

ВІДБІР ПРОБІОТИЧНИХ ШТАМІВ ТА ЇХ КОМПОЗИЦІЙ З ХОЛЕСТЕРАЗНОЮ АКТИВНІСТЮ ЯК ПОТЕНЦІЙНОЇ ОСНОВИ ПРОДУКТІВ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО ХАРЧУВАННЯ

Старовойтова С.О.^{1,2}, Співак М.Я.¹

¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного, НАН України, м.Київ, Україна

² Національний університет харчових технологій, м.Київ, Україна
e-mail: svetik_2014@ukr.net

Мікробіота відіграє ключову роль не лише в метаболічних функціях, а й у їх оптимізації та регуляції. Зокрема, багато сучасних досліджень підтверджують участь мікробіому в профілактиці порушень ліпідного обміну (ожиріння, гіпер- та дисліпідемії) тощо. Представники облигатної мікрофлори забезпечують гіполіпідемічний та гіпотензивний ефекти шляхом декон'югації солей жовчних кислот, асиміляції та преципітації холестерину, зниження активності тканинного ангіотензинперетворюючого ферменту.

Відповідно до сучасних наукових даних передбачається декілька механізмів участі мікробіому в підтримці ліпідного обміну на фізіологічному рівні та запобіганні розвитку гіперхолестеринемії: декон'югація жовчних кислот і зниження їх резорбції за рахунок синтезу спеціалізованих гідролаз, включення холестерину в ліпідний шар клітинної мембрани, перетворення холестерину в копростанол і виведення його з організму разом з калом, пригнічення синтезу холестерину в печінці [1-6].

Метою дослідження було встановлення холестеразної активності *in vitro* та *in vivo* попередньо відібраних високопробіотичних штамів молочнокислих бактерій для подальшого створення на їх основі лінії ефективних функціональних харчових продуктів з гіпохолестеринемічною активністю для профілактики та супутнього лікування патологічних станів, пов'язані з високим рівнем холестерину, таких як атеросклероз судин головного мозку, гіпертонічна хвороба, пухлини травного тракту тощо.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були штами лакто- та біфідобактерій, виділені з асоціативної культури під час лабораторних досліджень ферментованого біологічного матеріалу, задепоновані у депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Заболотного НАН України та запатентовані: *Bifidobacterium bifidum* ВК-1, *Bifidobacterium longum* ВК-2, *Lactobacillus acidophilus* ІМВ В-7279 (пат. 93132 UA, опубл. 10.01.2011, бюл. 1), *Lactobacillus casei* ІМВ В-7280 (пат. 93133 UA), опубл. 10.01.2011, бюл. 1), *Lactobacillus bulgaricus* ІМВ В-7281 (пат. 92983 UA, опубл. 27.12.2010, бюл. 24). Дослідження проводилися з використанням сублімаційно висушених бактерій (Cuddon Freeze Dryer FD). Перед кожним експериментальним дослідженням активність ліофілізованих пробіотичних штамів перевіряли шляхом контролю їх росту на середовищі MRS або Bifido (Merck) при 37°C протягом 24-48 годин.

Холестеразну активність культур *in vitro* визначали в MRS-бульоні з додаванням холестерину (Sigma-Aldrich) за методом Rudel L.L. через 18 і 24 години культивування.

Холестеразну активність культур та їх композицій *in vivo* визначали в дослідях на білих мишах масою 16-18 і 18-20 г, мишах-самців лінії Balb/c віком 2,5 місяці та самках мишей лінії Balb/c віком 3 місяці.

Експериментальна гіперхолестеринемія була змодельована на мишах шляхом годування висококалорійною дієтою протягом тижня. До раціону додавали кристалічний холестерин хімічної чистоти > 99% (Sigma, США). Ця розроблена нами модель (пат. 61954 UA, опубл. 10.08.2011, бюл. 15) дозволяє підвищити рівень холестерину в сироватці крові мишей у середньому на $46,54 \pm 2,1$ % порівняно з інтактними мишами. В експерименті було використано дві схеми застосування пробіотиків– лікувальну та профілактичну.

За профілактичною схемою мишам дослідної групи протягом 4 діб вводили перорально по 0,3 мл свіжоприготованої суспензії ліофілізованих пробіотичних культур або їх комбінацій у концентрації 3×10^8 КУО/мл та комбікорм. На п'ятий день миші отримували висококалорійну дієту і продовжували отримувати пробіотичні культури щодня до кінця дієти (сім днів). На першу, третю та сьому добу від початку висококалорійної дієти у тварин визначали рівень загального холестерину сироватки крові. Холестеринознижувальну активність (активність холестеррази) розраховували за зниженням концентрації холестерину в сироватці крові у мишей, які отримували висококалорійну дієту та пробіотичні культури або їх комбінації, порівняно з контрольною групою мишей, які отримували лише висококалорійну дієту. Холестеринознижувальну активність оцінювали у відсотках від контрольної групи мишей.

Лікувальна схема передбачала одночасне введення в раціон мишей висококалорійної дієти та пробіотичних культур у тих же дозах, що й у профілактичній схемі. Також у тварин брали зразки крові для аналізу рівня загального холестерину на перший, третій і сьомий день експерименту відповідно.

Результати. Досліджено кількісні показники холестеринної активності *Lactobacillus* та *Bifidobacterium in vitro*. Показано, що всім дослідженим штамам лакто- та біфідобактерій вдалося знизити рівень холестерину в бульйоні MRS як після 18-, так і після 24-годинного культивування. Здатність досліджуваних штамів знижувати рівень холестерину в бульйоні MRS знижується в послідовності: *L. casei* IMB B-7280 > *L. bulgaricus* IMB B-7281 > *L. acidophilus* IMB B-7279 > *B. longum* BK-2 > *B. bifidum* BK-1.

Багатьма роботами експериментально встановлено, що різні штами лакто- і біфідобактерій здатні підвищувати свої корисні властивості при застосуванні в комбінації, тобто проявляти явище синергізму позитивних пробіотичних властивостей. Виходячи з цього, наступним етапом експерименту було визначення холестеринної активності різних композицій

лакто- та біфідобактерій (попередньо було доведено, що всі штами є біосумісними між собою, відповідно не проявляють антагоністичної активності по відношенню один до одного).

Результати досліджень свідчать про те, що для створення пробіотичного комплексу як основи функціональних продуктів харчування з холестеразною активністю найбільш перспективними є композиції лакто- та біфідобактерій: *B. longum* ВК-2 : *B. bifidum* ВК-1 (співвідношення штамів в композиції – 1:1), *L. casei* ІМВ В-7280 : *B. bifidum* ВК-1 (1:1), *L. casei* ІМВ В-7280 : *B. longum* ВК-2 (1:1), *L. casei* ІМВ В-7280 : *L. bulgaricus* ІМВ В-7281 (1:1), а також *L. casei* ІМВ В-7280 : *L. acidophilus* ІМВ В-7279.

За літературними даними, прояви пробіотичних властивостей *in vitro* та *in vivo* можуть суттєво відрізнятись, а саме, штами, які мали високі пробіотичні властивості *in vitro*, можуть взагалі не проявляти їх у експериментах *in vivo*, і навпаки, штами, які не виявляли позитивні дії *in vitro* можуть виявитися дуже активними в експериментах *in vivo* [1, 2, 6].

Отже, експериментально було доведено, що незалежно від породи, віку, статі, маси тіла мишей і схеми введення пробіотичних культур їх холестеразна активність підвищується до сьомої доби спостереження. Слід також зазначити, що профілактичні схеми введення пробіотичних культур мали вищі значення холестеразної активності, ніж терапевтичні. Це свідчить про те, що найкращим лікуванням є профілактика захворювання.

Найвищими значеннями холестеразної активності в досліджах *in vivo* володіли штами *L. acidophilus* ІМВ В-7279 та *B. bifidum* ВК-1, а також композиція *B. bifidum* ВК-1 : *B. longum* ВК-2 (1:1). Отже, можна відзначити, що холестеринознижувальна активність досліджуваних пробіотичних штамів та їх композицій в досліджах *in vivo* коливалася в межах 40-78% (профілактична та лікувальна схеми).

Висновки. Оскільки холестеринзнижувальна активність досліджуваних пробіотичних штамів та їх композицій коливалася в межах 40-78 %, що свідчить про здатність знижувати холестерин дослідженими штамми та їх композиціями на рівні, а в деяких випадках навіть вище, ніж препаратів, які широко використовуються в сучасній медичній при холестеринозі, а саме статини: Розувастатин, Ловастатин, Флувастатин, Аторвастатин тощо.

Таким чином, відібрані культури пробіотичних молочнокислих бактерій та їх композиції потенційно можуть бути використані для створення на їх основі нових ефективних функціональних продуктів харчування та пробіотиків, а також дієтичної добавки для зниження рівня холестерину в сироватці крові людини. Пробиотики, які містять холестерин-асимілюючі штами молочнокислих бактерій, можуть ефективно доповнювати комплексну терапію хворих на серцево-судинні, онкологічні та інші захворювання.

Слід відмітити, що такі функціональні продукти харчування і препарати позбавлені негативних побічних ефектів, властивих статинам, особливо гепатотоксичності, вони не викликають звикання і не потребують довічного

прийому. Також функціональні харчові продукти, збагачені такими пробіотичними мікроорганізмами в мікрокапсульованому вигляді (що дозволить підвищити виживаність пробіотичних мікроорганізмів при проходженні через верхні відділи шлунково-кишкового тракту, а отже опосередковано підвищить терапевтичний ефект таких препаратів і функціональних продуктів харчування) [7], з гіпохолестеринемічною активністю, можуть бути використані не тільки в терапії, але і в профілактиці захворювань, пов'язаних з високим рівнем холестерину в сироватці крові. А як відомо, профілактика – найкраще, безпечне для здоров'я та ефективне лікування будь-якої хвороби.

Література

1. Palaniyandi SA, Damodharan K, Suh JW, Yang SH Probiotic characterization of cholesterol-lowering *Lactobacillus fermentum* MJM60397. Probiotics and antimicrobial proteins. 2020; 12: 1161-1172.
2. Yusuf D, Nuraida L, Dewanti-Hariyadi R, Hunaefi D. *In Vitro* Characterization of Lactic Acid Bacteria from Indonesian Kefir Grains as Probiotics with Cholesterol-Lowering Effect. J Microbiol Biotechnol. 2020; 30(5): 726-732.
3. Alaqil AA, Abbas AO, El-Beltagi HS, El-Atty HKA, Mehaisen GM, Moustafa ES Dietary supplementation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* modulates cholesterol levels, immune response, and productive performance of laying hens. Animals. 2020; 10(9): 1588
4. O'Morain VL, Ramji DP The potential of probiotics in the prevention and treatment of atherosclerosis. Molecular nutrition & food research. 2020; 64(4): 1900797.
5. Jia B, Zou Y, Han X, Bae JW, Jeon CO. Gut microbiome-mediated mechanisms for reducing cholesterol levels: implications for ameliorating cardiovascular disease. Trend Microbiol. 2023; 31(1): 76-91.
6. Fernandez-Calderon MC, Sanchez-Moro MDH, Rincon EO. *In vitro* Cholesterol Assimilation by *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* (BPL1) Probiotic Bacteria Under Intestinal Conditions. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets. 2022; 22(4): 433-439.
7. Starovoitova SO, Kishko KM, Bila VV, Demchenko OM, Spivak MYa. Modern aspects of probiotic microorganisms' microencapsulation. Mikrobiol. Z. 2022; 84(5):72-85.