication in necrotizing enterocolitis through bacterial fermentation in a gnotobiotic quail model. *Pediatric Research*. 2005;58(4):629-635. doi: 10.1203/01.PDR.0000180538.13142.84
93. Alsharairi NA. Therapeutic Potential of Gut Microbiota and Its Metabolite Short-Chain Fatty Acids in Neonatal Necrotizing Enterocolitis. *Life*. 2023;13(2):561. doi: 10.3390/life13020561
94. Athalye-Jape G, Esvaran M, Patole S, et al. Effect of single versus multistrain probiotic in extremely preterm infants: A randomised trial. *BMJ Open Gastroenterology*. 2022;9(1):e000811. doi: 10.1136/bmjgast-2021-000811
95. Neumann CJ, Mahnert A, Kumpitsch C, et al. Clinical NEC prevention practices drive different microbiome profiles and functional responses in the preterm intestine. *Nature Communications*. 2023;14(1):1349. doi: 10.1038/s41467-023-36825-1
96. Frau A, Lett L, Slater R, et al. The stool volatile metabolome of pre-term babies. *Molecules*. 2021;26(11):3341. doi: 10.3390/molecules26113341
97. Wang C, Shoji H, Sato H, et al. Effects of oral administration of *Bifidobacterium breve* on fecal lactic acid and short-chain fatty acids in low birth weight infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2007;44(2):252-257. doi: 10.1097/01.mpg.0000252184.89922.5f
98. Xiong J, Liao XS, Yin T, Liu XC, Bao L, Li LQ. Alterations of the gut microbiota and short chain fatty acids in necrotizing enterocolitis and food protein-
- induced allergic protocolitis infants: A prospective cohort study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2022;12(November):1030588. doi: 10.3389/fcimb.2022.1030588
99. Huang H, Peng Q, Zhang Y, et al. Abnormalities in microbial composition and function in infants with necrotizing enterocolitis: A single-center observational study. *Frontiers in Pediatrics*. 2022;10(October):963345. doi: 10.3389/fped.2022.963345
100. Casaburi G, Wei J, Kazi S, et al. Metabolic model of necrotizing enterocolitis in the premature newborn gut resulting from enteric dysbiosis. *Frontiers in Pediatrics*. 2022;10(August):893059. doi: 10.3389/fped.2022.893059
101. Pourcyrous M, Nolan VG, Goodwin A, Davis SL, Buddington RK. Fecal short-chain fatty acids of very-low-birth-weight preterm infants fed expressed breast milk or formula. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2014;59(6):725-731. doi: 10.1097/MPG.00000000000000515
102. Cifuentes MP, Chapman JA, Stewart CJ. Gut microbiome derived short chain fatty acids: Promising strategies in necrotising enterocolitis. *Current Research in Microbial Sciences*. 2024;6(January):100219. doi: 10.1016/j.crmcr.2024.100219
103. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(34):13780-13785. doi: 10.1073/pnas.0706625104
104. Sokol H, Seksik P, Furet JP, et al. Low counts of *faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory Bowel Diseases*. 2009;15(8):1183-1189. doi: 10.1002/ibd.20903
105. Waligora-Dupriet AJ, Dugay A, Auzeil N, et al. Short-chain fatty acids and polyamines in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis: Kinetics aspects in gnotobiotic quails. *Anaerobe*. 2009;15(4):138-144. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.02.001
106. Lin J, Nafday SM, Chauvin SN, et al. Variable effects of short chain fatty acids and lactic acid in inducing intestinal mucosal injury in newborn rats. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2002;35(4):545-550. doi: 10.1097/00005176-200210000-00016
107. Nafday SM, Chen W, Peng L, Babyatsky MW, Holzman IR, Lin J. Short-chain fatty acids induce colonic mucosal injury in rats with various postnatal ages. *Pediatric Research*. 2005;57(2):201-204. doi: 10.1203/01.PDR.0000150721.83224.89
108. Thymann T, Møller HK, Stoll B, et al. Carbohydrate maldigestion induces necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2009;297(6):1115-1125. doi: 10.1152/ajpgi.00261.2009
109. Kien CL. Digestion, absorption, and fermentation of carbohydrates in the newborn. *Clinics in Perinatology*. 1996;23(2):211-228. doi: 10.1016/s0095-5108(18)30239-2
110. Peng L, He Z, Chen W, Holzman IR, Lin J. Effects of butyrate on intestinal barrier function in a caco-2 cell monolayer model of intestinal barrier. *Pediatric Research*. 2007;61(1):37-41. doi: 10.1203/01.pdr.0000250014.92242.f3
111. Vieira ELM, Leonel AJ, Sad AP, et al. Oral administration of sodium butyrate attenuates inflammation and mucosal lesion in experimental acute ulcerative colitis. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2012;23(5):430-436. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.01.007