



УДК 57.085.19

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА “СИМБІТЕР АЦИДОФІЛЬНИЙ” НА МІКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА ТА ФУНКЦІОНАЛЬНУ АКТИВНІСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНИХ МАКРОФАГІВ ЩУРІВ ІЗ ГЛУТАМАТНИМ ОЖИРІННЯМ

**В. В. Позур¹, М. П. Рудик¹, Т. М. Сергійчук¹, В. М. Святецька¹, І. В. Акуленко¹,
Д. С. Янковський², Г. С. Димент², Т. В. Берегова¹, Л. І. Остапченко¹**

¹Київський національний університет ім. Т. Шевченка, ННЦ “Інститут біології”
просп. Академіка Глушкова, 2, корп. 12, Київ 03022, Україна
e-mail: r_life@bigmir.net

²Науково-виробнича компанія “О.Д. Пролісок”
с. Велика Ольшанка, Васильківський р-н, Київська обл. 08671, Україна

Розвиток глутаматного ожиріння спричиняв достовірне зниження кількості представників роду *Lactobacillus* на 2 порядки, як у фекальному, так і в пристінковому біоптаті щурів і збільшення кількості аеробних мікроорганізмів видів *E. coli* та *S. aureus*. Використання препарату “Симбітер ацидофільний” повністю запобігало кількісним змінам мікрофлори як у пристінковому, так і у фекальному біоптаті. Характер імунomodulatory дії препарату в умовах розвитку ожиріння залежав від статі тварин. У щурів жіночої статі застосування “Симбітеру ацидофільного” спричиняло відновлення пригніченої розвитком ожиріння функціональної активності перитонеальних макрофагів із рекрутингом мононуклеарних фагоцитів у перитонеальну порожнину. Позитивні зміни у мікробіоті й імунній реактивності перитонеальної порожнини у самиць, котрі отримували пробіотичний препарат, супроводжувалося зниженням вагових показників жирової тканини різної локалізації. У тварин чоловічої статі застосування пробіотичного препарату також супроводжувалося рекрутингом мононуклеарів у перитонеальну порожнину. Метаболічний профіль цих клітин мав прозапальну спрямованість. Незважаючи на позитивні зміни у мікробіоті, спричинені вживанням пробіотики, вірогідних змін у вагових індексах жирової тканини у цих тварин не було.

Ключові слова: глутаматне ожиріння, мікрофлора кишечника, пробіотики, хронічне запалення, перитонеальні макрофаги.

ВСТУП

Глутамат натрію – харчова добавка, що забезпечує один із п'яти основних смаків – “м'ясний” (або умами) – харчовим продуктам і тим самим підвищує їхню смакову привабливість. Глутамати наявні також у складі продуктів дитячого харчування, особливо гіпоалергенних, і вакцинних препаратів для дітей [5, 8]. Результатами численних експериментальних досліджень і клінічних спостережень доведено, що

глутамат натрію, особливо застосований у ранньому дитинстві, викликає руйнування нейронів дугоподібного ядра гіпоталамусу, зміни метаболізму жирової тканини з хронічною гіперлептинемією і розвитком так званої нейро-ендокринної форми ожиріння [3, 21].

Розвиток дієт-індукованого ожиріння супроводжується порушенням мікробно-го гомеостазу шлунково-кишкового тракту, який проявляється підвищенням співвідношення *Firmicutes: Bacteroidetes*, зниженням відносної кількості біфідобактерій і лактобацил одночасно зі збільшенням відносної кількості умовно патогенних бактерій [22]. Зміни мікробіоти, асоційовані з розвитком глутамат-індукованого ожиріння, досліджені значно менше. Відомо, що глутамат натрію сприяє колонізації кишечника *Faecalibacterium prausnitzii* і бактеріями роду *Roseburia* [6]. Порушення складу кишкової мікрофлори негативно впливає на імунну реактивність у кишечнику з розвитком запальних процесів, порушенням цілісності кишкового бар'єру з підвищенням проникності кишкової стінки, наслідком чого є системна ендотоксемія і генералізація асоційованого з ожирінням запалення [7].

Клітини вродженого імунітету, особливо макрофаги, сприяють запаленню вісцеральної жирової тканини і формуванню резистентності до інсуліну. Інфільтрація макрофагами вісцерального жиру прямо корелює зі ступенем ожиріння і значно зростає в період накопичення жиру зі сильним підвищенням ваги. При цьому макрофаги можуть становити до 40 % усіх клітин жирової тканини. Макрофаги сприяють гіпертрофії адипоцитів, що супроводжується збільшенням їхньої функціональної активності, підвищенням синтезу цитокінів жировими клітинами і веде до подальшого посилення запальної відповіді [19]. Генералізація запалення, ініційованого у жировій тканині, починається зі зміни метаболізму клітин імунної системи сусідніх тканин і порожнин. Перитонеальні макрофаги перебувають у безпосередньому контакті з жировою тканиною, асоційованою з органами черевної порожнини, тому напрям їх функціональної поляризації має суттєве значення у процесі системного поширення асоційованого з ожирінням запалення і може залежати від ефекту біологічно активних речовин, що синтезуються адипоцитами [23].

Пробіотики справляють різноспрямований модуляторний вплив на імунну реактивність як на локальному рівні, так і системно. Локальна дія пробіотичних мікроорганізмів асоційована зі збільшенням кількості Іg А-позитивних клітин і макрофагів у тонкому кишечнику [12]. Пробіотичні бактерії здатні інгібувати продукцію ІЛ-6, ІЛ-8 і стимулювати продукцію ІЛ-10, знижувати активність NF-κB, ФНО-α, ІФН-γ [12]. Пробіотичні як моно-, так і полікомпонентні препарати здатні також справляти про-запальну імуномодуляторну дію [1, 18]. Системний вплив пробіотичних препаратів полягає у підвищенні рівня неспецифічної клітинної імунної відповіді, яка характеризується активацією макрофагів, натуральних кілерів тощо [9, 20].

Метою цієї роботи була оцінка впливу мультипробіотика "Симбітер ацидофільний", застосованого при глутаматному ожирінні, на мікрофлору кишечника і функціональну активність перитонеальних макрофагів щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У роботі було використано 24 щурі лінії Wistar чоловічої та жіночої статі. Тварини були поділені на три групи по вісім у кожній. Новонародженим щурам групи I (контроль) вводили фізіологічний розчин об'ємом 8 мкл/г ваги підшкірно на 2-й, 4-й, 6-й, 8-й і 10-й день після народження [17]. Ожиріння модулювали шляхом введення новонародженим щурам II і III груп глутамату натрію, розведеного у фізіологічному

розчині з концентрацією 4 мг/л в об'ємі 8 мкл/г підшкірно на 2-й, 4-й, 6-й, 8-й і 10-й день після народження. Контроль розвитку ожиріння здійснювали стандартними методами з оцінкою вагових індексів жирової тканини різної локалізації.

Введення пробіотика "Симбітер ацидофільний" було розпочато тваринам у віці 1 місяця і тривало протягом 3 місяців, з чергуванням 2-тижневого курсу введення з 2-тижневим курсом перерви. Пробіотик вводили у фізіологічному розчині в дозі 14 мг/г ваги тіла в об'ємі 200 мкл. Зміни маси тіла в усіх групах щурів були проаналізовані протягом 4 місяців з моменту народження. У віці чотирьох місяців проводили евтаназію тварин, яку здійснювали способом декапітації під ефірним наркозом.

Усі дослідження на тваринах виконано у відповідності до Гельсінської декларації (Всесвітня медична асамблея, 1964), Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Декларації принципів толерантності (28 сесія ЮНЕСКО, 1995), Універсальної декларації з біоетики і прав людини (ООН, 1997), норм Конвенції про захист прав людини у зв'язку з впровадженням нових біомедичних технологій, прийнятої у 1997 році в м. Ов'єдо (Іспанія) та підписаною Верховною Радою України у 2002 році, Закону України № 3447 IV "Про захист тварин від жорстокого поводження" (Протокол № 8 від 02.11.2015 засідання комісії з питань біоетики ННЦ "Інститут біології" Київського національного університету імені Тараса Шевченка).

Вісцеральні жирові тканини видалляли і зважували, розраховували індекс маси тіла (ІМТ) (відношення маси тіла (г) до квадрату довжини тіла (см²)).

"Симбітер ацидофільний" (SYMBITER® ACIDOPHILUS, ТОВ „Пролісок”, Україна) містить біомасу живих клітин симбіозу пробіотичних мікроорганізмів, КУО/мл, не менш ніж: лактобацили і лактококи – $1,0 \times 10^9$, біфідобактерії – $1,0 \times 10^8$, пропіоновокислі бактерії – $3,0 \times 10^7$, оцтовокислі бактерії – $1,0 \times 10^5$.

Дослідження мікробіоти здійснювали бактеріологічним методом: висівом 10-кратних розведень фекалій і 1 см² слизової товстої кишки на відповідні диференційно-селективні середовища [14].

Киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів визначали за відновленням нітросинього тетразолію (НСТ-тест) згідно з методикою В.Г. Передерій та ін. [13]. Оптичну густину диформазану визначали при $\lambda = 630$ нм.

Для характеристики продукції NO перитонеальними макрофагами визначали рівень продукції ними нітритів у реакції Гріса [16]. Рівень нітритів, визначений з використанням екстраполяції значень екстинції на калібрувальну криву, представляли з розрахунку на 10^6 живих клітин.

Фагоцитарну активність лейкоцитів досліджували за методом В. Cantinieaux et al. [2] із незначними модифікаціями.

Внутрішньоклітинну продукцію реактивних форм кисню (РФК) визначали методом проточної цитофлуориметрії з використанням дихлородигідрофлуоресцеїну діацетату (ДФХ-ДА) ("Sigma Aldrich", USA) [24].

Для стимуляції метаболізму фагоцитів застосовували форболовий ефір форболмеристатацетат (ФМА).

Статистичну обробку результатів проводили загальноприйнятими методами варіаційної статистики з розрахунком середнього значення (М), середнього квадратичного відхилення (σ) та середньої квадратичної похибки (m). Для визначення вірогідності відмінності показників між дослідом і контролем використовували t-критерій Стьюдента [15].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Розвиток глутаматного ожиріння мав різні особливості у тварин різної статі. У самиць він супроводжувався зростанням вагових показників вісцеральної жирової тканини майже удвічі, появою підшкірного та значної кількості латерального жиру, зміни у кількості гонадального жиру не зареєстровані (рис. 1).

Введення пробіотичного препарату тваринам жіночої статі у процесі моделювання ожиріння супроводжувалося значно меншими змінами вагових показників жирової тканини різної локалізації порівняно з контролем. Вагові показники вісцерального, гонадального та підшкірного жиру не відрізнялися від таких у інтактних тварин. Спостерігали появу латерального жиру, вагові індекси якого були майже удвічі нижчими за аналогічні показники у контрольних тварин із ожирінням.

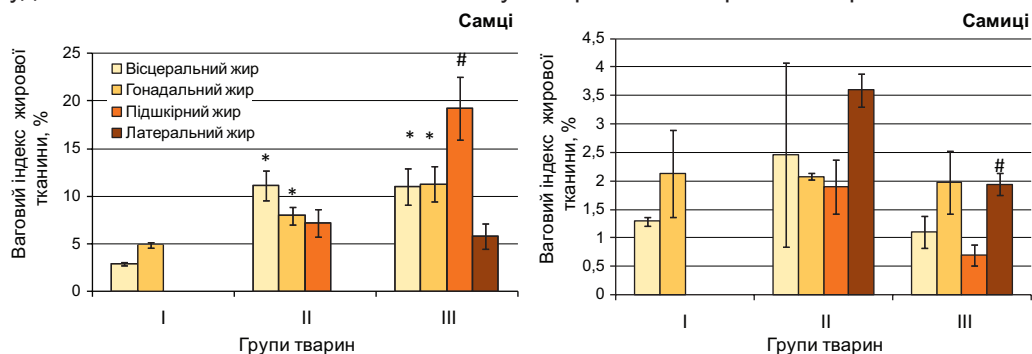


Рис. 1. Вплив препарату “Симбітер ацидофільний” концентрований на вагові показники жирової тканини різної локалізації у щурів із глутаматним ожирінням. Група I – контрольні тварини (n = 8); група II – тварини з ожирінням (n = 8); група III – тварини з ожирінням, яким вводили пробіотичний препарат (n = 8)

Примітки: * – $p < 0,05$ щодо показників щурів відповідної контрольної групи; # – $p < 0,05$ щодо показників щурів із ожирінням

Fig. 1. The effect of “Symbiter acidophilic” drug on weight of adipose tissue in rats with glutamate obesity. Group I – intact rats (n = 8); group II – rats with glutamate obesity (n = 8); group III – rats with glutamate obesity + „Symbiter acidophilic” (n = 8)

Comments: * - $p < 0.05$ compared to intact rats; # – $p < 0.05$ compared to rats with obesity

У самців розвиток глутаматного ожиріння асоціювався зі збільшенням відносної ваги вісцерального (в 4,6 разу), гонадального (в 1,6 разу) і появою підшкірного жиру.

Вірогідних змін вагових індексів вісцеральної та гонадальної жирової тканини на тлі застосування пробіотичного препарату у тварин чоловічої статі не було. У цьому разі статистично достовірно зростала кількість підшкірного жиру (на 12 %) і з'являлася латеральна жирова тканина.

Вплив мультипробіотиків групи “Симбітер ацидофільний” на мікрофлору кишечника. Як зазначалося вище, більшість результатів експериментальних досліджень і клінічних спостережень вказують на те, що у разі ожиріння мають місце типові зміни мікробіоти товстої кишки – збільшення кількості мікроорганізмів групи *Firmicutes* і зменшення кількості *Bacteroidetes*. Інші автори зазначають, що у разі ожиріння зменшується кількість біфідобактерій, проте зростає кількість *Staphylococcus aureus*. Суперечливі результати наводять різні автори щодо змін представників роду *Lactobacillus*. Одні вказують на те, що їхня кількість суттєво зростає, інші – наводять результати з достовірним зменшенням кількості лактофлори [10, 11].

У наших дослідженнях при глутамат-індукованому ожирінні зареєстровано помірні зміни мікрофлори товстої кишки. Статевих відмінностей у зміні мікробіоти не спостерігали (тому наведено загальні усереднені значення для тварин обох статей) (табл. 1).

Таблиця 1. Вплив препарату “Симбітер ацидофільний” концентрований на мікрофлору фекального біоптату щурів із глутаматним ожирінням

Table 1. The effect of “Symbiter acidophilic” drug on microflora of fecal biopsy in rats with glutamate obesity

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів (lg КУО/г)		
	Група I, n = 8	Група II, n = 8	Група III, n = 8
<i>Bifidobacterium</i>	9,0±0,2	8,1±0,5	8,3±0,2
<i>Lactobacillus</i>	8,0±0,5	6,0±0,1*	8,0±0,5
<i>E. coli</i> (лак+)	4,2±1,2	5,9±0,5	4,0±0,2
<i>E. coli</i> (лак-)	1,2±0,9	0,9±0,3	3,1±0,4*
Умовно-патогенні ентеробактерії	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2±0,2	6,1±1,2*	4,6±0,2
<i>Staphylococcus</i> sp. (манітонегативні)	3,0±0,9	3,4±1,0	1,8±0,1
<i>Clostridium</i> sp.	2,9±0,1	2,9±0,2	2,9±0,2
<i>Candida</i> sp.	3,4±0,5	4,2±0,5	3,0±0,9
Гемолітична мікрофлора	6,0±0,5	7,0±0,1	3,8±0,9*

Примітки: група I – контрольні тварини (n = 8); група II – тварини з ожирінням (n = 8); група III – тварини з ожирінням, яким вводили пробіотичний препарат (n = 8); * – p<0,05 щодо показників щурів контрольної групи

Comments: Group I – intact rats (n = 8); group II – rats with glutamate obesity (n = 8); group III – rats with glutamate obesity + “Symbiter acidophilic” (n = 8); * – p <0.05 compared to intact rats

За результатами досліджень анаеробних цукролітичних представників мікробіоти було з'ясовано, що кількість *Bifidobacterium* при розвитку глутаматного ожиріння залишалася в межах норми. У випадку представників роду *Lactobacillus* відмічали достовірне їх зниження на два порядки. Кількість представників мікрофлори зазначених видів у тварин із ожирінням (обох статей), яким вводили мультипробіотик “Симбітер ацидофільний”, не відрізнялася від такої у контролі. Виразні зміни відмічали при ожирінні з боку кишкової палички. Титри *E. coli* з нормальними ферментативними властивостями зростали з lg 4,2±1,2 КУО/г у контролі до lg 5,9±0,5 КУО/г при ожирінні.

У групі тварин, які отримували глутамат натрію і “Симбітер ацидофільний”, кількість *E. coli* залишалась у межах, властивих інтактним тваринам. Слід відмітити, що у тварин із ожирінням, котрі отримували пробіотичний препарат, зростала кількість *E. coli* зі зміненими ферментативними властивостями. Дослідження механізму виявленого феномена потребує додаткових досліджень. Умовно-патогенні бактерії у фекальному біоптаті тварин із ожирінням не виявлялися. Вживання пробіотичного препарату не впливало на цей показник. Також під час моделювання ожиріння відмічали статистично вірогідне підвищення кількості аеробних умовно-патогенних мікроорганізмів *Staphylococcus aureus*, введення препарату “Симбітер ацидофільний” запобігало зростанню їхньої кількості.

Більшість дослідників вказують на те, що у складі мікробіоти товстої кишки людини за дієт-індукованого ожиріння, відмітною особливістю якого є високий вміст полінасичених жирів і вуглеводів у раціоні харчування, реєструється зростання титрів *Clostridium* sp. [4]. Варто зазначити, що у процесі розвитку глутаматного ожиріння, характер якого є нейро-ендокринним, цю закономірність не спостерігали. Кількість клостридій була в межах $1g\ 2,9 \pm 0,1$ КУО/г. Застосування пробіотичного препарату не впливало на цей показник. Зареєстровано тенденцію до незначного збільшення у фекальному біоптаті під час розвитку глутаматного ожиріння кількості дріжджоподібних грибів роду *Candida* sp. Застосування пробіотичного препарату запобігало патологічним змінам цього показника.

Звертають на себе увагу досить високі титри гемолітичної мікробіоти у групі інтактних тварин. У тварин із глутаматним ожирінням кількість гемолітичної мікрофлори ще більше підвищувалась. У групі тварин, яким під час моделювання ожиріння вводили “Симбітер ацидофільний”, ці показники були статистично вірогідно нижчими порівняно з показниками контрольних тварин із ожирінням та інтактних тварин.

У процесі аналізу впливу мультипробіотичного препарату “Симбітер ацидофільний” на пристінкову мікрофлору товстої кишки тварин з експериментальним глутамат-індукованим ожирінням, проведений із розрахунку на cm^2 епітелію, з’ясовано таке (табл. 2). У контрольних тварин у пристінковому біоптаті не виявляли представників таких родів як *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp., *Candida* sp. та умовно-патогенні ентеробактерії. Зі зазначених представників мікрофлори у пристінковому біоптаті у разі глутаматного ожиріння виявляли тільки представників виду *Staphylococcus aureus*.

Таблиця 2. Мікрофлора пристінкового біоптату товстої кишки щурів із глутаматним ожирінням, яким вводили “Симбітер ацидофільний”

Table 2. The effect of “Symbiter acidophilic” drug on microflora of biopsy of colonic wall in rats with glutamate obesity

Мікроорганізми	Кількість мікроорганізмів (Ig КУО/см ²)		
	Група I, n = 8	Група II, n = 8	Група III, n = 8
<i>Bifidobacterium</i>	4,0±0,6	4,2±0,2	4,5±0,2
<i>Lactobacillus</i>	3,9±0,5	3,0±0,2	5,0±0,2*
<i>E. coli</i> (лак+)	0	0	0,6±0,2
<i>E. coli</i> (лак-)	0	0	0,3±0,2
Умовно-патогенні ентеробактерії	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1,0±0,2*	0
<i>Staphylococcus</i> sp. (манітонегативні)	0,8±0,9	0	0
<i>Clostridium</i> sp.	0	0	0
<i>Candida</i> sp.	0	0	0
Гемолітична мікрофлора	2,5±0,9	2,9±0,7	1,6±0,2

Примітки: група I – контрольні тварини (n = 8); група II – тварини з ожирінням (n = 8); група III – тварини з ожирінням, яким вводили пробіотичний препарат (n = 8); * – p<0,05 щодо показників щурів контрольної групи

Comments: Group I – intact rats (n = 8); group II – rats with glutamate obesity (n = 8); group III – rats with glutamate obesity + “Symbiter acidophilic” (n = 8); * – p <0.05 compared to intact rats

Застосування пробіотичного препарату запобігало появі цього мікроорганізму у складі пристінкової мікрофлори. Зміни анаеробної цукролітичної мікробіоти при глутаматному ожирінні за умов застосування пробіотичного препарату були аналогічними таким для фекального біоптату.

Таким чином, розвиток глутаматного ожиріння супроводжувався змінами мікробіоти товстої кишки, найбільш виразними з яких були зниження кількості представника анаеробної цукролітичної мікрофлори *Lactobacillus* і зростання кількості аеробних умовно-патогенних бактерій. Застосування пробіотичного препарату “Симбітер ацидофільний” запобігало формуванню патологічних змін мікробного різноманіття.

Вплив мультипробіотиків групи “Симбітер” на функціональну активність фагоцитів перитонеальної порожнини. Відмінною особливістю пробіотичного препарату “Симбітер ацидофільний” є принцип компонування штамів пробіотичних мікроорганізмів, в основі якого лежить мутуалістичний мультисимбіоз його конститuentів зі синергізмом за низкою біологічних властивостей. Характер імуномодуляторної дії пробіотичних препаратів із таким складом практично не досліджений.

Позаклітинна продукція реактивних форм кисню (РФК) є важливою функціональною характеристикою перитонеальних макрофагів, необхідною для виконання ними захисних функцій, а рівень їх продукції може відображати напрям функціональної поляризації фагоцитів. Як видно з рис. 2, у щурів обох статей розвиток ожиріння супроводжувався зниженням екзоцитозу РФК перитонеальними фагоцитами, більш виразним у самиць (на 23 % порівняно з контролем), ніж у самців (на 10 % порівняно з контролем).

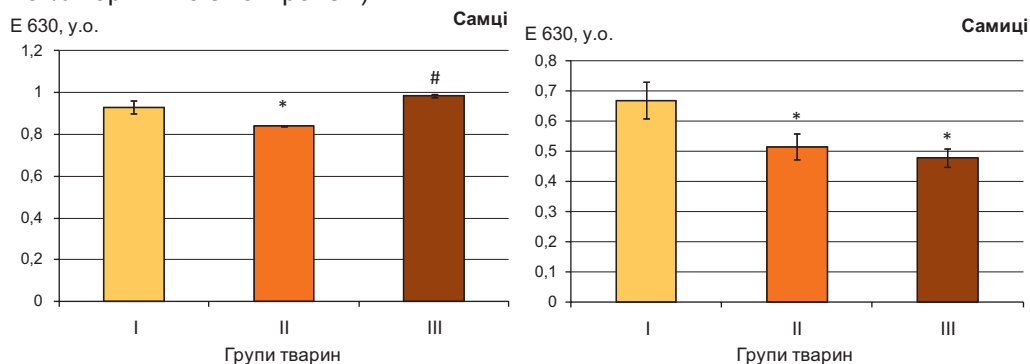


Рис. 2. Вплив препарату “Симбітер ацидофільний” на екзоцитоз реактивних форм кисню перитонеальними макрофагами щурів із глутаматним ожирінням. Група I – контрольні тварини (n = 8); група II – тварини з ожирінням (n = 8); група III – тварини з ожирінням, яким вводили пробіотичний препарат (n = 8)

Примітки: * – p<0,05 порівняно з показниками тварин контрольної групи; # – p<0,05 порівняно з показниками тварин із ожирінням

Fig. 2. The effect of “Symbiter acidophilic” drug on extracellular ROS production in peritoneal macrophages of rats with glutamate obesity. Group I – intact rats (n = 8); group II – rats with glutamate obesity (n = 8); group III – rats with glutamate obesity + „Symbiter acidophilic” (n = 8)

Comments: * – p<0.05 compared to intact rats; # – p<0.05 compared to rats with obesity

Застосування пробіотичного препарату “Симбітер ацидофільний” не впливало на цей показник у тварин жіночої статі й спричиняло посилення оксидативного екзометаболізму перитонеальних макрофагів у самців. Показник екзоцитозу реактивних форм кисню у тварин, котрі отримували пробіотичний препарат, був вищим

за аналогічний показник у тварин із ожирінням на 17 % і незначно перевищував аналогічний показник інтактних тварин.

Рівень продукції NO фагоцитами характеризує їх внутрішньоклітинний метаболізм аргініну та є одним із критеріїв оцінки функціональної поляризації цих клітин. Із одержаних даних видно (рис. 3), що розвиток глутамат-індукованого ожиріння спричиняв посилення продукції NO перитонеальними макрофагами самців на 26 % порівняно з таким у інтактних тварин.

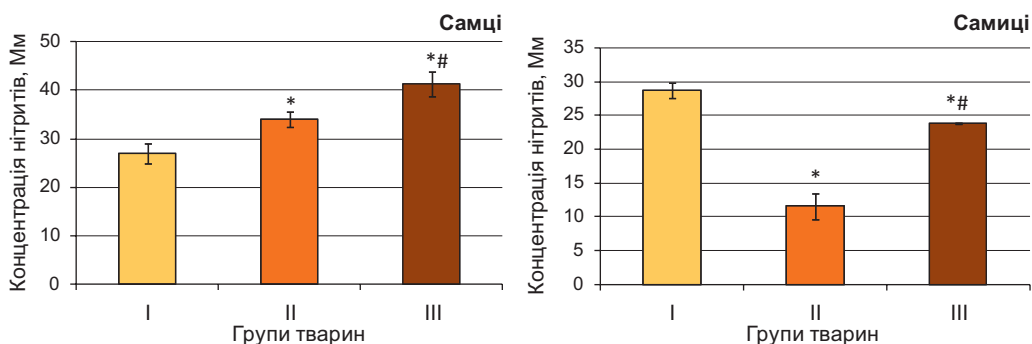


Рис. 3. Вплив препарату “Симбітер ацидофільний” на продукцію NO перитонеальними макрофагами у щурів із ожирінням. Група I – контрольні тварини (n = 8); група II – тварини з ожирінням (n = 8); група III – тварини з ожирінням, яким вводили пробіотичний препарат (n = 8)

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з показниками тварин контрольної групи; # – $p < 0,05$ порівняно з показниками тварин із ожирінням

Fig. 3. The effect of “Symbiter acidophilic” drug on NO production in peritoneal macrophages of rats with glutamate obesity. Group I - intact rats (n = 8); group II – rats with glutamate obesity (n = 8); group III – rats with glutamate obesity + „Symbiter acidophilic” (n = 8)

Comments: * – $p < 0.05$ compared to intact rats; # – $p < 0.05$ compared to rats with obesity

Такі результати можуть вказувати на прозапальну поляризацію перитонеальних макрофагів у тварин чоловічої статі, асоційовану з розвитком ожиріння.

Введення мультипробіотика “Симбітер ацидофільний” на тлі моделювання ожиріння супроводжувалося ще більш значним посиленням продукції NO перитонеальними фагоцитами (на 20 % від значень контрольних тварин із ожирінням). Це вказує на поглиблення прозапальної метаболічної поляризації макрофагів перитонеальної порожнини. У самиць розвиток ожиріння супроводжувався зниженням продукції перитонеальними фагоцитами NO на 60 %, порівняно зі значеннями інтактних тварин. Зважаючи на те, що фагоцити перитонеального ексудату самиць із ожирінням характеризувалися також зниженим киснезалежним метаболізмом, можна висловити припущення, що розвиток глутаматного ожиріння у тварин жіночої статі супроводжується пригніченням функціональної активності перитонеальних фагоцитів з протизапальною (M2) поляризацією їх метаболізму. Застосування пробіотичного препарату “Симбітер ацидофільний” у профілактичному режимі асоціювалося тільки з незначним зниженням продукції реактивних форм нітрогену перитонеальними фагоцитами самиць із ожирінням.

Отже, введення пробіотика “Симбітер ацидофільний” викликало зростання рівня продукції NO перитонеальних фагоцитів щурів із глутамат-індукованим ожирінням, що мало різні наслідки для тварин різної статі.

Внутрішньоклітинний оксидативний метаболізм перитонеальних фагоцитів у тварин різної статі з ожирінням відрізнявся. У самців спонтанна внутрішньоклітинна

продукція РФК перитонеальними фагоцитами зростала у 2,5 разу порівняно зі значеннями інтактних тварин (рис. 4). Додаткова обробка клітин ФМА активатором внутрішньоклітинного киснезалежного метаболізму не викликала змін зазначеного показника, що вказує на перебування цієї функції перитонеальних макрофагів на верхній межі активації.

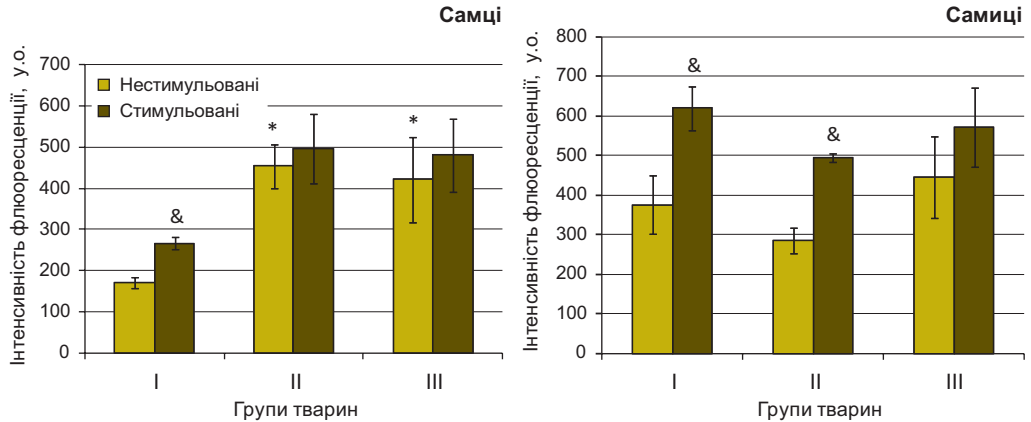


Рис. 4. Вплив препарату "Симбітер ацидофільний" на продукцію внутрішньоклітинних реактивних форм кисню (РФК) перитонеальними макрофагами щурів з ожирінням. Група I – контрольні тварини (n = 8); група II – тварини з ожирінням (n = 8); група III – тварини з ожирінням, яким вводили пробіотичний препарат (n=8)

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з показником тварин контрольної групи; & – $p < 0,05$ порівняно з показниками нестимульованих клітин відповідної групи

Fig. 4. The effect of "Symbiter acidophilic" drug on intracellular ROS production in peritoneal macrophages of rats with glutamate obesity. Group I – intact rats (n=8); group II – rats with glutamate obesity (n = 8); group III – rats with glutamate obesity + „Symbiter acidophilic” (n=8)

Comments: * – $p < 0.05$ compared to intact rats; & – $p < 0.05$ compared to spontaneous test in corresponding group

Застосування пробіотичного препарату на тлі моделювання глутаматного ожиріння практично не впливало на спонтанний внутрішньоклітинний киснезалежний метаболізм перитонеальних макрофагів самців.

У самиць розвиток глутаматного ожиріння був асоційований із незначним зниженням внутрішньоклітинного оксидативного метаболізму перитонеальних макрофагів і наявністю метаболічного резерву цієї функції, оскільки обробка клітин ФМА *in vitro* зумовлювала вірогідне посилення продукції РФК. Це підтверджує припущення щодо супресивного впливу глутаматного ожиріння на функції перитонеальних фагоцитів у тварин жіночої статі.

Застосування "Симбітеру ацидофільного" запобігало пригніченню внутрішньоклітинного оксидативного метаболізму фагоцитів із незначним зниженням метаболічного резерву цієї функції.

Отже, зміни внутрішньоклітинного оксидативного метаболізму в умовах розвитку глутаматного ожиріння у щурів і реакція цих клітин на пробіотичний препарат характеризувалися виразними статевими відмінностями.

Статевий диморфізм виявлявся й у впливі розвитку глутаматного ожиріння на фагоцитарну активність перитонеальних макрофагів. У інтактних тварин чоловічої статі у складі перитонеального ексудату були наявні переважно зрілі резидентні макрофаги, для яких характерною є здатність до ендоцитозу, про що вказує брак

реакції цих клітин на обробку форболовим ефіром *in vitro*. Під час розвитку ожиріння у самців спостерігалось достовірне зниження відносної кількості фагоцитуючих клітин у перитонеальній порожнині майже в 10 разів, порівняно з інтактними тваринами (рис. 5).

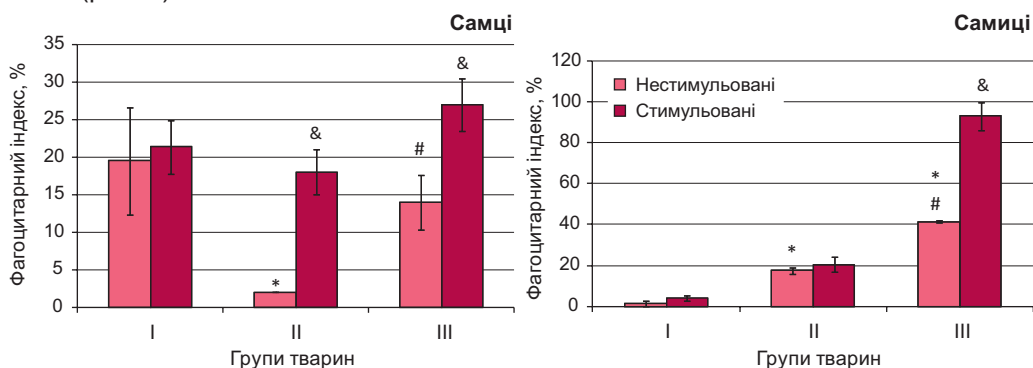


Рис. 5. Кількість фагоцитуючих перитонеальних макрофагів у щурів із глутаматним ожирінням у разі застосування препарату “Симбітер ацидофільний”. Група I – контрольні тварини (n = 8); група II – тварини з ожирінням (n = 8); група III – тварини з ожирінням, яким вводили пробіотичний препарат (n = 8)

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно з відповідним показником тварин контрольної групи; # – $p < 0,05$ порівняно з відповідним показником тварин із ожирінням; & – $p < 0,05$ порівняно з показниками нестимульованих клітин відповідної групи

Fig. 5. The effect of “Symbiter acidophilic” drug on phagocytic index of peritoneal macrophages of rats with glutamate obesity. Group I – intact rats (n=8); group II – rats with glutamate obesity (n = 8); group III – rats with glutamate obesity + “Symbiter acidophilic” (n = 8)

Comments: * – $p < 0.05$ compared to intact rats; # – $p < 0.05$ compared to rats with obesity; & – $p < 0.05$ compared to spontaneous test in corresponding group

Обробка виділених перитонеальних фагоцитів тварин цієї групи ФМА *in vitro* спричиняла збільшення відносної кількості фагоцитуючих клітин у 4 рази, що може вказувати на наявність у перитонеальній порожнині незрілих форм клітин, ендодитоз яких активується за наявності стимуляторного чинника. Застосування мультипробіотичного препарату “Симбітер ацидофільний” запобігало зменшенню кількості фагоцитуючих клітин у популяції перитонеальних макрофагів самців. Такий показник у тварин, що отримали пробіотик, наближав до значень інтактних тварин. Однак у складі аналізованого клітинного пулу були незрілі клітини, що проявляли фагоцитарну функцію у разі додавання ФМА.

У самиць спостерігалася протилежна ситуація. У інтактних тварин цієї статі кількість перитонеальних фагоцитів зі здатністю до ендодитозу була значно нижчою, порівняно з аналогічним показником у самців. Відносна кількість фагоцитуючих клітин у популяції перитонеальних макрофагів тварин з ожирінням у 4 рази перевищувала контрольні показники. Додаткова стимуляція ФМА *in vitro* не викликала змін у кількості фагоцитуючих макрофагів, що вказує на переважання у досліджуваному пулі зрілих резидентних макрофагів. Застосування пробіотика у самиць було асоційоване зі значним збільшенням відносної кількості фагоцитуючих перитонеальних макрофагів до 41 %, що у 2,3 рази перевищувало показники контрольних тварин із ожирінням. Результати обробки цих клітин ФМА *in vitro* вказують на наявність в аналізованому пулі рекрутованих незрілих клітин, оскільки до фагоцитозу при цьому активувалося 93 % усіх клітин у перитонеальному ексудаті.

Отримані дані вказують на здатність пробіотика викликати рекрутинг мононуклеарних фагоцитів у перитонеальну порожнину.

Інтенсивність фагоцитозу перитонеальних мононуклеарних фагоцитів у самців з ожирінням у 13 разів перевищувала аналогічний показник інтактних тварин (рис. 6).

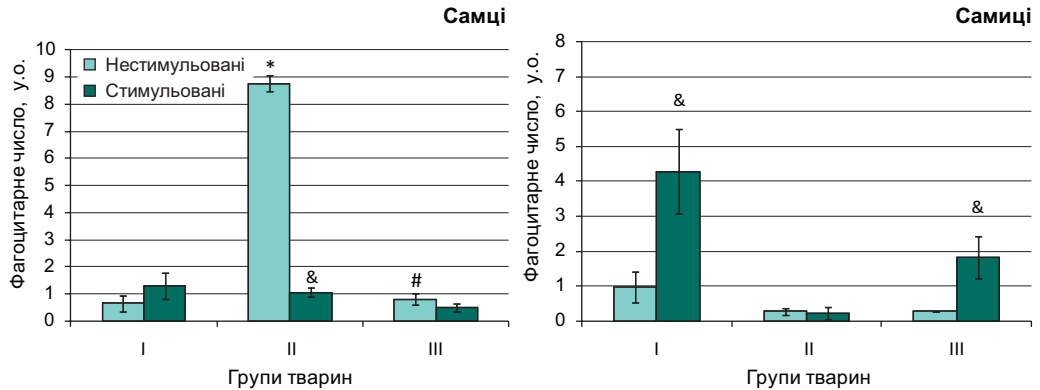


Рис. 6. Вплив препарату “Симбітер ацидофільний” на показники інтенсивності фагоцитозу перитонеальних макрофагів щурів із глутаматним ожирінням. Група I – контрольні тварини (n = 8); група II – тварини з ожирінням (n = 8); група III – тварини з ожирінням, яким вводили пробіотичний препарат (n = 8)

Примітки: * – $p < 0,05$ порівняно із відповідним показником тварин контрольної групи; # – $p < 0,05$ порівняно з відповідним показником тварин з ожирінням; & – $p < 0,05$ порівняно з показниками нестимульованих клітин відповідної групи

Fig. 6. The effect of “Symbiter acidophilic” drug on phagocytic activity of peritoneal macrophages of rats with glutamate obesity. Group I – intact rats (n = 8); group II – rats with glutamate obesity (n = 8); group III – rats with glutamate obesity + “Symbiter acidophilic” (n = 8)

Comments: * – $p < 0.05$ compared to intact rats. # – $P < 0.05$ compared to rats with obesity; & – $P < 0.05$ compared to spontaneous test in corresponding group

Клітини перебували на верхній межі метаболічної активності, про що свідчить їхня різко негативна реакція на обробку ФМА *in vitro*. У разі застосування пробіотика показник інтенсивності фагоцитозу перитонеальних фагоцитів самців із ожирінням перебував на рівні інтактних тварин. При цьому у клітинах щурів, яким вводили “Симбітер ацидофільний”, не було функціонального резерву фагоцитарної функції, оскільки не реєструвалася реакція на додаткову стимуляцію ФМА *in vitro*.

У самиць із ожирінням спостерігалось зниження інтенсивності фагоцитозу перитонеальних макрофагів майже утричі при значній індивідуальній варіабельності цього показника. Обробка клітин ФМА *in vitro* не викликала зростання фагоцитарного числа у макрофагів тварин із ожирінням. Отримані дані ще раз доводять пригнічувальну дію глутаматного ожиріння на функції перитонеальних фагоцитів. Застосування мультипробіотика “Симбітер ацидофільний” на тлі розвитку ожиріння супроводжувалося появою функціонального резерву фагоцитарної функції макрофагів перитонеального ексудату самиць (індекс модуляції цього показника становив 550 ум. од. і був вищим на 60 % за аналогічний показник для інтактних тварин, для яких індекс модуляції дорівнював 340 ум. од.). Одержані результати вказують на позитивний вплив застосованого пробіотичного препарату на метаболізм перитонеальних макрофагів у тварин із ожирінням жіночої статі.

ВИСНОВКИ

Застосування мультипробіотичного препарату “Симбітер ацидофільний” на тлі розвитку глутаматного ожиріння повністю запобігало кількісним змінам мікробного пейзажу як у пристінковому, так і у фекальному біоптаті. Імуномодуляторна дія препарату у тварин із ожирінням характеризувалася статевою диверсифікацією. У тварин жіночої статі застосування “Симбітеру ацидофільного” викликало відновлення пригніченої розвитком ожиріння функціональної активності перитонеальних макрофагів із рекрутингом незрілих форм мононуклеарних фагоцитів у перитонеальну порожнину. Позитивні зміни у мікробіоті й імунній реактивності перитонеальної порожнини у самиць, котрі отримували пробіотичний препарат, супроводжувалося зниженням вагових показників жирової тканини різної локалізації. У тварин чоловічої статі застосування пробіотичного препарату також супроводжувалося рекрутингом мононуклеарів у перитонеальну порожнину. Однак метаболічний профіль цих клітин характеризувався виразною прозапальною спрямованістю. Незважаючи на позитивні зміни у мікробіоті, спричинені вживанням пробіотика, вірогідні зміни у вагових індексах жирової тканини у цих тварин нами не зареєстровані. Причиною зазначеного феномена може бути системна запальна імунна реакція, ознаки якої виявлено за результатами аналізу метаболічного профілю перитонеальних фагоцитів.

Отримані результати дають підставу розглядати вживання мультипробіотичного препарату “Симбітер ацидофільний” як патогенетичний спосіб профілактики глутаматного ожиріння, а також зробити припущення щодо більшої ефективності дії препарату у тварин жіночої статі.

1. Ashraf R., Shah N.P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, 2014; 54(7): 938–56.
2. Cantinieaux B., Hariga C., Courtoy P. et al. Staphylococcus aureus phagocytosis. A new cytofluorometric method using FITC and paraformaldehyde. **J. Immunol. Methods**, 1989; 121 (2): 203–208.
3. Castrogiovanni D., Gaillard R.C., Giovambattista A. et al. Neuroendocrine, metabolic, and immune functions during the acute phase response of inflammatory stress in monosodium L-glutamate-damaged, hyperadipose male rat. **Neuroendocrinology**, 2008; 88(3): 227–34.
4. Deveraj S., Hemarajato P., Versolovic T. The human gut microbiome and metabolism implications for obesity and diabetes. **Clin. Chem**, 2013; 4: 617–628.
5. Donaldson L.F., Bennett L., Baic S. et al. Taste and weight: is there a link? **Am. J. Clin. Nutr**, 2009; 90(3): 800–803.
6. Feng Z.M., Li T.J., Wu L. et al. Monosodium L-Glutamate and Dietary Fat Differently Modify the Composition of the Intestinal Microbiota in Growing Pi. **Obes. Facts**, 2015; 8(2): 87–100.
7. Ferreira C.M., Vieira A.T., Ramirez Vinolo M.A. et al. The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases. **J. Immunol. Res**, 2014; 2014: 689492.
8. Kang M.S., Jang H., Kim M.C. et al. Development of a stabilizer for lyophilization of an attenuated duck viral hepatitis vaccine. **Poult. Sci**, 2010; 89(6): 1167–70.
9. Kotzampassi K., Giamarellos-Bourboulis E.J., Stavrou G. Obesity as a consequence of gut bacteria and diet interactions. **ISRN Obes**, 2014; 2014: 651895.
10. Kornienko E.A., Netrebenko D.C. Obesity and intestinal microbiota: a modern concept of the correlation. **Pediatrics**, 2012; 2: 110–122. (In Russian).
11. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S. et al. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. **Nature**, 2006; 444(7122): 1022–3.

12. Núñez I.N., Galdeano C.M., de LeBlanc Ade M. et al. Evaluation of immune response, microbiota, and blood markers after probiotic bacteria administration in obese mice induced by a high-fat diet. **Nutrition**, 2014; 30(11–12): 1423–32.
13. Perederiy V.G., Zemskov A.M., Bychkova D.G. **The immune status**. K.: Health, 1995. P. 211. (In Russian).
14. Putnikov O.V., Golota Y.V., Sergiychuk T.M. et al. Quantitative and functional characteristics of rat intestinal microbiotas. **Microbiology and Biotechnology**, 2015; 2: 89–100. (In Ukrainian).
15. Rebrova O.J. **Statistical analysis**. Moscow: the media sphere, 2002. P. 312. (In Russian).
16. Reiner Neil E. **Macrophages and dendritic cells**. Methods and Protocols. NY: Humana Press, 2009; 368 p.
17. Savcheniuk O.A., Virchenko O.V., Falalyeyeva T.M. et al. The efficacy of probiotics for monosodium glutamate-induced obesity: dietology concerns and opportunities for prevention. **EPMA J**, 2014; 5(1): 2.
18. Skivka L.M. Immunomodulatory properties of the human intestinal microbiota and prospects for the use of probiotics for prophylaxis and correction of inflammatory processes. **Biotechnology Acta**, 2015; 8(2): 28–44. (In Ukrainian).
19. Subramanian M., Ozcan L., Ghorpade D. et al. Suppression of Adaptive Immune Cell Activation Does Not Alter Innate Immune Adipose Inflammation or Insulin Resistance in Obesity. **PLoS One**, 2015; 10(8): e0135842.
20. Tilg H., Moschen A., Kaser A. Obesity and the microbiota. **Gastroenterology**, 2009; 136 (5): 1476–1483.
21. Torii K., Uneyama H., Nakamura E. Physiological roles of dietary glutamate signaling via gut-brain axis due to efficient digestion and absorption. **J. Gastroenterol**, 2013; 48 (4): 442–51.
22. Trematoli V., Backhed F. Functional interaction between the gut microbiota and host metabolism. **Nature**, 2012; 489: 242–249.
23. York J.M., Castellanos K.J., Cabay R.J. et al. Inhibition of the nucleotide-binding domain, leucine-rich containing family, pyrin-domain containing 3 inflammasome reduces the severity of experimentally induced acute pancreatitis in obese mice. **Transl. Res**, 2014; 164 (4): 259–69.
24. Woo J.M., Shin D.Y., Lee S.J. et al. Curcumin protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via induction of heme oxygenase 1 expression and reduction of reactive oxygen. **Mol. Vis**, 2012, 18: 901–908.

THE EFFECT OF MULTIPROBIOTIC "SYMBITER ACIDOPHILUS" ON THE INTESTINAL MICROFLORA AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF PERITONEAL MACROPHAGES IN RATS WITH GLUTAMATE-INDUCED OBESITY

V. V. Pozur¹, M. P. Rudyk¹, T. M. Serhiychuk¹, V. M. Svyatetska¹, I. V. Akulenko¹,
D. S. Yankovskyy², G. S. Dyment², T. V. Beregova¹, L. I. Ostapchenko¹

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, "Institute of Biology"
2, Akademik Glushkov Ave., Kyiv 03022, Ukraine
e-mail: r_life@bigmir.net

²Scientific and Productional Company "AD Prolisok", 12 Voroshylov St.,
Village Velyka Olshanka, Vasylkiv District, Kyiv Region, 08671 Ukraine

Significant decrease in number of members of *Lactobacillus* genus and the increase in the number of types of aerobic microorganisms *E. coli* and *S. aureus* in the faeces and in the biopsy of colonic wall were observed in rats with monosodium glutamate-induced obesity. Treatment with "Symbiter acidophilic" prevented of microbial landscape quantitative changes associated with the obesity. Immunomodulating effect of probiotic was characterized by gender differences in animals with obesity. The treatment

with "Symbiter acidophilic" was accompanied by the preclusion of peritoneal phagocyte functional activity disorders and mononuclear phagocytes recruitment to the peritoneal cavity of female rats. Positive changes in the microbiota and immune reactivity in the peritoneal cavity were associated with decreased fat weight of various localizations in female rats who received multiprobiotic. Treatment with "Symbiter acidophilic" was also accompanied by the recruitment of mononuclear cells to the peritoneal cavity in male rats. However, the metabolic profile of these cells was characterized by proinflammatory directedness. The weight index in group of male rats treated with probiotics did not differ from that in the obese male rats.

Keywords: glutamate obesity, intestinal microflora, probiotics, chronic inflammation, peritoneal macrophages.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПРОБИОТИКА "СИМБИТЕР АЦИДОФИЛЬНЫЙ" НА МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ КРЫС С ГЛУТАМАТНЫМ ОЖИРЕНИЕМ

В. В. Позур¹, М. П. Рудик¹, Т. М. Сергийчук¹, В. Н. Святецкая¹, И. В. Акуленко¹,
Д. С. Янковский², Г. С. Димент², Т. В. Береговая¹, Л. И. Остапченко¹

¹Киевский национальный университет им. Т. Шевченко, ННЦ "Институт биологии"
просп. Академика Глушкова, 2, корп. 12, Киев 03022, Украина
e-mail: r_life@bigmir.net

²Научно-производственная компания "О.Д. Пролісок",
с. Большая Ольшанка, Васильковский р-н, Киевская обл. 08671, Украина

Развитие глутаматного ожирения вызывало достоверное снижение количества представителей рода *Lactobacillus* на 2 порядка, как в фекальном, так и в пристеночном биоптате крыс и рост числа аэробных микроорганизмов видов *E. coli* и *S. aureus*. Использование препарата "Симбистер ацидофильный" полностью предотвращало количественное изменение микробного пейзажа как в пристеночном, так и в фекальном биоптате. Иммуномодулирующее действие препарата у животных с ожирением характеризовалось половыми различиями. У животных женского пола применение "Симбистера ацидофильного" вызвало восстановление подавленной развитием ожирения функциональной активности перитонеальных макрофагов с рекрутингом мононуклеарных фагоцитов в перитонеальную полость. Положительные изменения микробиоты и иммунной реактивности перитонеальной полости у самок, получавших пробиотический препарат, сопровождалось снижением весовых показателей жировой ткани различной локализации. У животных мужского пола применение пробиотического препарата также сопровождалось рекрутингом мононуклеаров в перитонеальную полость. Однако метаболический профиль этих клеток характеризовался выразительной провоспалительной направленностью. Несмотря на позитивные изменения микробиоты, вызванные употреблением пробиотика вероятные изменения в весовых индексах жировой ткани у этих животных отсутствовали.

Ключевые слова: глутаматное ожирение, микрофлора кишечника, пробиотики, хроническое воспаление, перитонеальные макрофаги.

Одержано: 18.01.2016