

Биологические свойства некоторых низкомолекулярных ароматических микробных метаболитов, ассоциированных с сепсисом

Н. В. БЕЛОБОРОДОВА, А. А. ОСИПОВ, А. Ю. БЕДОВА

НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН, Москва

Biological Properties of Some Sepsis-Associated Low Molecular Aromatic Microbial Metabolites

N. V. BELOBORODOVA, A. A. OSIPOV, A. YU. BEDOVA

V. A. Negovsky Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

В обзоре обобщены и проанализированы физико-химические и биологические свойства низкомолекулярных ароматических соединений, ассоциированных с сепсисом. Показано, что такие фенилкарбоновые кислоты (ФКК), как пара-гидроксифенилмолочная (п-ГФМК), фенилмолочная (ФМК), пара-гидроксифенилуксусная (п-ГФУК), фенилуксусная (ФУК), бензойная (БК) и фенилпропионовая (ФПК), обладают биорегуляторной активностью и способны влиять как на бактерии, так и на эукариотические клетки. В обзоре приведены данные о диагностической и патогенетической значимости ФКК, обобщены сведения о микростатических и микробицидных свойствах ФКК, биосинтезе ФКК клинически значимыми видами бактерий, описаны механизмы устойчивости микроорганизмов к ФКК, пути метаболизма ФКК прокариотами, мембранный транспорт и пути выведения ФКК из организма человека, а также приведены данные по применению ФКК в клинической практике. Авторы рассматривают ФКК микробного происхождения в качестве участников метаболических и сигнальных путей в процессе интеграции микробиома и человека. На основании данных литературы и результатов собственных исследований авторы обосновывают гипотезу о возможности создания новых лечебных стратегий, основанных на регуляции локального и системного баланса ароматических микробных метаболитов в организме человека.

Ключевые слова: низкомолекулярные фенольные соединения, ароматические микробные метаболиты, метаболический профиль, бензойная кислота, фенилкарбоновые кислоты, микробиом, монокарбоксилатные транспортёры, сепсис, клиническая микроэкология.

Physico-chemical and biological properties of sepsis-associated low molecular aromatic compounds are summarized and analysed in the review. Phenylcarboxylic acids (PCAs), such as para-hydroxyphenyllactic acid (p-HPLA), phenyllactic acid (PLA), para-hydroxyphenylacetic (p-HPAA), phenylacetic acid (PAA), benzoic acid (BA), and phenylpropionic acid (PPA) are shown to have bioregulatory activity and be able to affect both bacteria and eukaryotic cells. In the review there are presented data on the diagnostic and pathogenetic value of PCAs, their bacteriostatic and bacteriocidal properties and biosynthesis by clinically significant bacterial species, as well as description of the mechanisms of microbial resistance to PCAs, the pathways of PCAs metabolism by prokaryotes, PCAs membrane transport and excretion pathways in humans, the data on the use of PCAs in clinical practice. The authors are of the opinion that PCAs of microbial origin share the metabolic and signal pathways in integration of the microbiome and man. On the basis of the literature data and personal studies the authors validated the hypothesis of possible development of new therapeutic strategies, grounded on regulation of the local and systemic balance of aromatic microbial metabolites in the human body.

Key words: low molecular phenol compounds, aromatic microbial metabolites, metabolic profile, benzoic acid, phenylcarboxylic acids, microbiome, monocarboxylate transporters, sepsis, clinical microecology.

Введение

В процессе эволюции сформировалась устойчивая биологическая связь между микро- и макроорганизмами. В то же время в медицинских исследованиях её мало учитывают, традиционно изучение и описание биохимических и сигналь-

ных процессов, происходящих в организме человека и населяющей его микробиоте, проводится отдельно. По всей видимости, это связано с инертностью системы образования и репликации представления о разобщении биохимических регуляторных путей про- и эукариотов, не учитывающего явления коэволюции.

Мы придерживаемся точки зрения, что прогресс в медицине сегодня невозможен без познания законов жизнедеятельности микробиоты че-

© Коллектив авторов, 2013

Адрес для корреспонденции: 107031, Москва, ул. Петровка, 25, стр. 2. НИИ общей реаниматологии им. В. А. Неговского РАМН

ловека, её связи с метаболизмом человека, без открытия общих сигнальных путей, обеспечивающих участие микробных метаболитов в патогенезе как инфекционных, так и неинфекционных (онкологических, психических, эндокринных и др.) заболеваний, т. е. без развития нового медицинского научного направления — **клиническая микроэкология**.

Наиболее остро дефицит знаний по клинической микроэкологии ощущается в анестезиологии и реаниматологии. Сепсис остается одной из главных непосредственных причин смерти человека в реаниматологических отделениях, несмотря на наличие многокомпонентного мониторинга, использование мощных противомикробных препаратов и высокотехнологичных органозамещающих технологий [1-5]. Изучение ароматических микробных метаболитов и их роли в танатогенезе интенсивно ведется в Лаборатории метаболизма критических состояний (МКС) НИИ «Общей реаниматологии им. В. А. Неговского» РАМН [6].

Известно, что в сообществе микроорганизмов простые химические соединения выступают в роли биорегуляторов и сигнальных молекул, представляя собой наиболее архаичный механизм ауторегуляции и межклеточной коммуникации — «quorum sensing» [7]. В ходе эволюционного процесса низкомолекулярные соединения сохранили важную роль в организме человека: достаточно назвать некоторые гормоны (эндогенные катехоламины, гормоны щитовидной железы), нейротрансмиттеры (серотонин, γ -аминомасляная кислота), аутокринные регуляторы тканевого и митохондриального метаболизма (NO) и т. д.

Простые химические соединения могут выполнять важную связующую роль во взаимодействии метаболизма человека и бактерий. Появились экспериментальные работы по изучению адреналина и родственных ему катехоламинов в качестве веществ, ответственных за коммуникацию между бактериями и за их взаимодействие с клетками высших животных [8, 9]. Опубликованы результаты первых исследований профиля экзометаболитов живых микроорганизмов непосредственно в сыворотке крови здоровых и больных людей [6, 10, 11]. Работы по изучению микробных метаболитов в биосредах человека являются наиболее перспективными для изучения влияния микроэкологических нарушений, проявляющихся прежде всего дисбалансом экзометаболитов, на организм человека.

Фенилкарбоновые кислоты при сепсисе

Ранее было показано, что при сепсисе в сыворотке крови среди изученных различных классов

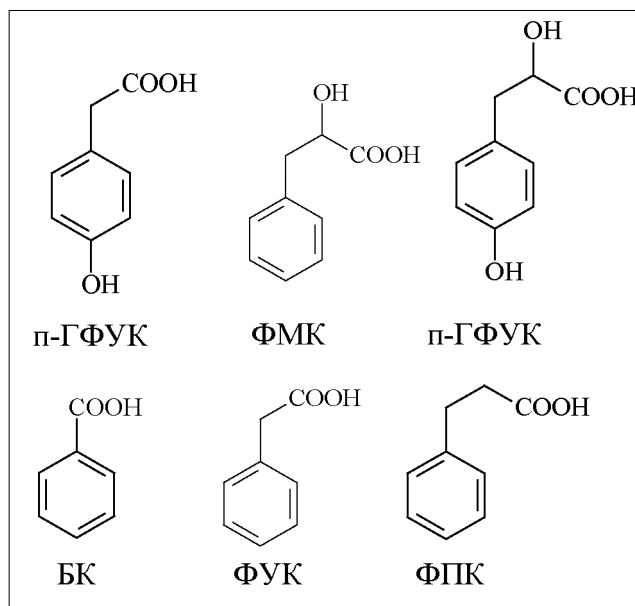


Рис. 1. Фенилкарбоновые кислоты, ассоциированные с сепсисом [12, 13].

низкомолекулярных веществ наибольшие изменения характерны для ароматических соединений — фенилкарбоновых кислот (ФКК), а именно пара-гидроксифенилмолочной (п-ГФМК), фенилмолочной (ФМК), пара-гидроксифенилуксусной (п-ГФУК), фенилуксусной (ФУК), бензойной (БК) и фенилпропионовой (ФПК) кислот (рис. 1) [12, 13]. Исследуемые вещества одного класса соединений в зависимости от наличия или отсутствия гидроксигруппы делятся на две подгруппы — гидроксированные и негидроксированные ФКК [14].

Показано, что тяжесть состояния больных коррелирует с суммарной концентрацией ФКК в сыворотке крови [10]. В прикладном плане предложено использовать количественное определение некоторых ФКК для диагностики сепсиса (патент на изобретение № 2423704 RU), однако чрезвычайно интересным является дальнейшее изучение и понимание механизмов участия этих экзометаболитов микробного происхождения в жизнедеятельности организма человека [14-17].

В качестве модели для теоретического анализа многообразия биологических свойств исследуемых ФКК в данном обзоре выбрана бензойная кислота (БК), сведения о которой наиболее полно представлены в литературе.

Бензойная кислота

Физико-химические свойства. Бензойная кислота (CAS No. 65-85-0; C_6H_5COOH , молекулярный вес 122.13) в чистом виде представляет собой бесцветные или белые кристаллы с температурой плавления 122°C и кипения 249°C. Плохо раство-

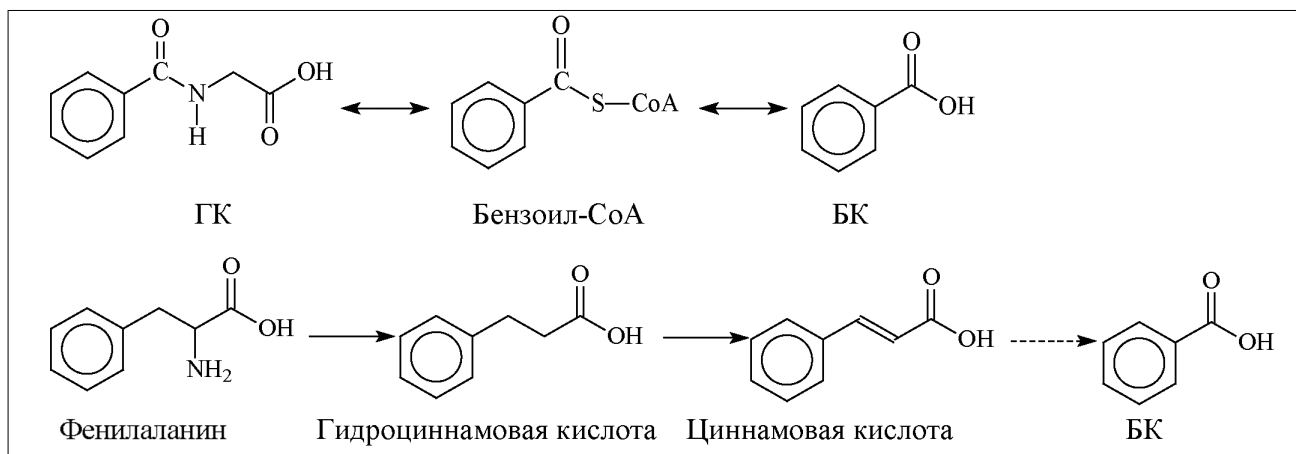


Рис. 2. Источники образования БК в кисломолочных продуктах [15, 19].

рима в воде (2,9 г растворяется в 1 л воды при 20°C). Для обнаружения бензойной кислоты и её солей в настоящее время используют спектрофотометрические методы, газовую и жидкостную хроматографию [18].

Природные источники БК и содержание её в продуктах питания. БК способны синтезировать бактерии, растения и грибы. Значительное содержание БК обнаружено в кисломолочных продуктах в результате её образования лактобактериями из глутаминовой кислоты (ГК) и биodeградации фенилаланина (рис. 2) [15, 18, 19].

В йогурте содержание БК 9 — 56 мг/кг, а в разных сортах сыра достигает 200 мг/кг и более [15]. Естественное содержание БК обнаружено в таких продуктах питания, как томаты, бобовые, злаковые, орехи, фрукты, мёд, грибы [18, 20, 21]. Высокие концентрации БК обнаружили во многих ягодах — до 0,05% их веса. Например, такие северные ягоды, как клюква и черника, содержат 300—1300 мг/кг БК [18], по другим данным — свыше 4500 мг/кг [22]. Своими антисептическими свойствами в традиционной медицине известна бензойная смола, получаемая из деревьев рода Стиракс (лат. *Styrax*). Известно, что образование БК резко усиливается в растениях в ответ на инфекцию [18, 23]. Из растительных низкомолекулярных ФКК лучше всего изучена салициловая кислота (орто-гидроксibenзойная кислота). Было показано, что она влияет на экспрессию генов митохондриальных белков, а её содержание изменяется однонаправленно с концентрацией БК [24]. У грибов БК образуется в результате биохимической деградации фенилаланина [25]. У животных первоначально БК обнаружили у травоядных, в том числе в молоке, где она находится в свободном и связанном состоянии в виде ГК [18, 19]. В ходе поиска информации о БК, включая анализ данных Human Metabolome Database (HMDB; www.hmdb.ca), не было найдено сведений о том, что в организме человека БК способна

образовываться в ходе биохимической деградации фенилаланина или синтезироваться *de novo* из алифатических соединений. Однако БК у человека может образовываться в результате окисления бензальдегида (содержится в продуктах питания), бензилового спирта (содержится в целом ряде лекарственных препаратов) [26, 27], продуктов окисления полифенолов [28, 29]. В работе F.Кноор [30] впервые показано, что при скормлировании животным фенилзамещённых жирных кислот в результате β -окисления боковых цепей ФКК с нечётным количеством атомов углерода (например, фенилпропионовой и фенилвалериановой кислот) образуется БК, а в результате β -окисления боковых цепей ФКК с чётным количеством атомов углерода (фенилмасляная, фенилкапроновая кислоты) образуется ФУК [30]. БК обнаружена в более высокой концентрации, по сравнению с другими ФКК, в фекалиях — 6,2 мг/л [31] и в сыворотке крови здоровых добровольцев — 0,079 мг/л [6, 10]. Присутствие БК в биологических средах человека в основном можно объяснить поступлением её с пищей и как результат образования микрофлорой желудочно-кишечного тракта, в том числе — в результате окисления полифенолов [28, 30]. На рис. 3 представлены пути образования некоторых ФКК в организме человека за счёт собственного и бактериального метаболизма фенилаланина и тирозина [14]. Однако возможна и обратная ситуация, когда бактерии используют ФКК, например п-ГФУК и п-ГФПК в качестве предшественников для синтеза фенилаланина, тирозина и триптофана [32].

Известно, что в результате тесного сосуществования в ходе эволюции высшие организмы утрачивают способность к образованию ряда метаболитов. Пример этого можно наблюдать на рис. 3 в отношении катаболизма ароматических аминокислот — образование циннамовой, гидроксициннамовой, фенилпропионовой и гидроксифе-

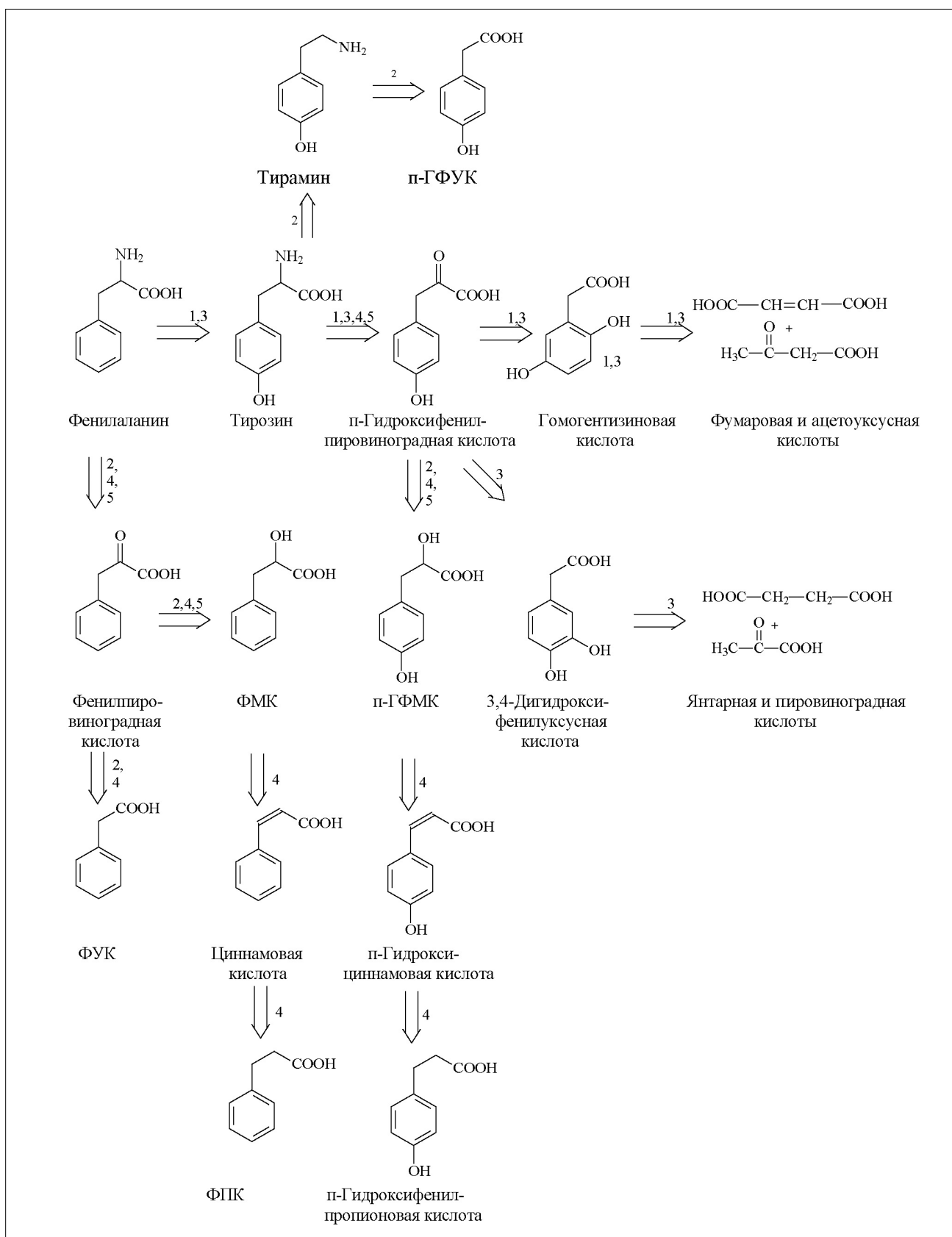


Рис. 3. Взаимосвязь эндогенного и микробного путей катаболизма фенилаланина и тирозина в организме человека [14].

1 — основной эндогенный путь; 2 — альтернативный эндогенный путь; 3 — аэробный микробный путь; 4 — анаэробный микробный путь; 5 — катаболизм факультативными анаэробами в аэробных условиях.

Таблица 1. Минимальная подавляющая концентрация БК для некоторых видов бактерий и грибов, мг/л

Микроорганизмы	рН	МПК, мг/л
<i>Escherichia coli</i> [108]	6,0	100—200
<i>Lactobacillus</i> spp. [15]	4,3—6,0	300—1800
<i>Klebsiella pneumoniae</i> [108]	6,0	100—200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [109]	5,0/7,0	250/1000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [108]	6,0	200—500
<i>Staphylococcus aureus</i> [109]	5,0/7,0	500/1000
<i>Staphylococcus aureus</i> [108]	6,0	50—100
<i>Streptococcus</i> spp. [15]	5,2—5,6	200—400
<i>Candida albicans</i> [109]	5,0/7,0	130/>1000
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> [108]	4,8	4500
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> [109]	4,0	1200

нилпропионовой кислот происходит только анаэробным микробным путём.

Микростатические и микробицидные свойства. БК и её соли обладают природными антисептическими свойствами и широко используются в пищевой и косметической промышленности в качестве консервантов (Е210–Е213) [15, 18, 23]. Соли БК лучше растворяются в воде, чем сама БК, поэтому они находят более широкое применение. Например, растворимость бензоата натрия (CAS No. 532-32-1; C_6H_5COONa , молекулярный вес 144,1) в воде 550 г/л при 20°C [18]. Кальциевая и калиевая соли также используются, но их растворимость в воде ниже, чем у натриевой соли. В соответствии с СанПиН 2.3.2.1293-03 «Гигиенические требования по применению пищевых добавок» (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 18 апреля 2003 г.) максимально допустимый уровень БК и её солей по отдельности или в любой комбинации в пересчёте на БК для разных продуктов питания колеблется от 150 до 2000 мг/кг (см. выше естественное содержание БК в продуктах питания). В табл. 1 приведена минимальная подавляющая концентрация (МПК) БК для некоторых видов бактерий и грибов.

В эксперименте на поросятах было показано, что БК оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие на микрофлору верхних отделов желудочно-кишечного тракта [33]. В микробиологических исследованиях по изучению влияния фенильных кислот на рост чистых культур клинически значимых штаммов микроорганизмов было установлено, что БК наряду с ФУК и ФПК в наибольшей степени подавляют размножение *E.coli*, при этом штамм *E.coli* ATCC 25992 (непатогенный штамм) более устойчив к влиянию БК и других ФКК, чем *E.coli* O157:H7 (CEST 5947, энтеропатогенный штамм). Установлено также, что ФКК с одной и двумя гидроксигруппами (3-гидрокси-, 4-гидрокси-, 3,4-дигидроксизамещённые ФКК) в ароматическом кольце в концентрации ≤ 1000 мг/л не влияли на размножение *E.coli* ATCC 25992 и в гораздо меньшей степени оказывали влияние на энтеропатогенный штамм. Напротив, по отношению к лактобактериям авторы отмечают иную

закономерность: 4-гидрокси- и 3-гидроксibenзойная кислоты сильнее подавляли размножение лактобактерий, чем сама БК. На другого представителя грамположительных бактерий БК и её гидроксипроизводные оказывали аналогичный эффект. По отношению к лактобактериям и *S.aureus* ФУК и ФПК остаются более сильными консервантами, чем их гидроксипроизводные. При изучении грам(-) бактерий авторы отмечают устойчивость штамма *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 к БК и другим ФКК в концентрации 1000 мг/л. По отношению к грибам БК и ФПК лишь частично (на 16 и 29% соответственно) подавляют рост *Candida albicans* MY1055 в концентрации 1000 мг/л. Авторы работы предполагают, что чувствительность микроорганизмов к разным ФКК зависит от особенностей строения клеточной стенки [34]. Важно отметить, что все исследуемые авторами ФКК подавляли размножение микроорганизмов в концентрациях одного порядка, что согласно теории слабых органических кислот (см. ниже), говорит об их одинаковом механизме действия.

Существует мнение, что БК участвует в таком природном явлении, как аллелопатия — свойство одних организмов выделять химические соединения, которые тормозят или подавляют развитие других [35]. Данное предположение может быть справедливо и для других ФКК. Мы разделяем точку зрения о том, что ФКК в естественных условиях участвуют в регуляции состава и ростовой активности микробиоты человека [34].

В работе А. М. Jenner и соавт. [31] показано, что в фекальных промывных водах содержится значительное количество разнообразных ФКК, среди которых доминировали ФУК 479 мкМ, ФПК 166 мкМ, п-ГФПК 68 мкМ, 3,4-дигидроксициннамовая кислота 52 мкМ; БК 51 мкМ, 3-гидроксибензилуксусная кислота 46 мкМ; п-ГФУК 19 мкМ и 3,4-дигидроксибензилуксусная кислота 7 мкМ. Обращает на себя внимание, что при динамическом наблюдении за профилем ФКК в кишечнике у одного и того же добровольца концентрации БК были наиболее стабильны по сравнению с другими соединениями, колеблясь в пределах 23—25 мкМ изо дня в день [31].

Таблица 2. Значения МПК бензойной, молочной и уксусной кислот в отношении некоторых бактерий, мг/л [110]

Микроорганизм	Бензойная кислота	Уксусная кислота	Молочная кислота
<i>B.cereus</i> ATCC11778	296	2020	3480
<i>B.subtilis</i> ATCC6633	192	105	8320
<i>E.coli</i> ATCC25922	316	1550	3720
<i>L.fermentum</i> ATCC14931	2500	26300	25300
<i>L.plantarum</i> EH22G	2610	27500	30700

Таблица 3. Зависимость МПК, МБК и МФК бензойной кислоты и бензоата натрия (в мг/л) в отношении различных микроорганизмов от pH среды [109]

Компоненты	<i>S.aureus</i> NCTC 4163		<i>P.aeruginosa</i> NCTC 6749		<i>B.subtilis</i> NCTC 10400		<i>C.albicans</i> ATCC 10231	
	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7	pH 5	pH 7
Бензойная кислота								
МПК	500	1000	250	1000	130	1000	130	>1000
МБК/ МФК	500	1000	250	>1000	130	1000	250	>1000
Бензоат натрия								
МПК	390	6250	1560	25000	190	6250	12500	25000
МБК/ МФК	>50000	>50000	6250	25000	390	50000	25000	>50000

Результаты наших исследований подтвердили способность чистых культур анаэробов микробиоты человека продуцировать ФКК [36], причём их состав совпадает с данными А. М. Jenner и соавт. [31]. Важно отметить, что количественное содержание некоторых ФКК в культуре анаэробов может достигать значений, известных как подавляющие размножение микробов. Так, уже в суточной культуре *Lactobacillus fermentum* содержалось ФПК 155,7 мг/л (1036,8 мкМ), п-ГФПК — 123,2 мг/л (795,6 мкМ) и т. д. К сожалению, в работе А. М. Jenner и соавт. не приведены данные по содержанию в фекальных промывных водах п-ГФМК и ФМК. По данным литературы и нашим собственным данным, ФМК и п-ГФМК продуцируются при культивировании *in vitro* анаэробных грамположительных бактерий [36–39]. Например, в суточной культуре *Bifidobacterium bifidum* и *Lactobacillus fermentum* основными ФКК были: ФМК — 64,9 мг/л (390 мкМ) и 35,4 мг/л (213 мкМ) соответственно и п-ГФМК — 39,4 мг/л (216,28 мкМ) и 13,7 мг/л (72,3 мкМ) соответственно [36]. В работе F. Valerio [39] также обнаружена способность лактобактерий продуцировать ФМК и п-ГФМК, в частности в 72-часовой культуре 5 штаммов *Lactobacillus plantarum* содержалось ФМК 310 ± 19 мкМ и ГФМК 260 ± 13 мкМ, в то время как использованные в их работе штаммы *L.fermentum* продуцировали незначительное количество ФМК и неопределённо малое количество п-ГФМК [39]. С. L. Gerez и соавт. [37] приводят данные, что супернатант 24-часовой культуры лактобактерий содержал ФМК 200–3500 мкМ [37]. Доказано, что ФМК и п-ГФМК так же, как и другие анализируемые нами ФКК, обладают свойствами консерванта и способны ингибировать размножение бактерий и грибов в концентрации от 500 мг/л, при этом более чувствительными

к ФМК и п-ГФМК оказываются плесневые грибы и грамположительные бактерии [38, 40, 41].

Теория слабых органических кислот применительно к ФКК. В ранних исследованиях БК было установлено, что её противомикробные свойства максимально проявляются в кислой среде, а в среде, близкой к нейтральной, эти свойства заметно слабее [42, 43]. Наряду с БК в качестве консервантов пищевых продуктов широко используют молочную (E270), уксусную (E260), пропионовую (E280), сорбиновую (E200) кислоты. Все они являются слабыми кислотами, в частности значение pK_a БК составляет 4,21, т. е. при pH 7 доля недиссоциированных молекул БК составляет 0,144%, а при pH 3 уже 93,5% [15, 42]. В табл. 2 приведены МПК для БК, молочной и уксусной кислот в отношении некоторых бактерий.

Для объяснения антимикробных свойств БК и других низкомолекулярных органических кислот была предложена «теория слабых органических кислот» [23]. Согласно этой теории, при низких значениях pH в растворе возрастает содержание недиссоциированных молекул БК, которые за счёт своих липофильных свойств способны проникать через плазматическую мембрану клеток. Значение pH внутри клеток близко к нейтральному. После проникновения внутрь клетки молекулы БК диссоциируют с высвобождением H^+ , что приводит к закислению внутриклеточной среды и нарушению функций клетки.

Тот же механизм проникновения рассматривают для других слабых органических кислот [17, 44]. В табл. 3 приведены данные о зависимости минимальной подавляющей (МПК), минимальной бактерицидной (МБК) и минимальной фунгицидной (МФК) концентрации БК и бензоата натрия от pH среды.

Влияние БК на клеточный метаболизм. В научных целях для исследования механизмов влияния БК на эукариотическую клетку чаще всего используют пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), так как данный вид обладает природной повышенной устойчивостью к БК и не способен её утилизировать в качестве источника углерода [45]. Добавление БК к культуре *Saccharomyces cerevisiae* приводит к снижению скорости образования клеточной биомассы на фоне увеличенного потребления кислорода и глюкозы. Цитологическое исследование показало, что пропорционально росту потребления кислорода под влиянием БК происходит увеличение внутриклеточного объёма, занимаемого митохондриями. При достижении порогового значения концентрации БК потребление кислорода снижается и ускоряется процесс ферментативного образования этанола [46]. Возрастные потребление кислорода и микростатический эффект БК объясняют увеличением расхода АТФ на удаление из клетки бензоата и протонов с целью поддержания нормального значения внутриклеточного рН [47, 48]. БК является осмотически активным веществом и её накопление внутри клетки, помимо закисления внутриклеточной среды, может вызвать набухание клетки. При быстром возрастании концентрации БК в питательной среде после кратковременного пика потребления кислорода развивается длительная депрессия потребления кислорода, а также снижение потребления глюкозы, что связывают с ингибированием ферментов цикла Кребса и гликолиза, в частности фосфофруктокиназы [15, 46, 49, 50]. Известно также, что БК вызывает деполяризацию клеточной мембраны и влияет на мембранный транспорт [35].

Ранее нами на культуре митохондрий крыс было показано, что БК в концентрации 0,1 мМ значительно снижает мембранный потенциал, снижает кальциевую ёмкость митохондрий, ингибирует процесс дыхания (I комплекс дыхательной цепи) и подавляет окисление пирувата, предположительно из-за ингибирования пируватдегидрогеназы. Эти эффекты бензоата, расцененные нами как токсические, в эксперименте снимались менадином и дитиотреитолом, что указывает на окисление тиоловых групп [51, 36]. Также нами было обнаружено, что БК и ряд других ФКК подавляют выработку активных форм кислорода (АФК) в нейтрофилах, что, по всей видимости, проявляется в нарушении фагоцитарной активности [36]. Эти данные согласуются с результатами других работ [52, 53].

Из литературы известно также, что бензоат натрия в концентрации 0,5–2 мМ значительно подавляет выработку клетками микроглии под влиянием липополисахарида (ЛПС) ряда цитокинов (TNF- α , IL-1 β), NF- κ B и индуцибельной NO синтазы (iNOS). При этом для реализации эф-

фектов бензоата натрия важное значение имела длительность предшествующей инкубации микроглиальных клеток с бензоатом натрия — то есть время контакта до внесения в культуральную среду ЛПС [54]. В работе из Испании исследователи выявили, что два других метаболита бактерий — 3,4-дигидроксифенилпропионовая и 3,4-дигидроксифенилуксусная кислоты также в значительной степени подавляют продукцию провоспалительных цитокинов (TNF- α , IL-1b и IL-6) в мононуклеарных клетках [55].

Показано, что добавление бензоата натрия к культуре клеток микроглии подавляет экспрессию поверхностных CD-маркёров и главного комплекса гистосовместимости класса II (МНС II). Аналогичные данные были получены при изучении влияния бензоата натрия на астроциты человека [54].

В эксперименте на гомогенизатах печени крыс было установлено, что бензоат натрия в концентрации 0,5–2 мМ существенно подавляет окисление жирных кислот, а при инъекции бензоата натрия крысам в дозировке 5–10 ммоль/кг (1220–2440 мг/кг) в образцах печени животных отмечалось значимое снижение концентрации АТФ, CoA, ацетил-CoA и повышение аммиака [56].

Внутриклеточное значения рН и мембранный транспорт БК. Поддержание постоянства внутриклеточного значения рН в изменяющихся условиях внешней среды является одной из важнейших функций клетки, необходимой для её выживания.

В работе J. Lin и соавт. было показано, что одним из механизмов устойчивости к БК является механизм глутаматиндуцированной резистентности бактерий к кислой среде, в то время как аргининзависимый механизм устойчивости *E.coli* к закислению среды оказывается менее эффективным [57]. Данные механизмы изучены недостаточно, но в эксперименте с *E.coli* было обнаружено, что добавление в питательную среду БК вызывает усиление экспрессии более 30 белков [58].

Удаление протонов из внутриклеточного пространства у *Saccharomyces cerevisiae* происходит посредством мембранной H⁺-АТФазы (Pma1). В случае добавления в питательную среду БК происходит интенсификация этого процесса [47]. *Saccharomyces cerevisiae*, в отличие от *Zygosaccharomyces bailii*, не способны метаболизировать анионы БК, поэтому они удаляются из клетки посредством мембранных переносчиков. Индукцию образования транспортёра Pdr12p считают одним из ключевых механизмов адаптации *Saccharomyces cerevisiae* к БК, при этом удаление бензоата из клетки осуществляется путём активного транспорта [48].

Мембранный переносчик Pdr12p относится к суперсемейству ABC-транспортёров (ATP-bind-

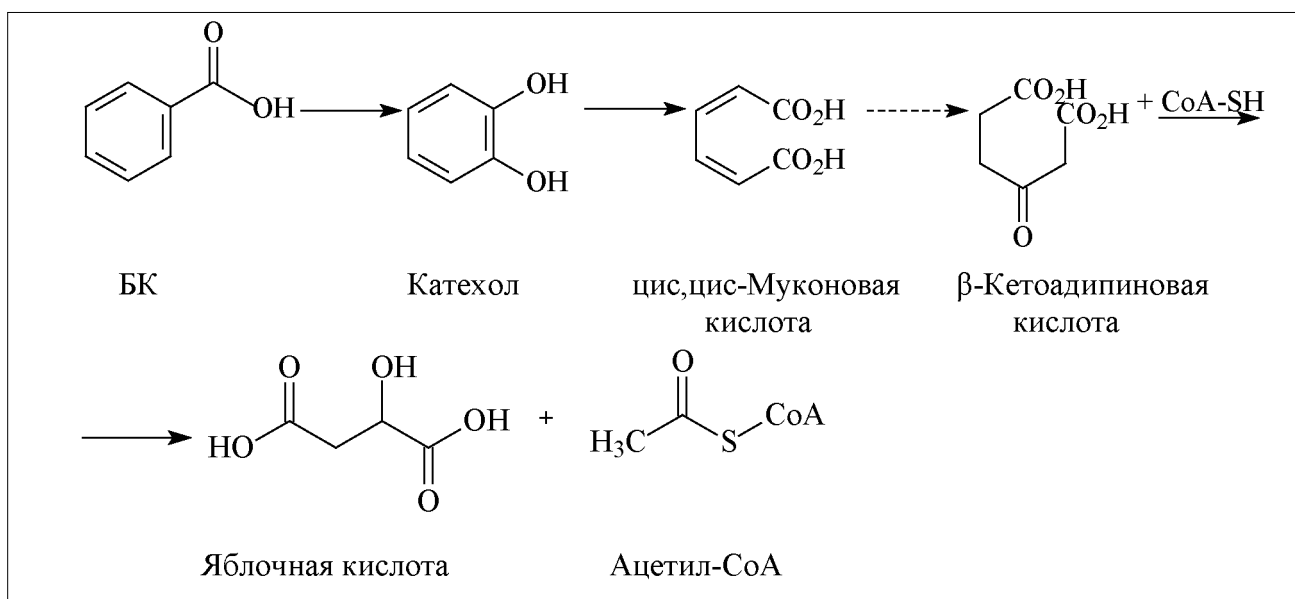


Рис. 4. Аэробный, β -кетoadипиновый путь расщепления БК бактериями [76].

ing cassette) и, помимо транспорта бензоата, участвует в переносе других анионов слабых органических кислот, включая анионы п-ГФУК и ФУК [17]. ABC-транспортёры были обнаружены как у прокариотов, так и у эукариотов, включая человека [59, 60]. У микроорганизмов ABC-транспортёры играют ключевую роль в развитии устойчивости к противомикробным препаратам, а у человека — к противоопухолевым препаратам [61].

У млекопитающих и человека в транспорте аниона БК принимают участие белки-транспортёры MFS-суперсемейства (major facilitator superfamily) — протонзависимые монокарбоксилатные транспортёры (MCTs), а также натрийзависимые монокарбоксилатные транспортёры (SMCTs). Транспорт бензоата этими транспортёрами осуществляется путём облегчённой диффузии по градиенту протонов водорода (анион-водородный симпорт) и натрия, при этом зависит от градиента переносимого аниона [62–66]. Семейство монокарбоксилатных транспортёров (MCTs, SLC16As) представлено не менее чем 14 мембранными белками, включая транспортёры для низкомолекулярных монокарбоновых кислот (MCT1–MCT4), гормонов щитовидной железы (MCT8, SLC16A10) и ароматических аминокислот (MCT10, SLC16A2). MCTs обеспечивают трансмембранный транспорт таких важных с точки зрения основного метаболизма монокарбоксилатов, как лактат, пируват, ацетоацетат. SMCTs, используя градиент концентраций натрия, транспортируют лактат, пируват и кетоновые тела из внеклеточной среды, например в слизистой кишечника, почечном эпителии, мозге [65, 67, 68]. MCT1 является универсальным транспортёром для большинства тканей и органов, включая ге-

матозэнцефалический барьер, в то время как другие MCTs обладают органоспецифичностью. MCTs участвуют в поддержании внутриклеточного pH путём удаления из цитозоля органических кислот, образующихся в ходе гликолиза и других метаболических процессов. Белые скелетные мышцы, эритроциты, опухолевые клетки особенно зависимы от MCTs, так как в них процесс гликолиза протекает особенно интенсивно с выделением органических кислот. [69]. Печень и почки, напротив, способны утилизировать лактат для глюконеогенеза, а сердечная мышца и красные скелетные мышцы используют лактат в процессе дыхания [66, 70].

Таким образом, MCTs, в зависимости от ткани и её функциональной активности, способны удалять монокарбоксилатные органические кислоты из клетки, либо транспортировать их внутрь клетки. В целом, специфический транспорт моно- и C4-дикарбоксилатов играет ключевую роль в энергетическом обмене эукариотической клетки, обеспечивая взаимосвязь внутриклеточных и системных метаболических процессов в целостном организме [71]. На сегодняшний день показано, что ароматические кислоты, в частности БК и фенилпировиноградная кислота, способны ингибировать работу MCTs, что может отражаться на способности клетки поддерживать оптимальный уровень внутриклеточного pH в случае повышения внутриклеточной концентрации ФКК, как было описано выше, изменять работу её ферментных путей [64, 69, 72–75].

Метаболизм БК микроорганизмами. Аэробный путь расщепления БК у бактерий происходит преимущественно по β -кетoadипиновому пути с участием диоксигеназы, при этом основным ин-

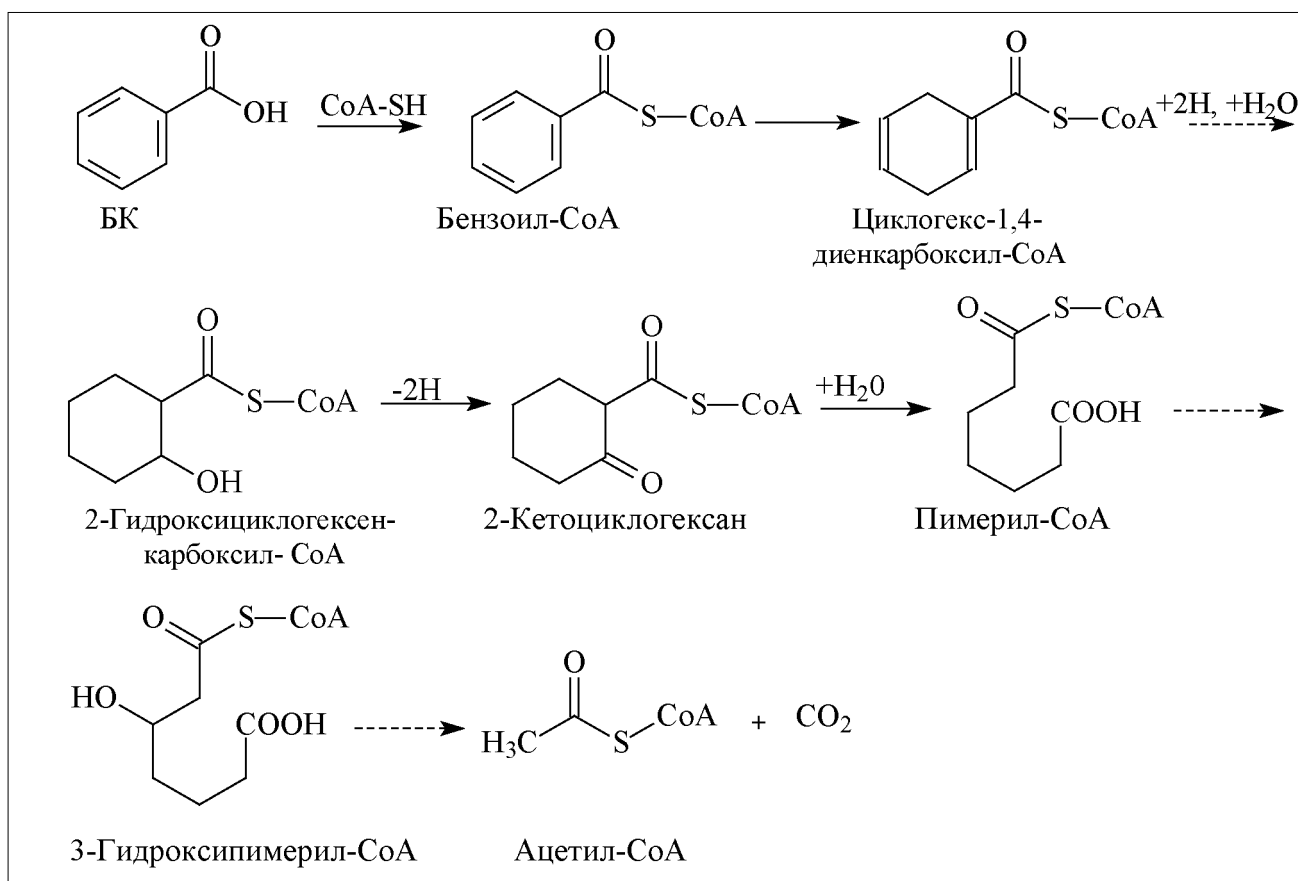


Рис. 5. Анаэробный путь расщепления БК бактериями [76].

термедиатом является катехол (пирокатехин), который подвергается расщеплению между двумя гидроксильными атомами углерода (орто-расщепление). В качестве субстрата для орто-расщепления бензольного кольца может выступать также протокатеховая кислота с образованием в качестве промежуточного продукта β -карбокси-цис,цис-муконовой кислоты (рис. 4) [76].

Этот путь метаболизма БК характерен как для бактерий, так и для грибов [6, 77–79]. В более редких случаях катехол и протокатеховая кислота подвергаются расщеплению между гидроксильным и негидроксильным атомом углерода (мета-расщепление). В этом случае конечными продуктами биodeградации являются пируват и ацетальдегид [76].

Также описан аэробный путь биodeградации БК с участием монооксигеназ. Промежуточными продуктами в этом случае могут являться 4-гидроксибензойная, 3,4-дигидроксибензойная (протокатеховая), 2,5-дигидроксибензойная (гентибиновая) кислоты [45, 76, 80].

Основной интермедиат аэробного расщепления БК — пирокатехин обладает свойствами эндогенных катехоламинов, вызывая повышение артериального давления и оказывая бронходилатирующий эффект [81–84].

Третьим известным путём аэробной деградации БК является образование на первом этапе бензоил-CoA с последующим участием монооксигеназы [85]. Конечными продуктами третьего пути являются ацетил-CoA и сукцинил-CoA.

В случае анаэробных условий кислород не может быть использован для активации ароматического кольца. Анаэробный путь бактериального метаболизма БК начинается с образования бензоил-CoA, с последующими стадиями последовательной редукции двойных связей в кольце и его расщеплением. Конечными продуктами анаэробной деградации БК являются ацетил-CoA и углекислый газ.

Ферментирующие бактерии не получают энергетической выгоды от расщепления ароматического кольца. Нитратредуцирующие бактерии и тем более аэробы, напротив, способны утилизировать ацетил-CoA в цикле трикарбоновых кислот с образованием значительного количества АТФ, тем самым компенсируя с избытком энергозатраты на метаболизм БК. Через образование бензоил-CoA также осуществляется анаэробный метаболизм ФУК, фенола, *p*-крезола, анилина, прекурсоров БК, *p*-ГБК (рис. 5) [86–88].

В своей работе мы отметили, что грамположительные и грамотрицательные бактерии, ассоции-

ированные с сепсисом, способны продуцировать ФКК (преимущественно ФМК и п-ГФМК, а *Pseudomonas aeruginosa* и *Acinetobacter baumannii* — п-ГФУК), однако их потенциал синтеза ФКК в чистых культурах, по нашим данным, значительно ниже, чем у строгих анаэробов. Как было сказано выше, анаэробные бактерии не получают энергетической выгоды от расщепления ароматического кольца, этим фактом можно объяснить, почему анаэробы в большей степени, нежели факультативные анаэробы, накапливают в среде ФКК и соответственно должны были выработать механизмы устойчивости к ФКК (биохимические или симбиотические).

Выведение БК из организма человека. Из всех ФКК — производных фенилаланина человек способен метаболизировать с раскрытием ароматического кольца только пара-гидроксифенилпировиноградную кислоту через её метаболит — гомогентизиновую кислоту. В случае БК в организме животных и человека, в митохондриях печени и почек, она подвергается конъюгации с глицином под влиянием глицинтрансферазы и в виде гиппуровой кислоты (ГК) выводится с мочой [89—91].

Дополнительным путём выведения БК из организма человека (менее 20% БК) служит её конъюгация с глюкуроновой кислотой [92]. В оригинальном исследовании на гомогенизатах тканей человека было установлено, что скорость конъюгации БК и глицина в печени в среднем составила $254 \pm 90,5$ нмоль/мин на 1 г печени (экстремальные значения составили 94,4 и 564 нмоль/мин на 1 г печени). В гомогенизатах коркового вещества почки скорость конъюгации БК и глицина в среднем была выше, чем в печени, и составила $321 \pm 99,3$ нмоль/мин на 1 г ткани (экстремальные значения составили 63,3 и 542 нмоль/мин на 1 г коркового вещества почки) [93]. Для ФУК и п-ГФУК известно, что в организме человека образуются их конъюгаты с глицином и глутамином, для ФПК — с глицином. Однако в международных метаболомных базах не было найдено сведений об образовании конъюгатов п-ГФМК и ФМК.

У здорового человека в течение 6 часов происходит выведение с мочой не менее 70% образовавшейся ГК после разового приёма тестовой дозы БК внутрь [82]. На этом факте основан клинико-лабораторный тест — проба Квика, по результатам которого судят о тяжести печеночной недостаточности.

Концентрация ГК значительно возрастает в крови у больных с почечной недостаточностью. Установлено, что ГК обладает токсическим эффектом на организм человека и её относят к умеренным токсинам [94, 95]. Интересен такой факт, что в роде *Campylobacter* один из видов *C. jejuni*

был идентифицирован как возбудитель гастроэнтерита у человека. При этом оказалось, что, в отличие от непатогенного вида *C. coli*, патогенный вид способен разлагать ГК на БК и глицин [96].

Дозозависимое действие БК на человека и животных. LD₅₀ БК для кроликов при приёме внутрь составляет 3040 мг/кг, для мышей — 1940—2263 мг/кг. LD₅₀ БК для кошек более чем в 2 раза меньше, что связано с их низкой способностью к глюкуронированию. LD₅₀ бензоата натрия для крыс при приёме внутрь, по разным данным, составляет 2100—4070 мг/кг [18]. Для БК при многократных и длительных приёмах внутрь NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) составляет 800 мг/кг/сутки. Как показано в эксперименте на животных, свыше этого уровня растёт смертность, снижается масса тела и обнаруживаются токсические эффекты на почки и печень [92]. Однако известно, что толерантность к токсическому эффекту бензоата возрастает при добавлении в диету животным глицина [97].

У людей скорость биотрансформации БК и её солей составляет, по разным данным, 17—29 мг/кг/ч и не зависит от дозы БК [18]. Пик концентрации БК в плазме после приёма внутрь достигается через 1—2 ч [18]. При приёме внутрь БК в дозе 1000 мг/кг в сутки развивается метаболический ацидоз с электролитными нарушениями в виде гипокалиемии и гипокальциемии. В исследовании на добровольцах при ступенчатом увеличении дозировки БК до 2500 мг/сут испытуемые предъявляли жалобы на тошноту, головную боль, слабость, изжогу. Токсические эффекты БК на организм регистрируются при её концентрации в сыворотке более 800 мг/л (6,55 mM) [82].

По нашим собственным данным, в группе больных с сепсисом медиана суммы концентраций клинически значимых ФКК в сыворотке крови составляет не менее 25,7 мкМ (интерквартильные размахи 25 и 75% соответственно составили 13 мкМ и 59,2 мкМ) [10]. По данным литературы, при фенилкетонурии уровень ФМК в плазме крови может составлять более 50 мкМ [98].

Бензоат натрия используют для лечения гипераммониемии у людей с нарушенным циклом образования мочевины. В этом случае бензоат натрия вводят медленно внутривенно или дают внутрь в дозировке 250—500 мг/кг в сутки [99]. Из побочных эффектов наиболее часто регистрируют рвоту, особенно при внутривенном введении [18]. Установлено, что бензоат вытесняет билирубин из его связей с альбумином, что приводит к повышению концентрации и токсичности свободного билирубина в сыворотке крови у больных, которые получают лечение бензоатом натрия [100, 101]. У пациентов, получающих терапию бензоатом натрия, отмечено повышение концентрации триптофана в крови и как следст-

вие серотонина в головном мозге, чем объясняют подавление аппетита у данной категории больных. На примере взаимодействия бензоата натрия и трипсина было показано, что бензоат способен изменять форму белка, влияя на его β -складчатые структуры [102]. Существуют работы, указывающие, что у части больных шизофренией нарушен синтез ГК [103]. Также описаны 3 случая передозировки бензоата натрия и фенилacetата натрия. У всех пострадавших было нарушено сознание и развился тяжёлый метаболический ацидоз, двое пострадавших погибли [104].

БК и бензоат натрия американской организацией FDA включены в список относительно безопасных пищевых добавок (GRAS). Комитет JECFA (THE JOINT FAO/WHO COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES) считает приемлемым ежедневное поступление (ADI) БК и бензоата натрия в организм человека в количестве 0—5 мг/кг массы тела [105].

Таким образом, низкомолекулярные ароматические кислоты, такие как бензойная и ряд других фенилкарбоновых кислот, известные как промежуточные и конечные продукты бактериального метаболизма, обладают биорегуляторной активностью не только в отношении микроорганизмов, но и в отношении эукариотических клеток организма человека.

Ранее было сказано, что тяжесть состояния больных прямо коррелирует с интегральной концентрацией ароматических микробных метаболитов (АММ) в сыворотке крови [10, 11]. Согласно универсальной теории слабых органических кислот ФКК обладают общим механизмом действия: они вызывают закисление внутриклеточной среды и подавляют выработку АТФ и/или истощают её запасы в клетке, т. е. могут участвовать в развитии цитопатической гипоксии при сепсисе [106, 107]. Чувствительность организмов к ФКК, что следует из приведённых выше фактов, широко варьирует, но существует общая тенденция усиления токсичности этих соединений при закислении среды (ацидозе).

Заключение

Обобщая данные литературы и результаты собственных исследований, нами сформулированы и предложены для изучения несколько положений, которые могут служить дальнейшим развитием гипотезы [6] об интеграции метаболизма и роли микробных экзометаболитов в организме человека:

ЛИТЕРАТУРА

1. Dellinger R.P., Levy M.M., Rhodes A., Annane D., Gerlach H., Opal S.M. et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. Crit Care Med 2013; 41: 2: 580—637.
2. Angus D.C., Linde-Zwirbl W.T., Lidicker J., Clermont G., Carcillo J., Pinsky M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med 2001; 29: 7: 1303—1310.

1. В периепителиальном слое естественных микробиоценозов человека, а также на границе очага инфекции в тканях (перикапиллярно, периепителиально) уровни ФКК могут достигать значений, достаточных для локального и/или системного проявления их биологических эффектов, что может проявляться не только в изменении состава и метаболической активности микробиоты, но и влиять на реактивность иммунокомпетентных клеток, тканеспецифическую функцию органов и др.

2. При ряде клинических состояний (сепсис, шок, гипоксия, тяжёлая почечная/печеночная недостаточность, митохондриальная дисфункция и др.) распределение прекурсоров ФКК, самих ФКК, продуктов их химического превращения и конъюгации в организме человека может значительно отличаться от здорового человека. Все это может существенно влиять на степень проявления биологической активности метаболитов, в том числе — за счёт изменения их внутриклеточных концентраций.

3. Накопление новых знаний о ФКК в перспективе может способствовать разработке новых лечебных стратегий, например: управление составом и метаболической активностью микробиоценозов естественных и патологических (очаг инфекции в тканях) биотопов тела человека; управление метаболизмом человека; управление реактивностью иммунокомпетентных клеток путём коррекции метаболического профиля и др. Уже сегодня такие поисковые работы ведутся нами в клинике, в частности — при сепсисе, септическом шоке, операциях с искусственным кровообращением, при тяжёлой сочетанной травме и др.

Необходимы более глубокие знания о естественных законах регуляции в микробиоценозах, о сигнальных механизмах, обеспечивающих интеграцию метаболизма человека и его микробиома. Главной идеей данного обзора является намерение привлечь внимание специалистов к участию в разработке принципиально новых лечебных стратегий, основанных на регуляции локального и системного баланса ароматических микробных метаболитов в организме человека, направленных на улучшение результатов лечения заболеваний и состояний человека, прежде всего — сепсиса.

Статья подготовлена при поддержке гранта РФФИ № 13-04-01758 А 2013—2014 гг.

3. Хубутия М.Ш., Шабанов А.К., Черненко Т.В., Годков М.А., Дорфман А.Г. Инфекционные лёгочные осложнения в реанимации и интенсивной терапии у пострадавших с сочетанной травмой. Общ. реаниматология 2011; 7: 4: 24—27.
4. Мороз В.В., Лукач В.Н., Шифман Е.М., Долгих В.Т., Яковлева И.И. Сепсис: клинко-патофизиологические аспекты интенсивной терапии: руководство для врачей. Петрозаводск: ИнтелТек; 2004.
5. Руднов В.А., Бельский Д.В., Дехнич А.В. Инфекции в ОРИТ России: результаты национального многоцентрового исследования. Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. 2011; 13: 4: 294—303.

6. Белобородова Н.В. Интеграция метаболизма человека и его микробиома при критических состояниях. *Общая реаниматол* 2012; 8: 4: 42—54.
7. Rutherford S.T., Bassler B.L. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2: 11: a012427.
8. Шпаков. А.О. Сигнальные пути бактерий непептидной природы QS-типа. *Микробиология* 2009; 78: 2: 163—175.
9. Lyte M., Vulchanova L., Brown D.R. Stress at the intestinal surface: catecholamines and mucosa-bacteria interactions. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 1: 23—32.
10. Белобородова Н.В., Оленин А.Ю., Ходакова А.С., Черневская Е.А., Хабиб О.Н. Происхождение и клиническое значение низкомолекулярных фенольных метаболитов в сыворотке крови человека. *Анестезиол реаниматол* 2012; 5: 65—72.
11. Белобородова Н.В., Возиян А.Ю., Осипов А.А. Лабораторная диагностика бактериальной интоксикации методом газохроматографического анализа крови. *Клин лаб диагн* 2012; 9: 79.
12. Белобородова Н.В., Архипова А.С., Белобородов Д.М., Бойко Н.Б., Мелько А.И., Оленин А.Ю. Хромато-масс-спектрометрическое определение низкомолекулярных ароматических соединений микробного происхождения в сыворотке крови больных сепсисом. *Клин лаб диагн* 2006; 2: 3—6.
13. Khodakova A.S., Beloborodova N.V. Microbial metabolites in the blood of patients with sepsis. *Critical Care* 2007; 11: Suppl 4: 5.
14. Белобородова Н.В., Ходакова А.С., Байрамов И.Т., Оленин А.Ю. Микробный путь образования фенилкарбоновых кислот в организме человека. *Биохимия* 2009; 74: 12: 1657—1663.
15. Davidson P.M., Sofos J.N., Branen A. L. Editors. *Antimicrobials in food*. 3rd ed. London: Taylor & Francis Group; 2005.
16. Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobetti M. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 9: 4084—4090.
17. Hazelwood L.A., Tai S.L., Boer V.M., de Winde J.H., Pronk J.T., Daran J.M. A new physiological role for Pdr12p in *Saccharomyces cerevisiae*: export of aromatic and branched-chain organic acids produced in amino acid catabolism. *FEMS Yeast Res* 2006; 6: 6: 937—945.
18. World Health Organization. Concise International Chemical Assessment Document 26. Benzoic acid and sodium benzoate. Geneva: 2000.
19. Sieber R., Bittkofer U., Bosse J.O. Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *Int Dairy J* 1995; 5: 227—246.
20. Kaškonienė V., Maruška A., Kornysheva O., Charczun N., Ligor M., Buszewski B. Quantitative and qualitative determination of phenolic compounds in honey. *Chemine Technologija*. 2009; 3: 52: 74—80.
21. Tjakko S., Maria Angela L. de A. Amazonas., Giller V. Characterisation of flavour and taste compounds in *Agaricus blazei* Murrill sensu Heinem., the cultivated almond mushroom. *Australasian Mycologist* 2004; 22: 3: 116—122.
22. Pappas E., Schaich K. M. Phytochemicals of cranberries and cranberry products: characterization, potential health effects, and processing stability. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2009; 49: 9: 741—781.
23. Russel N.J., Could G.W. ed. *Food Preservatives*. 2nd ed. NY: Springer; 2003.
24. Белозерова Н.С. Влияние цитокинов и салициловой кислоты на экспрессию генов митохондриальных белков. М.: ФГБУ «ИФР» РАН; 1—150.
25. Moore K., Rao P.V., Towers G.H. Degradation of phenylalanine and tyrosine by *Sporobolomyces roseus*. *Biochem J* 1968; 106: 2: 507—514.
26. Andersen A. Final report on the safety assessment of benzaldehyde. *Int J Toxicol* 2006; 25: Suppl 1: 11—27.
27. European commission health & consumer protection directorate-general. Opinion of the scientific committee on food on benzyl alcohol. Brussel: 2002.
28. Lord S.R., Bralley J.A. Clinical applications of urinary organic acids. Part 2. Dysbiosis Markers. *Altern Med Rev* 2008; 13: 4: 292—306.
29. Grün C.H., van Dorsten F.A., Jacobs D.M., Le Belleguic M., van Velzen E.J., Bingham M.O. et al. GC-MS methods for metabolic profiling of microbial fermentation products of dietary polyphenols in human and *in vitro* intervention studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2008; 871: 2: 212—219.
30. Knoop F. Der Abbau aromatischer Fettsäuren im Tierkörper. *Beitr Chem Physiol Pathol* 1904; 6: 150—162.
31. Jenner A.M., Rafter J., Halliwell B. Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 6: 763—772.
32. Khan R.I., Onodera R., Amin M.R., Mohammed N. Aromatic amino acid biosynthesis and production of related compounds from p-hydroxyphenylpyruvic acid by rumen bacteria, protozoa and their mixture. *Amino Acids* 2002; 22: 2: 167—177.
33. Knarreborg A., Miquel N., Granli T., Jensen B.B. Establishment and application of an *in vitro* methodology to study the effects of organic acids on coliform and lactic acid bacteria in the proximal part of the gastrointestinal tract of piglets. *Anim Feed Sci Technol* 2002; 99: 131—140.
34. Cueva C., Moreno-Arribas M.V., Martín-Alvarez P.J., Bills G., Vicente M.F., Basilio A. et al. Antimicrobial activity of phenolic acids commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Res Microbiol* 2010; 161: 5: 372—382.
35. Glass A.D. Influence of phenolic acids on ion uptake: IV. Depolarization of membrane potentials. *Plant Physiol* 1974; 54: 6: 855—858.
36. Beloborodova N., Bairamov I., Olenin A., Shubina V., Teplova V., Fedotcheva N. Effect of phenolic acids of microbial origin on production of reactive oxygen species in mitochondria and neutrophils. *J Biomed Sci* 2012; 19: 89.
37. Gerez C.L., Torres M.J., Font de Valdez G., Rollán G. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control* 2012; 64: 231—237.
38. Suskovic J., Kos B., Beganovic J., Pavunc A.L., Habjanic K., Matosic S. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria. *Food Technol Biotechnol* 2010; 48: 3: 296—307.
39. Valerio F., Lavermicocca P., Pascale M., Visconti A. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 233: 2: 289—295.
40. Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl Environ Microbiol* 2000; 69: 1: 634—640.
41. Dieuleveux V., Lemarinier S., Guéguen M. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. *Int J Food Microbiol* 1998; 40: 3: 177—183.
42. Gabel L.F. The relative action of preservatives in pharmaceutical preparations. *J Am Pharm Assoc* 1921; 10: 10: 767—768.
43. Cruess W.V., Richert P.H. Effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of sodium benzoate to microorganisms. *J Bacteriol* 1929; 17: 5: 363—371.
44. Warth A.D. Transport of benzoic and propanoic acids by *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of General Microbiology* 1989; 135: 5: 1383—1390.
45. Mollapour M., Piper P.W. The ZbYME2 gene from the food spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii* confers not only YME2 functions in *Saccharomyces cerevisiae*, but also the capacity for catabolism of sorbate and benzoate, two major weak organic acid preservatives. *Mol Microbiol* 2001; 42: 4: 919—930.
46. Verduyn C., Postma E., Scheffers W.A., Van Dijken J.P. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 1992; 8: 7: 501—517.
47. Holyoak C.D., Stratford M., McMullin Z., Cole M.B., Crimmins K., Brown A.J. et al. Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak acid preservative sorbic acid. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 9: 3158—3164.
48. Holyoak C.D., Bracey D., Piper P.W., Kuchler K., Coote P.J. The *Saccharomyces cerevisiae* weak acid-inducible ABC transporter Pdr12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. *J Bacteriol* 1999; 181: 15: 4644—4652.
49. Krebs H.A., Wiggins D., Stubbs M., Sols A., Bedoya A. Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate. *Biochem J* 1983; 214: 3: 657—663.
50. Pearce A.K., Booth I.R., Brown A.J. Genetic manipulation of 6-phosphofructo-1-kinase and fructose 2,6-bisphosphate levels affects the extent to which benzoic acid inhibits the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 2001; 147: Pt 2: 403—410.
51. Федотчева Н.И., Теплова В.В., Белобородова Н.В. Участие фенольных кислот микробного происхождения в дисфункции митохондрий при сепсисе. *Биол мембран* 2010; 27: 1: 60—66.

52. Merfort I., Heilmann J., Weiss M., Pietta P., Gardana C. Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs. *Planta Med* 1996; 62: 4: 289–292.
53. Limasset B., Ojasoo T., le Doucen C., Doré J.C. Inhibition of chemiluminescence in human PMNs by monocyclic phenolic acids and flavonoids. *Planta Med* 1999; 65: 1: 23–29.
54. Brahmachari S., Jana A., Pahan K. Sodium benzoate, a metabolite of cinnamon and a food additive, reduces microglial and astroglial inflammatory responses. *J Immunol* 2009; 183: 9: 5917–5927.
55. Monagas M., Khan N., Andrés-Lacueva C., Urpi-Sardí M., Vázquez-Agell M., Lamuela-Raventós R.M. et al. Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *Br J Nutr* 2009; 102: 2: 201–206.
56. Kalbag S.S., Palekar A.G. Sodium benzoate inhibits fatty acid oxidation in rat liver: effect on ammonia levels. *Biochem Med Metab Biol* 1988; 40: 2: 133–142.
57. Lin J., Smith M.P., Chapin K.C., Baik H.S., Bennett G.N., Foster J.W. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62: 9: 3094–3100.
58. Lambert L.A., Abshire K., Blankenhorn D., Slonczewski J.L. Proteins induced in *Escherichia coli* by benzoic acid. *J Bacteriol* 1997; 179: 23: 7595–7599.
59. Higgins C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* 1992; 8: 67–113.
60. Sterkova J., Poledne R., Hubacek J.A. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* 2004; 53: 3: 235–243.
61. Higgins C.F. ABC transporters: physiology, structure and mechanism – an overview. *Res Microbiol* 2001; 152: 3–4: 205–210.
62. Tamai I., Sai Y., Ono A., Kido Y., Yabuuchi H., Takanaga H. et al. Immunohistochemical and functional characterization of pH-dependent intestinal absorption of weak organic acids by the monocarboxylic acid transporter MCT1. *J Pharm Pharmacol* 1999; 51: 10: 1–9.
63. Cong D., Fong A.K., Lee R., Pang K.S. Absorption of benzoic acid in segmental regions of the vascularly perfused rat small intestine preparation. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 12: 1539–1547.
64. Vellonen K.S., Häkli M., Merezhinskaya N., Tervo T., Honkakoski P., Urtti A. Monocarboxylate transport in human corneal epithelium and cell lines. *Eur J Pharm Sci* 2010; 39: 4: 241–247.
65. Ganapathy V., Thangaraju M., Gopal E., Martin P.M., Itagaki S., Miyauchi S. et al. Sodium-coupled monocarboxylate transporters in normal tissues and in cancer. *AAPS J* 2008; 10: 1: 193–199.
66. Juel C., Halestrap A.P. Lactate transport in skeletal muscle – role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* 1999; 517: Pt 3: 633–642.
67. Meredith D., Christian H.C. The SLC16 monocarboxylate transporter family. *Xenobiotica* 2008; 38: 7–8: 1072–1106.
68. Poole R.C., Halestrap A.P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 1993; 264: 4 Pt 1: 761–782.
69. Kang K.W., Jin M.J., Han H.K. IGF-I receptor gene activation enhanced the expression of monocarboxylic acid transporter 1 in hepatocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342: 4: 1352–1355.
70. Halestrap A.P., Meredith D. The SLC16 gene family from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* 2004; 447: 5: 619–628.
71. Аливердиева Д.А. Дикарбоксилатные переносчики дрожжей: некоторые особенности структуры и субстратная специфичность. *Вест Дагестан научн центра* 2008; 32: 21–28.
72. Morris M.E., Felmlee M.A. Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid. *AAPS J* 2008; 10: 2: 311–321.
73. Majumdar S., Gunda S., Pal D., Mitra A.K. Functional activity of a monocarboxylate transporter, MCT1, in the human retinal pigmented epithelium cell line, ARPE-19. *Mol Pharm* 2005; 2: 2: 109–117.
74. Kimura O., Tsukagoshi K., Endo T. Uptake of phenoxyacetic acid derivatives into Caco-2 cells by the monocarboxylic acid transporters. *Toxicol Lett* 2009; 189: 2: 102–109.
75. Vaidyanathan J.B., Walle T. Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (–)-epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307: 2: 745–752.
76. Современная микробиология. Прокариоты / Ленгелера Й., Дреуса Г., Шлегеля Г. М.: Мир; 2009. 1.
77. Johnson B. F., Stanier R.Y. Regulation of the β -ketoadipate pathway in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 1971; 107: 2: 476–485.
78. Collier L.S., Gaines G.L. 3rd, Neidle E.L. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator. *J Bacteriol* 1998; 180: 9: 2493–2501.
79. Harayama S., Rekik M., Bairoch A., Neidle E.L., Ornston L.N. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal benABC and *Pseudomonas putida* TOL pWW0 plasmid xylXYZ, genes encoding benzoate dioxygenases. *J Bacteriol* 1991; 173: 23: 7540–7548.
80. Grund E., Knorr C., Eichenlaub R. Catabolism of benzoate and monohydroxylated benzoates by *Amycolatopsis* and *Streptomyces* spp. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 5: 1459–1464.
81. Anderson A.J., Harvey A.L. Effects of the facilitatory compounds catechol, guanidine, noradrenaline and phencyclidine on presynaptic currents of mouse motor nerve terminals. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1988; 338: 2: 133–137.
82. Department of Health and Human Services. Hazardous Substances Data Bank (HSDB). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 1993.
83. Catechol (ICSC:0411). Prepared in the context of cooperation between the International Programme on Chemical Safety and the Commission of the European Communities © IPCS. CEC. 2005.
84. Andersen F.A. Amended final report on the safety assessment of pyrocatechol. *International J Toxicology* 1997; 16: 1: 11–58.
85. Rafter L.J., Knapp B., Haehnel W., Fuchs G. Coenzyme A-dependent aerobic metabolism of benzoate via epoxide formation. *J Biol Chem* 2010; 285: 27: 20615–20624.
86. Harwood C.S., Gibson J. Shedding light on anaerobic benzene ring degradation: a process unique to prokaryotes? *J Bacteriol* 1997; 179: 2: 301–309.
87. Gibson J., Harwood C.S. Metabolic diversity in aromatic compound utilization by anaerobic microbes. *Annu Rev Microbiol* 2002; 56: 1: 345–369.
88. Mohapatra P.K. Textbook of Environmental Biotechnology. New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd.; 2006.
89. Dakin J.D. The fate of sodium benzoate in the human organism. *J Biol Chem* 1910; 7: 103–108.
90. Граник В.Г. Метаболизм эндогенных соединений. М.: Вузовская книга; 2006.
91. Wikoff W.R., Anfora A.T., Liu J., Schultz P.G., Lesley S.A., Peters E.C., Siuzdak G. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 10: 3698–3703.
92. SIDS Initial Assessment Report for 13th SIAM. Benzoates: Benzoic Acid, Sodium Benzoate, Potassium Benzoate, Benzyl alcohol. 2001.
93. Temellini A., Mogavero S., Giulianotti P.C., Pietrabissa A., Mosca F., Pacifici G.M. Conjugation of benzoic acid with glycine in human liver and kidney: a study on the interindividual variability. *Xenobiotica* 1993; 23: 12: 1427–1433.
94. Deguchi T., Takemoto M., Uehara N., Lindup W.E., Suenaga A., Otagiri M. Renal clearance of endogenous hippurate correlates with expression levels of renal organic anion transporters in uremic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 2: 932–938.
95. Mutsaers H.A., van den Heuvel L.P., Ringens L.H., Dankers A.C., Russel F.G., Wetzel J.F., et al. Uremic toxins inhibit transport by breast cancer resistance protein and multidrug resistance protein 4 at clinically relevant concentrations. *PLoS One* 2011; 6: 4: e18438.
96. Hani E.K., Chan V.L. Expression and characterization of *Campylobacter jejuni* benzoylglycine amidohydrolase (hippuricase) gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; 177: 9: 2396–2402.
97. World Health Organization. Food additive series 37: toxicological evaluation of ceratin food additives: benzyl acetate, benzyl alcohol, benzaldehyde, and benzoic acid and its salts. Geneva: 1996.

98. Clemens P.C., Schünemann M.H., Hoffmann G.F., Kohlschütter A. Plasma concentrations of phenyllactic acid in phenylketonuria. *J Inherit Metab Dis* 1990; 13: 2: 227—228.
99. Enns G.M., Berry S.A., Berry G.T., Rhead W.J., Brusilow S.W., Hamosh A. Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. *N Engl J Med* 2007; 356: 22: 2282—2292.
100. Green T.P., Mirkin B.L. Sodium benzoate in the treatment of hyperammonemia in newborns. *Pediatric Research* 1981; 15: 630.
101. Schiff D., Chan G., Stern L. Fixed drug combinations and the displacement of bilirubin from albumin. *Pediatrics* 1971; 48: 1: 139—141.
102. Mu Y., Lin J., Liu R. Interaction of sodium benzoate with trypsin by spectroscopic techniques. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2011; 81: 1: 130—135.
103. Tremblay G.C., Qureshi I.A. The biochemistry and toxicology of benzoic acid metabolism and its relationship to the elimination of waste nitrogen. *Pharmacol Ther* 1993; 60: 1: 63—90.
104. Praphanphoj V., Boyadjev S.A., Waber L.J., Brusilow S.W., Geraghty M.T. Three cases of intravenous sodium benzoate and sodium phenylacetate toxicity occurring in the treatment of acute hyperammonaemia. *J Inherit Metab Dis* 2000; 23: 2: 129—136.
105. SCCNFP/0532/01, final. Opinion of the Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers. 2002.
106. Garrahou G., Morén C., López S., Tobías E., Cardellach F., Miró O. et al. The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis* 2012; 205: 3: 392—400.
107. Protti A., Singer M. Bench-to-bedside review: potential strategies to protect or reverse mitochondrial dysfunction in sepsis-induced organ failure. *Crit Care* 2006; 10: 5: 228.
108. Russel A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food pharmaceutical preservatives. *J Appl Bacteriol* 1991; 71: 3: 191—201.
109. Borawska M. H., Czechowska S. K., Markiewicz R., Palka, J., Świsłocka R., Lewandowski W. Antimicrobial activity and cytotoxicity of picolinic acid and selected picolines as new potential food preservatives. *Pol J Food Nutr Sci* 2008; 58: 4: 415—418.
110. Hsiao C. P., Siebert K. J. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int J Food Microbiol* 1999; 47: 3: 189—201.