

# Omni Lactis<sup>®</sup> 10 Biogena доказывает высокую микробиологическую активность и благоприятные ферментационные свойства в кишечной среде человека

## Результаты тестирования в симуляторе кишечной микробной экосистемы человека (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem – SHIME<sup>®</sup>)

### Аннотация

Процессы в человеческом кишечнике в силу естественных причин недоступны непосредственному наблюдению. Одним из научно обоснованных способов анализа процессов в пищеварительном тракте является валидированная динамическая модель, которая имитирует желудочно-кишечные процессы *in vitro* и позволяет получить измеримые результаты интервенций. С целью выявления того, какие эффекты вызывает супплементация синбиотическим мультиштаммовым продуктом (Omni Lactis<sup>®</sup> 10 Caps) в кишечной среде, продукт прошёл оценку с использованием модели SHIME<sup>®</sup> бельгийской исследовательской фирмы ProDigest.

Результаты свидетельствуют о сильном метаболическом потенциале синбиотического мультиштаммового продукта. Наблюдалась повышенная выработка лактата и ацетата, необходимых для размножения и заселения благоприятных лакто- и бифидобактерий.

Выявленное снижение уровня pH было особенно заметно в период от 24 до 48 часов.

О выраженной ферментационной способности мультиштаммовой смеси свидетельствует высокая выработка короткоцепочечных жирных кислот (short chain fatty acids/SCFAs), причем общее содержание SCFAs удвоилось через 24 часа. Короткоцепочечные жирные кислоты благоприятно сказываются на росте имеющихся бифидобактерий и лактоацилл, что способствует стабилизации микробиоты кишечника и поддержания разнообразия кишечной флоры. SCFAs также являются основным энергетическим субстратом для клеток слизистой оболочки и, следовательно, необходимы для сохранения барьерной функции слизистой оболочки кишечника. Кроме того, они действуют как медиаторы процессов обмена веществ.

### Базовая проблематика

Кишечный микробиом человека тесно связан с метаболическими процессами в организме, влияет на психические и эмоциональные процессы, происходящие на микробиом-кишечно-мозговой оси<sup>(1)</sup> и, по-видимому, играет существенную роль в развитии многих заболеваний, таких как аутизм<sup>(2)</sup>. Дисбиоз микробиома кишечника связан с различными заболеваниями, что подтверждается многочисленными публикациями и исследованиями. Это такие заболевания, как метаболический синдром, сахарный диабет, воспалительные заболевания кишечника, например, болезнь Крона и язвенный колит, синдром раздраженного кишечника, рассеянный склероз, астма, аллергия, сердечно-сосудистые заболевания, ревматоидный артрит, а также неврологические нарушения<sup>(3)</sup>.

В настоящее время пробиотики признаны эффективным средством для лечения дисбиозов и в качестве сопутствующей терапевтической меры при лечении различных заболеваний<sup>(4)</sup>. Однако привносимые бактерии должны соответствовать некоторым критериям, которые гарантируют подавление неблагоприятных штаммов бактерий и стабильное заселение полезных бактерий на слизистой оболочке кишечника. Существенный фактор — способность микробов к размножению (КОЕ/колониообразующие единицы) и созданию благоприятной кишечной среды. Оба фактора тесно связаны со способностью бактерий метаболизировать неудобоваримые пищевые волокна (балластные волокна/диетические волокна). Образующиеся при этом метаболиты, такие как лактат и короткоцепочечные

жирные кислоты (short chain fatty acids/SCFA), приводят к стремительному снижению уровня pH, что способствует заселению и размножению полезных бактерий и сдерживает рост нежелательных бактерий<sup>(5)</sup>.

Помимо поддержания микробного гомеостаза образование этих метаболитов оказывает также положительное влияние на здоровье человека. SCFAs служат эпителиальным клеткам слизистой оболочки кишечника в качестве энергетического субстрата и необходимы для поддержания барьерной функции, а также целостности непроницаемых перегородок. Они также сдерживают воспалительные процессы и снижают экспрессию генов раковых клеток<sup>(6)(7)</sup>.

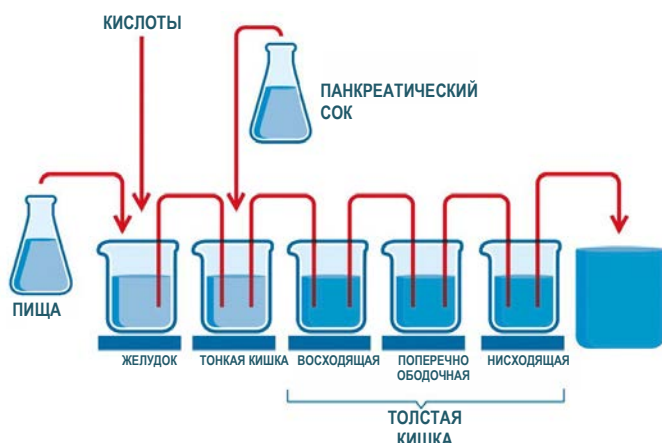
Способность бактериальной смеси оказывать такие воздействия на кишечник — важный критерий при выборе подходящих пробиотических средств. Поскольку процессы в кишечнике человека не поддаются непосредственному наблюдению *in vivo*, активность бактерий приходится измерять косвенными методами. Научно обоснованную возможность для выявления микробиологических процессов в кишечнике дает валидированная динамическая модель, которая имитирует желудочно-кишечные процессы и позволяет измерить воздействие интервенций: модель SHIME<sup>®(8)</sup>.

## Симулятор кишечной микробной экосистемы человека (SHIME®)

Симулятор кишечной микробной экосистемы человека (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), сокращённо SHIME®, представляет собой стандартизованную и валидированную динамическую желудочно-кишечную модель, которая позволяет наблюдать и измерять процессы, происходящие в пищеварительном тракте. SHIME® был разработан бельгийской компанией ProDigest — самостоятельным хозяйствующим субъектом лаборатории микробной экологии и технологий (LabMET) Гентского университета.

SHIME® — это система *in vitro*, моделирующая физические условия (температура, pH, анаэробная среда, движение) и ферментативные реакции микробной среды вдоль желудочно-кишечного тракта и позволяющая оценить эффекты интервенции микробиом-поддерживающими (пробиотическими) лакто- и бифидобактериями. При этом активность вводимых бактерий и их поведение в различных отделах кишечника наблюдаются в условиях плацебо-контролируемого исследования, определяется их ферментационная способность и количество образующихся важных метаболитов (рис. 1). В качестве исходного субстрата и контрольного продукта используется репрезентативная микробная колонизация (фекальный инокулюм).

**Рис. 1: Структура «симулятора кишечной микробной системы человека» с пятью последовательно соединёнными модулями, которые имитируют различные области пищеварительного тракта человека.**



Модель SHIME® уже более 20 лет используется для научных и промышленных проектов и валидирована по параметрам *in vivo*. Она также была использована для оценки эффективности Biogena Omni Lactis® 10. При этом были достигнуты представленные ниже результаты. <sup>(9)</sup>

## Цель настоящего исследования

Количественное и качественное подтверждение эффективности синбиотического мультиштаммового продукта (Biogena Omni Lactis® 10 Caps) с помощью валидированной *in vitro* модели SHIME®. В качестве параметров эффективности тестируемого продукта оценивались способность микробов к ферментации (изменение уровня pH, а также образование H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>) и их активность (количество образующихся метаболитов, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (SCFA), лактат, аммоний и разветвленно-цепочечные b-SCFA).

## Методика

В рамках настоящего эксперимента мультиштаммовый продукт с 10 микробиом-поддерживающими ведущими микробами и инулином (таб. 1) подвергался тестированию в стандартизированной кишечной среде при кратковременной инкубации.

**Табл. 1: Состав синбиотического мультиштаммового продукта**

Biogena Omni Lactis® 10 Caps	
Lactobacillus acidophilus	LA-5®/IN-0260
Bifidobacterium bifidum	IN-0259
Bifidobacterium animalis ssp. lactis	BB-12®/IN-0596
Lactobacillus rhamnosus	IN-0107
Bifidobacterium breve	IN-0751
Bifidobacterium longum	IN-0485
Lactobacillus casei	IN-0261
Lactobacillus paracasei	IN-0532
Lactobacillus plantarum	IN-0262
Streptococcus thermophilus	IN-0301
Инулин (Fibruline® DS2)	

В качестве тестируемого субстрата был выбран эквивалент 2-кратной суточной дозы испытуемого продукта (4 капсулы = 2640 мг лактобактерий  $\Delta$ 3,14 г/л). Эта доза была определена опытным путём и гарантирует, что эффекты интервенции (ферментация и формирование метаболизма) будут хорошо видны и оптимально измеримы. Исследования проводились в три приёма с 6 независимыми инкубациями, чтобы компенсировать биологическую вариабельность. Тестируемый продукт и контрольный продукт за 48 часов проходили через экспериментальную модель три раза (табл. 2).

**Табл. 2: Структура эксперимента для контролируемого тройного теста**

Состояние	Отрицательный контроль	Omni Lactis®
1	•	
2	•	
3	•	
4		•
5		•
6		•

В рамках теста бактериальную микрофлору кишечника человека имитировал фекальный инокулюм. Инокулюм был заменён стандартным питательным раствором из субстратов, которые обычно встречаются в толстой кишке (например, таких гликопротеинов, как муцин), и выдержан в анаэробных условиях в течение 48 часов при 37 °С. В начале эксперимента и через 2, 4, 6, 24 и 48 часов определяются установленные параметры ферментации и метаболизма, а тестируемый продукт сравнивают с контрольным (исследование в тех же условиях без мультиштаммового продукта).

## Измерение изменений уровня pH, а также выработки H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>

Маркером бактериальной ферментационной способности в этой экспериментальной модели служило изменение уровня pH, которое определяется метаболической активностью бактерий и образованием полезных метаболитов, таких как короткоцепочечные жирные кислоты (SCFAs) или лактат. Кроме того, важным показателем является образование H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>. Эти газы перерабатываются далее в кишечной среде и используются, в частности, для выработки CH<sub>4</sub> или восстановления сульфата до H<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. С другой стороны, отрицательным показателем считается образование ионов аммония (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), а также короткоцепочечных разветвленных жирных кислот (b-SCFA), которые ассоциируются с вредным воздействием на здоровье.

## Образование метаболитов как положительный показатель

Количество метаболитов, таких как SCFAs и молочная кислота (лактат), образующихся под действием подводимой бактериальной смеси, указывает на физиологическую эффективность тестируемого продукта. Так, SCFAs (ацетат, пропионат, бутират) способствуют росту полезных бифидо- и лактобактерий, подавляют патогенные микроорганизмы, служат мукозным клеткам в качестве питательного субстрата и повышают и, соответственно, стабилизируют целостность слизистой оболочки кишечника. Лактат, с одной стороны, защищает полезные для здоровья микроорганизмы, метаболизирующие молочную кислоту, а с другой стороны, обладает важными бактерицидными свойствами, проникая в патогенные микробы и разрушая их внутриклеточные структуры.

Образовавшееся количество аммония указывает на степень протеолитической деградации. Поскольку это может быть сопряжено с образованием токсичных веществ, например, p-крезола, благоприятным показателем является небольшое количество образующегося аммония. Также негативно следует оценивать появление короткоцепочечных разветвленных жирных кислот (b-SCFA), которые являются конечными продуктами бактериального разложения разветвленно-цепочечных аминокислот.

## Результаты

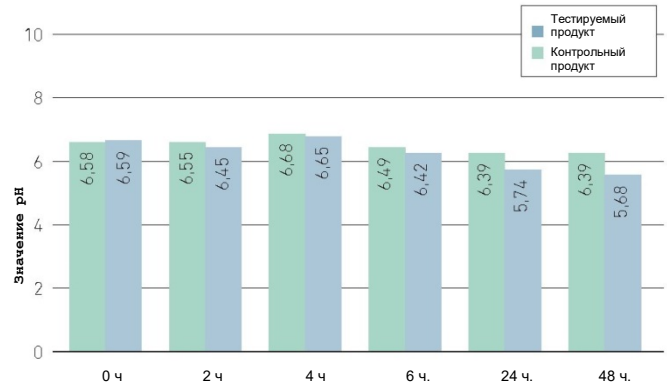
### 1. Ферментационная способность

Метаболическая активность бактериальной культуры может быть подтверждена за счет изменения уровня pH и на основании выработки H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>. По обоим параметрам мультиштаммовый продукт превзошел контрольный. В ходе эксперимента он показал низкую скорость ферментации в первой фазе (0-6 часов), а затем высокую ферментативную активность в следующей фазе (6-24 часа), которая также распространялась на фазу 24-48 часов. Это свидетельствует о том, что бактериальные культуры, содержащиеся в тестируемом продукте, в высокой степени способны к размножению, и о том, что субстрат инулин, способствующий бактериальной активности, присутствует в достаточной степени, чтобы обеспечить ферментативные процессы в течение всего процесса пищеварения.

#### 1.1. Снижение уровня pH

Величина pH — хороший показатель ферментативной активности бактериальных штаммов. Как правило, в течение первых 24 часов уровень pH снижается за счет выработки SCFAs (короткоцепочечных жирных кислот) и лактата. Если уровень pH повышается во временном интервале 24-48 часов, это может свидетельствовать о протеолитической ферментации, при которой, в частности, образуется NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (аммоний). Как показано на рис. 2, уровень pH в контрольных пробах остался неизменным. В то же время мультиштаммовый продукт показал сильное снижение уровня pH во всем 48-часовом интервале, что говорит о высокой ферментационной способности мультиштаммового продукта и образовании полезных для здоровья метаболитов.

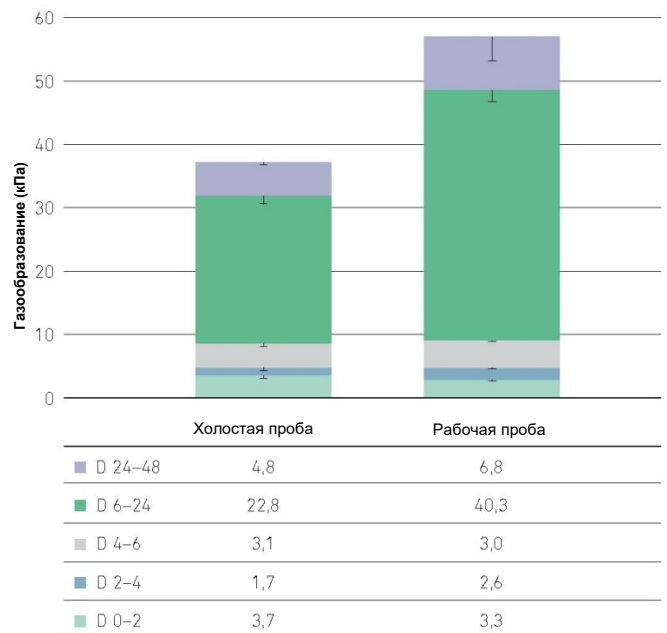
Рис. 2. Изменение уровня pH в течение 48 часов под действием синбиотического мультиштаммового продукта по сравнению с контрольным. В интервале 24-48 часов наблюдалось заметное снижение уровня pH при применении тестируемого продукта, в то время как значение pH для контрольного продукта оставалось неизменным.



### 1.2. Повышенное образование H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub>

Помимо снижения уровня pH образование газов, таких как H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> при ферментативном метаболизме представляет собой показатель ферментационной способности и скорости ферментации. При этом наибольшая выработка газообразных метаболитов наблюдалась через 6-24 ч. Здесь, как и во время всего исследования в целом, мультиштаммовый продукт значительно превосходил контрольный (рис. 3).

Рис. 3. Образование H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> у синбиотического Multi-STEM и контрольного продукта во время периода исследования, равного 48 часам. Наибольшая активность наблюдалась при тестировании продукта в период 6-24 ч.



## 2. Выработка метаболитов как результат бактериальной активности

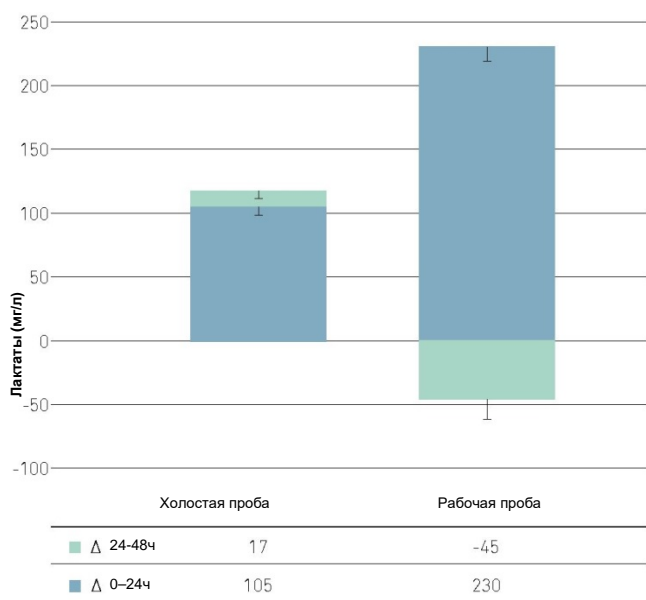
### 2.1. Повышенное образование лактата

Лактат — основной метаболит лакто- и бифидобактерий, содержащихся в тестируемом мультиштаммовом продукте. Он служит в качестве пищевого субстрата для других полезных видов кишечной флоры и, таким образом, стабилизирует их заселение и продолжительность жизни. Кроме того, лактат оказывает бактерицидное действие на патогенные микробы. Он необходим в качестве исходного вещества для образования полезных для здоровья субстратов бутирата и пропионата, которые синтезируются в кишечнике бутират- или пропионат-продуцирующими бактериями.

В течение первых 24 часов бактерии тестируемого и контрольного продуктов показали высокую ферментативную активность ферментации, что сопровождалось повышенным образованием лактата, при этом показатель синтеза лактата для мультиштаммового продукта был более чем в два раза выше, чем для контрольного. Уровень лактата определяется, во-первых, выработкой лактата бифидобактериями и лактобациллами мультиштаммового продукта, а также наличием лактобактериальной флоры фекального инокулюма, и во-вторых, уровнем потребления лактата пропионат- и бутират-продуцирующими бактериями инокулюма.

Во второй фазе (24-48 ч) у тестируемого продукта преобладает потребление лактата (рис. 4) в пользу увеличения образования короткоцепочечных жирных кислот, таких как ацетат, бутират и пропионат (рис. 5).

**Рис. 4** Количество лактата, произведённое мультиштаммовым продуктом и контрольным продуктом в течение двух фаз инкубационного периода. Отрицательный лактатный баланс тестируемого продукта через 24-48 часов иллюстрирует превращение лактата соответствующими кишечными бактериями в короткоцепочечные жирные кислоты, такие как пропионат

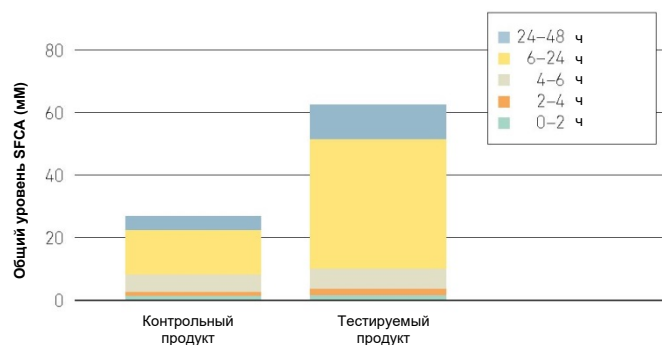


## 2.2 Повышенный синтез короткоцепочечных жирных кислот

Преобразование неудобоваримых углеводов в короткоцепочечные жирные кислоты, такие как ацетат, пропионат и бутират, как конечные продукты бактериального метаболического процесса рассматривается как важный пример положительного влияния полезной микрофлоры кишечника на здоровье. Например, пропионат снижает синтез холестерина в печени, в то время как ацетат служит источником энергии для других бактерий (кроссфидинг). Бутират, в свою очередь, является основным энергетическим субстратом для мукозных клеток. Пропионат, ацетат и бутират вместе поддерживают функциональные процессы в толстой кишке и подавляют развитие патогенных микроорганизмов.

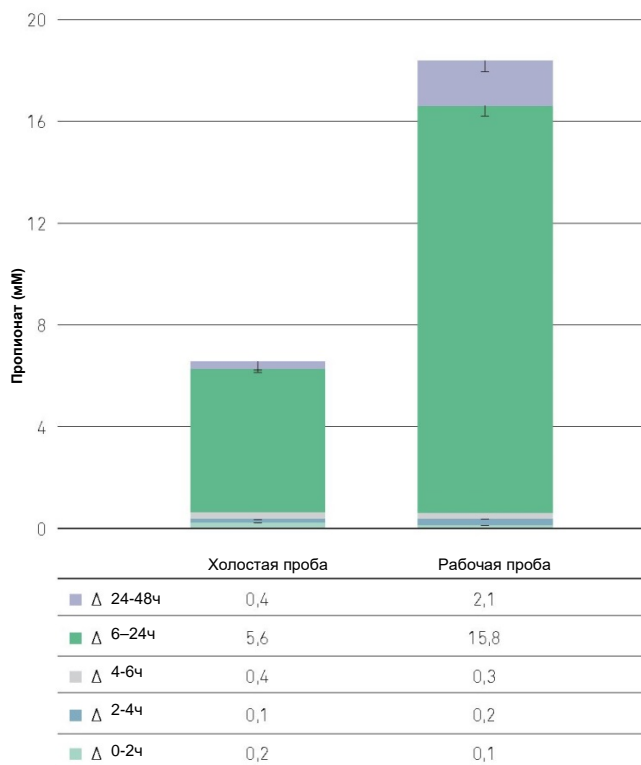
С другой стороны, образование короткоцепочечных разветвленных жирных кислот (b-SCFA), таких как изобутират, изовалерат и изокапроат, связано с протеолитической активностью некоторых бактерий. B-SCFA ассоциируются с образованием токсичных веществ, таких как p-крезол. Поэтому благоприятным для здоровья считается сокращение их количества. Результаты по b-SCFA представлены в пункте 2.3.

**Рис. 5** Средний объём выработки короткоцепочечных жирных кислот при интервенции симбиотического мультиштаммового продукта и, соответственно, контрольного продукта на 48 часов. В течение 6-24 часов образование SCFA в тестируемом продукте было выше, чем в контрольном, более чем в два раза.



Выработка короткоцепочечных жирных кислот под действием симбиотического мультиштаммового продукта было наиболее выражено в интервале 6-24 часов. В целом, общее значение по сравнению с контрольным продуктом (30 mM) для тестируемого продукта (> 60 mM) было более чем в два раза выше. Это свидетельствует о том, что высокая ферментационная способность лактобактерий и бифидобактерий тестируемого продукта действительно приводит к выработке микрофлорой кишечника полезных SCFA (рис. 5).

**Рис. 6** Выработка короткоцепочечной жирной кислоты пропионат путём интервенции симбиотического мультиштаммового продукта и, соответственно, контрольного продукта на протяжении 48 часов. Резкое увеличение в течение 6-24 часов является следствием также значительно увеличившейся выработки лактата.

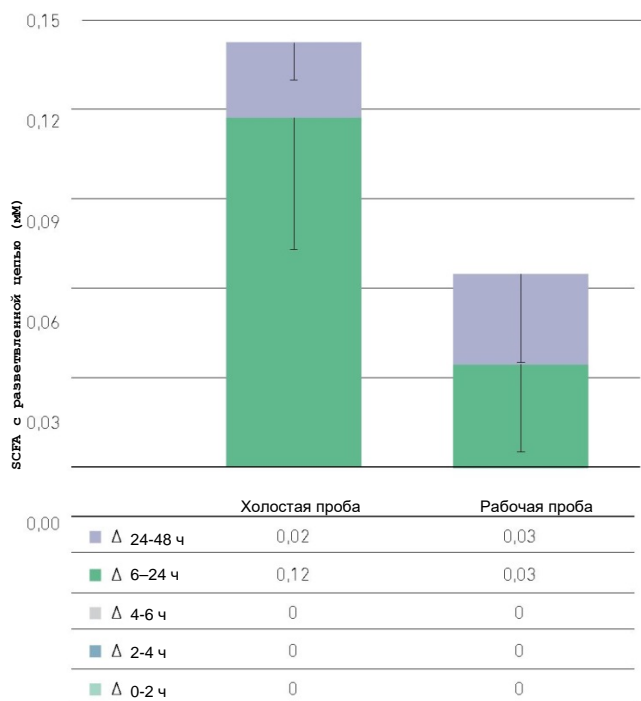


Особенно выраженным в этой схеме эксперимента было образование пропионата присутствующими повсеместно бактериями *Bacteroides* и/или *Veillonellaceae*. Повышение уровня пропионата происходило в основном в период 6-24 ч, в течение которого также наблюдалась максимальная выработка лактата (исходного субстрата для синтеза пропионата) (рис. 6).

### 2.3 Сокращение количества нежелательных негативных маркеров

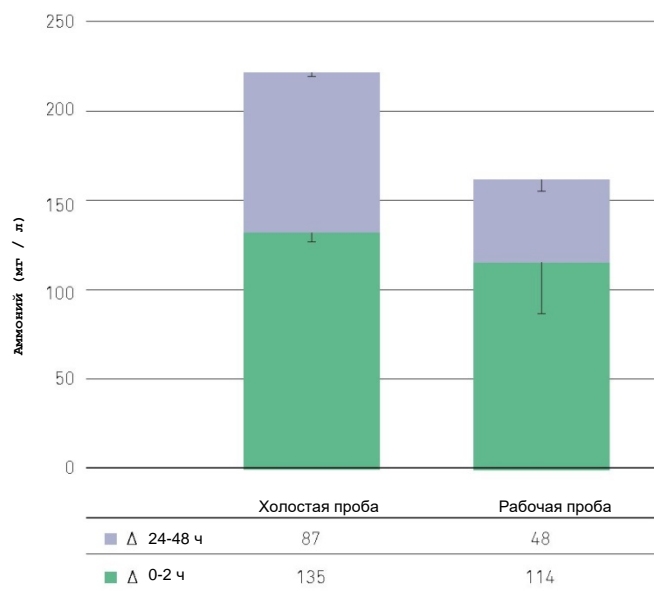
Аммоний ( $\text{NH}_4^+$ ) и разветвленные SCFA (b-SCFA) образуются как продукты распада протеолитической ферментации и являются отрицательными маркерами. Аммоний – это нейротоксин, который затрудняет процессы детоксикации в организме. Образование b-SCFA связано с появлением p-крезола. Крезолы имеют канцерогенный потенциал и также оцениваются критически.

Рис. 7 Количество разветвленных SCFA при интервенции синбиотическим мультиштаммовым продуктом и, соответственно, контрольным продуктом на протяжении 48 часов. В течение первых 6 часов разветвленно-цепочечные SCFA не были обнаружены. В фазе 6-48 часов в контрольном продукте было обнаружено более чем в два раза большее значение, чем в тестируемом продукте.



Как по концентрации аммония, так и по образованию b-SCFA мультиштаммовый продукт показал значительно лучшие значения, чем контрольный. В течение 48-часового интервала в тестируемом продукте было обнаружено 162 мг аммония/л, а в контрольном – 222 мг/л. В этом интервале образование b-SCFA составляло 0,06 мМ для тестируемого продукта, а для контрольного – 0,14 мМ (рис. 7 и 8).

Рис. 8 Образование аммония при интервенции синбиотическим мультиштаммовым продуктом и, соответственно, контрольным продуктом на протяжении 48 часов. Общее образование аммония для контрольного продукта было значительно выше, чем для тестируемого продукта.



## Выводы

Эффекты целенаправленного привнесения лактобацилл и бифидобактерий в человеческий кишечник трудно наблюдать на модели человека через косвенные маркеры, потому что желудочно-кишечный тракт человека является труднодоступным для прямого исследования. По этой причине представляется целесообразным проследить изменения, которые вызывает соответствующий продукт, используя «Симулятор кишечной микробной экосистемы человека» (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem – SHIME®).

Эта стандартизированная и валидированная динамическая желудочно-кишечная модель имитирует физические свойства (температуру, pH, анаэробную среду, движение), ферментативные и биохимические процессы на протяжении всего пищеварительного тракта. При этом эффекты интервенции лактобактериями можно непосредственно измерить и сравнить с контрольным продуктом (отсутствие интервенции).

Синбиотический мультиштаммовый продукт (Biogena Omni Lactis® 10 Caps) в течение всего периода тестирования в этой стандартизированной модели *in vitro* показал высокую ферментативную активность, снижение уровня pH и увеличение образования SCFA. Исследуемая комбинация лакто- и бифидобактерий в сочетании с инулином обладает высоким синбиотическим потенциалом. Эффективность по сравнению с контрольным продуктом, доказанная *in vitro*, свидетельствует об эффективности смеси в кишечной среде.

Применение про- и синбиотических продуктом приобретает всё большее значение в профилактике и в терапии. Тем важнее становятся надёжные данные об эффективности применяемых лактобактериальных смесей. До сих пор такие доказательства для большинства продуктов не были получены. Biogena Omni Lactis® 10 Caps — один из немногих продуктов, доказавших свою эффективность.

Зальцбург, июль 2017 г.

## Авторы исследования Компании «Biogena»:



**Барбара Фэт-Нойбауэр**  
Дипломированный экотрофолог.  
Руководитель отдела НИОКР Компании Biogena



**Д-р Ина Фибан**  
Ответственная за планирование исследований  
научного отдела Компании Biogena

## Библиография

- (1) Mayer, E. A. et al. 2015. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest.* 125 (3): 926-38.
- (2) Li, Q. et al. 2017. The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Neurosci.* 11: 120.
- (3) Kim, D. et al. 2017. The interplay between host immune cells and gut microbiota in chronic inflammatory diseases, *Exp Mol Med.* 49(5): e339.
- (4) Tojo, R. et al. 2014. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol.* 20 (41):1 51 63-76.
- (5) Roberfroid M. et al. 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr.* 104 (Suppl 2): C1-63.
- (6) Derrien, M., Veiga, P 2017. Rethinking Diet to Aid Human-Microbe Symbiosis. *Trends Microbiol.* 25 (2): 1 00-1 2.
- (7) Rios-Covian, D. et al. 2016. Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Front Microbiol.* 7: 185.
- (8) Van de Wiele, T. et al. 2015. Глава 27: The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). В: The Impact of Food Bioactives on Health. Springer International Publishing. С. 305-1 7.
- (9) ProDigest. 2017. Evaluation of the effect of Omni Lactis® в short-term experiments using Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®).