(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 201992040 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.02.12

(22) Дата подачи заявки
2018.03.30

(51) Int. Cl. ***A61K 31/7016*** (2006.01)
A61K 31/702 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 1/18 (2006.01)

(54) ПЕРИНАТАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ФРУКТООЛИГОСАХАРИДОВ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, СВЯЗАННЫХ С НЕСБАЛАНСИРОВАННЫМ ПИТАНИЕМ ВО ВЗРОСЛОМ ВОЗРАСТЕ

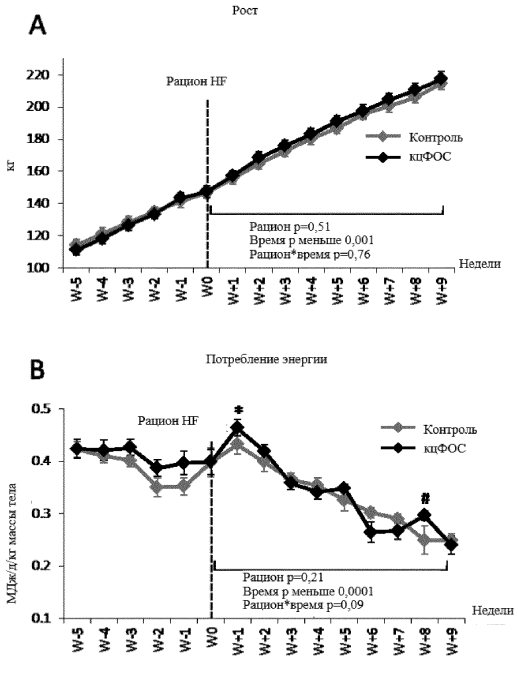
(31) **1700354**
(32) **2017.03.31**
(33) **FR**
(86) **PCT/FR2018/050805**
(87) **WO 2018/178599 2018.10.04**

(71) Заявитель:
БЕЖЕН МЕЖИ; ЭНСТИТЮ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛА РЕШЕРШ АГРОНОМИК-ЭНРА (FR)

(72) Изобретатель:
Ле Бурго Сенди, Аппе Эммануэль (BE), Ле Юру-Люрон Изабель, Бла Софи (FR)

(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Буре Н.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте у потомства; или к способу стимуляции эндокринной функции кишечника и повышения чувствительности поджелудочной железы к глюкозе во взрослом возрасте млекопитающего; или предотвращения нарушения гомеостаза глюкозы во взрослом возрасте млекопитающего; или к способу снижения чувствительности к воспалению во взрослом возрасте млекопитающего путем введения кцФОС (короткоцепочечные фруктоолигосахариды) самке во время беременности указанным потомством и/или вскармливания указанного потомства и/или указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема.



201992040 A1

201992040 A1

ПЕРИНАТАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ КОРОТКОЦЕПОЧЕЧНЫХ ФРУКТООЛИГОСАХАРИДОВ ДЛЯ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ, СВЯЗАННЫХ С НЕСБАЛАНСИРОВАННЫМ ПИТАНИЕМ ВО ВЗРОСЛОМ ВОЗРАСТЕ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Изобретение относится к способу предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте, путем введения короткоцепочечных фруктоолигосахаридов (кцФОС) в течение перинатального периода.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Концепция внутриутробного происхождения здоровья и болезней (DOHaD), основанная на значительных эпидемиологических доказательствах и экспериментальных данных (Gluckman et al., 2007; Godfrey et al., 2010), предусматривает, что метаболическое здоровье взрослых может программироваться факторами окружающей среды, включая питание, во время перинатального периода. Ранние периоды жизни, от фетального до конца раннего детства у человека (2 года), являются критическим окном чувствительности к такому программированию.

Экспериментальные данные указывают на то, что эндокринная поджелудочная железа является важной тканью, подверженной пищевому импринтингу. Развитие эндокринной поджелудочной железы начинается во время фетального периода жизни и продолжается постнатально. Таким образом, дефицит питательных веществ, такой как низкая доступность белков или снижение потребления калорий, в течение перинатального периода вызывал стойкие изменения поджелудочной железы у взрослых потомков, которые включали гипоплазию и гипотрофию островков Лангерганса поджелудочной железы с функциональными последствиями для гомеостаза глюкозы (Garofano et al., 1998; Bertin et al., 1999; Garofano et al., 1999). Связь между кишечником и поджелудочной железой, которая является обязательной для поддержания гомеостаза глюкозы, включена в концепцию энтероинсулярной оси. Среди гормонов кишечника, высвобождаемых в ответ на пероральный прием глюкозы, те, которые способны усиливать индуцированную глюкозой секрецию инсулина, называются инкретинами, такие как глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1), секретируемый из L-клеток дистального отдела тонкой кишки и проксимального отдела толстой кишки. Будучи секретированным, связывание GLP-1 с его специфическим рецептором на β-клетках поджелудочной железы стимулирует секрецию инсулина. Оно также стимулирует пролиферацию и восстановление β-клеток и ингибирует их апоптоз, тем самым увеличивая массу β-клеток (Baggio & Drucker, 2007). GLP-1 ингибирует секрецию глюкагона (гипергликемического гормона), вызывает чувство сытости и замедляет опорожнение желудка. Секреция GLP-1 уменьшает печеночный глюконеогенез, а также отложение жирных кислот в висцеральной жировой ткани, ответственной за ожирение.

Основным стимулом для секреции GLP-1 является глюкоза, но его высвобождение также может стимулироваться другими питательными веществами. Действительно, Tolhurst et al. (Tolhurst et al., 2012) продемонстрировали, что короткоцепочечные жирные кислоты (кцЖК), в частности ацетат и пропионат, которые могут продуцироваться бактериальной ферментацией в кишечнике, усиливают высвобождение GLP-1 L-клетками посредством активации сопряженного с G-белком рецептора 2 свободной жирной кислоты. Эндокринная функция кишечника не была тщательно изучена в контексте метаболического программирования по сравнению с функцией поджелудочной железы. Однако растущие данные свидетельствуют о том, что кишечник подвергается пищевому импринтингу. Ранние дефицит или избыток

питательных веществ индуцировали долгосрочные последствия для функции кишечника, характеризующиеся измененным кишечным иммунным и неиммунным барьером (Fanca-Berthon et al., 2009; Yan et al., 2011; Boudry et al., 2013). Таким образом, энтероэндокринная функция также может быть важным фактором в пищевом импринтинге благодаря его адаптивному ответу на питательные вещества из пищи и бактериальные метаболиты.

Роль кишечной микробиоты в программировании физиологии и метаболизма выявили недавно. Окружающая среда в раннем возрасте как способ доставки, привычки питания матери и перинатальное лечение антибиотиками действительно влияют на колонизацию микробиоты кишечника в моделях человека и животных (Penders et al., 2006; Reinhardt et al., 2009; De Filippo et al., 2010; Roura et al., 2016). Например, воздействие антибиотиков в младенческом возрасте может иметь длительные последствия для состава микробиоты кишечника (Bedford Russell & Murch, 2006; Schokker et al., 2015) и избыточного веса и метаболического статуса (Ajslev et al., 2011; Trasande et al., 2013; Cox et al., 2014). Тем не менее, имеется мало информации о долгосрочном метаболическом воздействии стратегий в области питания, направленных на содействие колонизации полезной микробиоты в младенчестве.

Пребиотические волокна являются хорошими кандидатами для положительной модуляции микробиоты. Они являются селективно ферментированными ингредиентами, которые позволяют специфическим изменениям микробиоты кишечника, как по составу, так и метаболизму, приносить пользу для благополучия и здоровья хозяина (Roberfroid et al., 2010). Влияние потребления пищи с добавлением пребиотиков во время беременности и вскармливания на здоровье потомства широко не изучалось, но заслуживает внимания из-за влияния пребиотиков на состав и активность микробиоты. Короткоцепочечные фруктоолигосахариды (кцФОС) представляют собой весьма интересные пребиотические волокна, полученные из сахарозы и состоящие из от 2 до 4 звеньев фруктозы, связанных с одной молекулой глюкозы, которые селективно ферментируются микробиотой кишечника, способствуя росту в основном Lactobacillus, Bifidobacterium и Clostridium coccoides, а также образованию короткоцепочечных жирных кислот (кцЖК) (Swanson et al., 2002; Pan et al., 2009; Respondek et al., 2013). Высокая степень сходства между микробиотой кишечника матерей с добавлением кцФОС и их потомства у мышей через две недели после рождения (Fujiwara et al., 2008) позволяет предположить, что улучшение профиля микробиоты кишечника матери может улучшить раннюю колонизацию кишечника потомства через бактериальный перенос во время внутриутробного развития (in utero), при рождении и во время вскармливания. Ранее авторами изобретения продемонстрировано на свиньях, что добавки кцФОС матерям вызывали повышенную метаболическую активность микробиоты потомства во время лактации и более высокую выработку бутирата после отъема (Le Bourgot et al., в пересмотре) по сравнению с потомством свиноматок без добавок. Авторы изобретения также наблюдали длительное влияние добавок кцФОС в перинатальный период на продукцию метаболитов микробиотой более чем через 2 месяца после прекращения приема добавок (Le Bourgot et al., 2014), что свидетельствует о стойком влиянии ранних добавок кцФОС на состав микробиоты.

С 1960-х годов произошел пищевой переход, характеризующийся увеличением потребления продуктов питания с высокой энергетической ценностью и часто с высоким содержанием жиров, содержащих мало сложных углеводов и волокон. Этот пищевой переход, связанный с отсутствием физических упражнений, способствует увеличению распространенности ожирения и связанных с ним метаболических расстройств, таких как диабет и кардиометаболические заболевания. Во всем мире число случаев ожирения удвоилось с 1980 года. К 2014 году более 1,9 миллиарда взрослых имели избыточный вес, из которых более 600 миллионов страдали ожирением, что составляет 39 % взрослых с избыточным весом и

13 % страдающих ожирением. Кроме того, глобальная распространенность диабета среди взрослых старше 18 лет выросла с 4,7 % в 1980 году до 8,5 % в 2014 году. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ – WHO - World Health Organization) ожидает, что к 2030 году число людей с избыточным весом достигнет 3,3 миллиарда, и диабет станет седьмой основной причиной смерти по всему миру.

Еще один фактор риска развития метаболических расстройств был недавно выделен Международной Федерацией Диабета. Речь идет о семейном окружении, и особенно о кормлении в перинатальный период, которое может представлять интересную стратегию питания для предотвращения возникновения метаболических заболеваний во взрослом возрасте.

В международной заявке WO2016/030861 выдвинуто предположение, что введение кцФОС самке во время вскармливания или ее потомству влияет на метаболизм потомства, в частности анаболизм. Метаболические эффекты в соответствии с WO2016/030861 включают набор лишнего веса.

Таким образом, авторы исследования выяснили, может ли добавка кцФОС в перинатальный период влиять на физиологию кишечника млекопитающего, энтероинсулярную ось и гомеостаз глюкозы у взрослого потомства, для того, чтобы ограничить развитие метаболических расстройств, вызванных несбалансированным питанием.

В противоположность раскрытию в заявке WO2016/030861, такая метаболическая регуляция, индуцированная изобретением, представляет собой баланс между анаболическим и катаболическим эффектами. Неожиданно, введение кцФОС субъекту женского пола или ее потомству в соответствии с настоящим изобретением приводит к метаболической регуляции, несмотря на рацион питания потомства во взрослом возрасте.

РАСКРЫТИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, настоящее изобретение относится к фруктоолигосахаридам (ФОС) для применения в раннем возрасте животного для предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте; указанные метаболические расстройства выбраны из группы, включающей постпрандиальную гипергликемию, гипергликемию натощак, гиперлипидемию, избыточную массу тела, перегрузку подкожно-жировой клетчатки, перегрузку висцерального жира, замедленный катаболизм питательных веществ, кишечный и/или системный воспалительный статус, воспалительный статус жировой ткани или их комбинацию.

В соответствии с настоящим изобретением фруктоолигосахариды (ФОС) вводят в эффективном количестве i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства и/или ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема.

Неожиданно, после введения ФОС в соответствии с настоящим изобретением в раннем возрасте, влияние на метаболизм сохраняется до взрослого возраста.

Такой эффект вызван уравновешиванием энтероинсулярной оси, предпочтительно путем увеличения так называемых инкретиновых гормонов или клеток, секретирующих инкретин.

В одном варианте осуществления инкретин представляет собой GLP-1.

Согласно одному варианту осуществления изобретения эффективное количество ФОС для самки во время беременности и/или кормления ее потомства составляет от 1 до 20 г, предпочтительно от 4 до 18 г в день.

Согласно одному варианту осуществления изобретения эффективное количество ФОС для потомства составляет от 0,1 до 2 г, предпочтительно от 0,3 до 1 г в день.

Животное по настоящему изобретению представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека или млекопитающее, не относящееся к человеку.

В одном варианте осуществления изобретения фруктоолигосахариды представляют собой короткоцепочечные фруктоолигосахариды.

Изобретение дополнительно относится к фруктоолигосахаридам (ФОС) для применения в способе стимуляции эндокринной функции кишечника и повышения чувствительности поджелудочной железы к глюкозе во взрослом возрасте у потомства самки, причем указанные ФОС вводят в эффективном количестве

i) самке во время беременности и/или вскармливания указанного потомства, и/или

ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема;

указанная стимуляция эндокринной функции кишечника или указанное повышение чувствительности поджелудочной железы к глюкозе приводит к предотвращению метаболических расстройств, связанных с дисбалансом во взрослом возрасте указанного потомства;

указанные метаболические расстройства выбраны из группы, включающей или состоящей из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, гиперлипидемии, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки, перегрузки висцерального жира, замедленного катаболизма питательных веществ, кишечного и/или системного воспалительного статуса или их комбинации.

В другом аспекте изобретение относится к фруктоолигосахаридам (ФОС) для применения для получения пищевой или нутрицевтической композиции; причем указанную композицию вводят животному в раннем возрасте в способе предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте; указанные метаболические расстройства выбраны из группы, включающей или состоящей из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, гиперлипидемии, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки, перегрузки висцерального жира, замедленного катаболизма питательных веществ, кишечного и/или системного воспалительного статуса, воспалительного статуса жировой ткани или их комбинации.

Такую композицию вводят в эффективном количестве i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства и/или ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема.

Введение указанной композиции уравновешивает энтероинсулярную ось, предпочтительно путем увеличения так называемых инкретиновых гормонов, а именно GLP-1, или клеток, секретирующих инкретин. Такая композиция содержит от 0,1 до 20 г или от 0,05 до 2 мас.% ФОС относительно композиции.

Изобретение также может относиться к применению ФОС для получения композиции, как описано выше.

В соответствии с последним аспектом изобретение относится к способу выращивания убойных животных, не страдающих ожирением, включающему введение фруктоолигосахаридов в эффективном количестве i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства и/или ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Путем добавления кцФОС свиньям в течение последней трети беременности и всего периода вскармливания и/или добавления их потомству в течение одного месяца после отъема, авторы изобретения показали влияние ранней добавки кцФОС на программирование энтероэндокринной функции и их

последствия для метаболического здоровья свиней во взрослом возрасте, подвергнутых несбалансированному питанию.

Изобретение относится к способу предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте потомства самки, включающему стадию

- введения эффективного количества фруктоолигосахаридов

i) самке во время беременности и/или вскармливания указанного потомства, и/или

ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема

- предотвращения метаболических расстройств, связанных с дисбалансом во взрослом возрасте указанного потомства.

Изобретение также относится к применению фруктоолигосахаридов (ФОС), предпочтительно короткоцепочечных ФОС (кцФОС), в раннем возрасте животного для предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте. Предпочтительно путем введения указанному животному эффективного количества фруктоолигосахаридов в течение по меньшей мере одного месяца после отъема. Изобретение также относится к применению ФОС, предпочтительно кцФОС, для предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте животного, путем введения кцФОС его родителю женского пола (или матке, или матери) во время вскармливания указанного животного.

Согласно изобретению фруктоолигосахариды вводят указанному потомству или указанному животному в раннем возрасте через от 2 до 9 недель после отъема, предпочтительно от 3 до 8 недель после отъема, еще более предпочтительно от 4 до 7 недель.

Согласно изобретению фруктоолигосахариды вводят указанной самке или указанной матке по меньшей мере в течение периода лактации, предпочтительно фруктоолигосахариды вводят указанной самке или указанной матке в конце беременности и/или в течение всего периода лактации. В одном варианте осуществления изобретения мать не страдает ожирением и имеет нормальный метаболический статус.

В контексте настоящего изобретения термин "животные" относится к человеку или любому животному, выращенному в области животноводства для применения людьми для пищи, одежды и тому подобного; такие животные включают убойных животных, например, жвачных животных, таких как крупный рогатый скот, овцы и козы, и нежвачных животных, таких как свиньи и домашняя птица. Предпочтительно животное представляет собой животное, не относящееся к человеку. Предпочтительно животное представляет собой млекопитающее. Термин "убойные животные" относится к любому животному, выращенному в области животноводства для применения его мяса в качестве пищи. Как правило, животное является моногастрическим животным. Термин "моногастрическое животное" относится к любому животному с одним желудком, что относится к большинству плотоядных и всеядных животных, за исключением жвачных животных, за исключением телят, причем термин "моногастрическое животное" следует рассматривать как включающий телят.

Термин "несбалансированное питание" относится к рациону, при котором основную долю энергии получают из липидов и/или углеводов. Предпочтительно указанный рацион богат липидами, содержание которых более чем в 2 раза превышено по сравнению со стандартным сбалансированным питанием.

Согласно изобретению, термины "взрослый возраст" или "взрослое животное" относятся к животному, которое достигло своей половой зрелости.

Термины "метаболические расстройства" относятся к нарушению нормальных процессов обмена веществ и к тому, что организм получает слишком много или недостаточно существенных веществ,

необходимых для поддержания здоровья, что может привести к нарушению энергетического обмена, нарушению гомеостаза глюкозы, снижению чувствительности к инсулину (резистентность к инсулину), провоспалительному состоянию и/или изменению профиля липидов. В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к постпрандиальной гипергликемии. В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к гипергликемии натощак. В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к гиперлипидемии. В одном варианте изобретения осуществления метаболическое расстройство относится к избыточной массе тела. В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к перегрузке подкожно-жировой клетчатки или висцерального жира. В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к замедленному катаболизму питательных веществ. В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к кишечному и системному воспалительному статусу. В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к резистентности к инсулину.

В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к набору метаболических состояний, выбранных из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, гиперлипидемии, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки, перегрузки висцерального жира, замедленного катаболизма питательных веществ, кишечного и/или системного воспалительного статуса или резистентности к инсулину.

В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к набору метаболических состояний, выбранных из группы, включающей или состоящей из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, гиперлипидемии, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки, перегрузки висцерального жира, замедленного катаболизма питательных веществ или состояния кишечного и/или системного воспаления.

В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к набору метаболических состояний, выбранных из группы, включающей или состоящей из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, гиперлипидемии, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки, перегрузки висцерального жира или замедленного катаболизма питательных веществ.

В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к набору метаболических состояний, выбранных из группы, включающей или состоящей из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, гиперлипидемии, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки или висцерального жира.

В одном варианте осуществления изобретения метаболическое расстройство относится к набору метаболических состояний, выбранных из группы, включающей или состоящей из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки или висцерального жира.

Термины "предотвращение метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте" или "предотвращение метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием животного во взрослом возрасте" относятся к измерению ограничения или уменьшения метаболических расстройств, а именно путем измерения параметров, связанных с гомеостазом глюкозы, липидным обменом и профилем воспаления во взрослом возрасте, между двумя взрослыми животными, одно из которых получало лечение в раннем возрасте в отличие от другого животного. Действительно, в соответствии с изобретением, хотя кцФОС вводят в раннем возрасте в течение периода

вскармливания (например, для поросят от 5 дней до 21 дня) или в течение по меньшей мере одного месяца после отъема (для поросят отъем составляет от 21 дня до 48 дней), предотвращение метаболических расстройств наблюдается во взрослом возрасте, то есть через длительное время после окончания приема кцФОС. В случае свиньи животное забивают в возрасте 274 дней (39 недель). Следовательно, период между окончанием лечения и наблюдением предотвращения метаболических расстройств составляет от 16 до 31 недели, что означает период, который составляет более половины продолжительности жизни свиньи. Этот эффект называется "метаболический импринтинг". Неожиданно обнаружили, что такой эффект метаболического импринтинга может быть вызван пребиотическим волокном. Более того, поскольку все пребиотические волокна по-разному модулируют микробиоту кишечника, также было неожиданно, что кцФОС специфически модулирует микробиоту кишечника и что такая модуляция длится в течение всей жизни обработанного животного.

Согласно изобретению, термин "ранний возраст" в выражении "животное раннего возраста" относится к молодому животному, означая в течение пренатального периода, вскармливания, отъема и периода после отъема. Период после отъема представляет собой период, в течение которого животные получают престартерное и стартовое питание (т.е. до фазы выращивания).

В контексте настоящего документа термин "предотвращение" относится к снижению риска развития метаболического расстройства. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения кцФОС вводят в качестве профилактической меры субъекту, имеющему предрасположенность к метаболическим расстройствам вследствие влияния окружающей среды или его генетической предрасположенности, даже если симптомы расстройства отсутствуют или минимальны.

Как правило, указанное животное, особенно указанное потомство, может представлять собой моногастрическое животное, предпочтительно поросенка, и указанное эффективное количество фруктоолигосахаридов вводят:

- указанной самке или указанному родителю женского пола во время вскармливания указанного потомства от 0 до 28 дней и/или

- указанному потомству от 28 до 56 дней или от 28 до 77 дней, предпочтительно от 28 до 56 дней.

Термин "эффективное количество" относится к количеству ФОС, предпочтительно кцФОС, которое при введении животному предотвращает метаболические расстройства, связанные с несбалансированным питанием, без какого-либо значительного побочного эффекта, по сравнению с необработанными животными.

Согласно определению в данной области техники, эффективные количества ФОС для применения по настоящему изобретению будут в некоторой степени варьироваться в зависимости от конкретного вида животного или условий роста, таких как температура и тип корма и тому подобное. Для любого конкретного случая точное или оптимальное эффективное количество, которое следует вводить, может быть определено обычными способами постепенного подбора дозы.

В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество ФОС для самки во время беременности и/или вскармливания ее потомства составляет от 2 до 20 г, от 4 до 18 г, от 5 до 15 г, от 8 до 12 г в день. В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество ФОС для самки во время беременности и/или вскармливания ее потомства составляет от 5 до 15 г, от 8 до 12 г в день. В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество ФОС для самки животного во время беременности и/или вскармливания ее потомства составляет от 8 до 12 г в день.

В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество ФОС для самки во время беременности и/или вскармливания его потомства составляет приблизительно 5 г, приблизительно 6 г, приблизительно 7 г, приблизительно 8 г, приблизительно 9 г, приблизительно 10 г, приблизительно 11 г, приблизительно 12 г, приблизительно 13 г, приблизительно 14 г или приблизительно 15 г в день.

Согласно одному варианту осуществления изобретения эффективное суточное количество делят на несколько приемов в день. Специалист в данной области может легко рассчитать разделенную дозу на основе суточной дозы.

В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество для самки во время беременности и/или вскармливания ее потомства составляет от 0,1 до 2, от 0,1 до 0,6, от 0,15 до 0,4 или от 0,15 до 0,3 мас.% относительно вводимой пищевой композиции. В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество для самки во время беременности и/или вскармливания ее потомства составляет от 0,1 до 0,6, от 0,15 до 0,4 или от 0,15 до 0,3 мас.%, относительно вводимой пищевой композиции. В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество для самки во время беременности и/или вскармливания ее потомства составляет от 0,15 до 0,4 или от 0,15 до 0,3 мас.%, относительно пищевой композиции. В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество ФОС для потомства составляет от 0,1 до 2 г, от 0,15 до 1 г, от 0,015 до 0,5 г, от 0,15 до 0,5 г в день. В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество ФОС для потомства составляет от 0,3 до 0,5 г, от 0,4 до 0,5 г в день.

В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество ФОС для потомства составляет приблизительно 0,1 г, приблизительно 0,2 г, приблизительно 0,3 г, приблизительно 0,4 г, приблизительно 0,5 г, приблизительно 0,6 г, приблизительно 0,7 г, приблизительно 0,8 г, приблизительно 0,9 г или приблизительно 1 г в день.

Согласно одному варианту осуществления изобретения эффективное суточное количество делят на несколько приемов в день. Специалист в данной области может легко рассчитать разделенную дозу на основе суточной дозы.

В одном варианте осуществления изобретения эффективное количество для потомства составляет от 0,05 до 1, от 0,05 до 0,6, от 0,1 до 0,4 или от 0,1 до 0,2 мас.%, относительно вводимой пищевой композиции.

Термин "фрукто-олигосахариды", "фруктоолигосахариды" или "ФОС" относится к бета-D-фруктанам, содержащим от 2 до 10 звеньев фруктозы, где звенья фруктозы связаны с бета-2,1-гликозидными цепями, и на их терминальном конце находится единичное звено D-глюкозы. Предпочтительно фруктоолигосахариды представляют собой короткоцепочечные фруктоолигосахариды. В соответствии с настоящим изобретениям, короткоцепочечные фруктоолигосахариды (кцФОС) содержат от 2 до 8, предпочтительно от 2 до 4 звеньев фруктозы (GF2, GF3 и GF4). Предпочтительно кцФОС по настоящему изобретению содержат от 28 до 34, предпочтительно 32 мас.% GF2, от 40 до 54, предпочтительно 47 мас.% GF3, и от 8 до 16, предпочтительно 11 мас.% GF4. КцФОС обычно получают из сахарозы ферментативным способом или способом брожения (JP-A-56-154967, JP-B-59-53834 и JP 61-268190). КцФОС коммерчески производят под торговой маркой PROFEED®, ACTILIGHT® или NUTRAFLORA®. Аналитический способ измерения содержания кцФОС также раскрыт в предшествующем уровне техники Ouarné et. al., 1999 с применением стадии экстракции с последующей анионообменной жидкостной хроматографией, связанной со стадией гидролиза с применением инвертазы. В AOAC 999.03 и AOAC 999.08 также описаны несколько способов анализа ФОС.

Как правило, кцФОС можно вводить в сочетании с пребиотиком, таким как маннанолигосахариды (МОС – MOS - mannan-oligosacharides), или с пробиотиком (также называемым симбиотической концепцией).

Предпочтительно, ФОС вводят в форме порошка или жидкости или включают в пищевую добавку, или добавляют непосредственно в пищу.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способу предотвращения дефицита гомеостаза глюкозы во взрослом возрасте млекопитающего или снижения чувствительности к воспалению во взрослом возрасте потомства самки, включающему стадию

- введения эффективного количества фруктоолигосахаридов

i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства, и/или

ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема

- предотвращения метаболических расстройств, связанных с дисбалансом во взрослом возрасте указанного потомства.

В соответствии с настоящим изобретением измерение "гомеостаза глюкозы" относится к оценке кишечной эндокринной функции (способность секреции GLP-1) и чувствительности поджелудочной железы к глюкозе (способность секретировать инсулин в ответ на разовую дозу глюкозы). В соответствии с одним вариантом осуществления изобретения улучшение или предотвращение дефицита гомеостаза глюкозы относится к хорошему состоянию здоровья, предпочтительно хорошему состоянию метаболизма, при которым значительное или чрезмерное потребление калорий не дестабилизирует метаболические маркеры, такие как уровень глюкозы в крови, липидемия или масса тела. В одном варианте осуществления изобретения хорошее состояние метаболизма относится к состоянию, при котором значительное или чрезмерное потребление калорий не дестабилизирует метаболические маркеры, такие как уровень глюкозы в крови, липидемия или масса тела. В одном варианте осуществления изобретения хорошее состояние метаболизма относится к состоянию, при котором значительное или чрезмерное потребление калорий не дестабилизирует массу тела.

В контексте настоящего изобретения измерение "воспаления" относится к провоспалительным маркерам в плазме и/или тканях, например, липосахариду (ЛПС – LPS), гаптоглобину и цитокинам.

Изобретение также относится к способу стимулирования эндокринной функции кишечника и повышения чувствительности поджелудочной железы к глюкозе во взрослом возрасте у потомства самки, включающему стадию

- введения эффективного количества фруктоолигосахаридов

i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства, и/или

ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема

- предотвращения метаболических расстройств, связанных с дисбалансом во взрослом возрасте указанного потомства.

Настоящее изобретение далее дополнительно проиллюстрировано дополнительным описанием и графическими материалами, которые ссылаются на иллюстративные примеры.

Однако следует понимать, что эти примеры приведены только в качестве иллюстрации изобретения и никаким образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

"Нутрицевтическая композиция" относится к композиции с физиологическим преимуществом или обеспечивающей защиту от физиологических расстройств или дискомфорта. В контексте настоящего изобретения физиологические расстройства связаны с метаболическими расстройствами. Под

"функциональной пищей" или "здоровой пищей" подразумевают модифицированную пищу или модифицированный пищевой ингредиент, оказывающий полезное или защитное действие в отношении расстройств или дискомфорта, помимо питательных веществ, которые он содержит. Нутрицевтическая или пищевая композиция в соответствии с настоящим изобретением обеспечивает хорошее состояние здоровья взрослого животного после введения композиции по настоящему изобретению в течение перинатального периода, предпочтительно через две недели после отъема. Нутрицевтическая или пищевая композиция в соответствии с настоящим изобретением приводит к хорошему состоянию здоровья взрослого животного после введения композиции по настоящему изобретению его матери в течение периода беременности и/или вскармливания.

В контексте настоящего документа, везде, где применяют фразу "например", "такой как", "включающий" и тому подобное, следует понимать фразу "и без ограничения", если явно не указано иное. Таким образом, "например, получение этанола" означает "например, и без ограничения, получение этанола".

"Приблизительно" означает ссылочный числовой показатель плюс или минус 10 процентов указанного ссылочного числового показателя. Например, термин приблизительно 4 будет включать диапазон от 3,6 до 4,4. Все числа, выражающие количества ингредиентов, условий реакции и т.д., применяемые в описании, следует понимать, как измененные во всех случаях термином "приблизительно". Соответственно, если не указано иное, числовые параметры, раскрытые в настоящем документе, являются приблизительными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые должны быть получены. По меньшей мере, и не как попытка ограничить применение теории эквивалентов к объему какого-либо пункта формулы изобретения, каждый числовой параметр должен быть истолкован в свете количества значащих цифр и обычных подходов округления.

"Необязательный" или "необязательно" означает, что впоследствии описанное событие или обстоятельство может или не может произойти, и что описание включает случаи, когда упомянутое событие или обстоятельство происходит, и случаи, когда это не происходит. Например, фраза "среда может необязательно содержать глюкозу" означает, что среда может содержать или не содержать глюкозу в качестве ингредиента и что описание включает как среду, содержащую глюкозу, так и среду, не содержащую глюкозу.

Несмотря на различные значения термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "состоящий из" могут быть заменены друг другом во всем приведенном выше описании изобретения.

В рамках настоящего описания все соединения, полипептиды и пептиды могут быть необязательно выделены и/или очищены.

Изобретение будет дополнительно раскрыто с учетом следующих примеров и графических материалов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1: Обзор плана исследования. Двадцать девять свиноматок и их поросят применяли в 2 воспроизведениях (n равно 17 в $1^{-ом}$ воспроизведении (R1) и n равно 12 во $2^{-ом}$ воспроизведении (R2)). За 28 дней до предполагаемого дня опороса, свиноматкам давали либо контрольный рацион (n равно 15, группа Контроль), либо рацион с добавлением короткоцепочечных фруктоолигосахаридов (кцФОС) (n равно 14, группа кцФОС) до конца лактации. Плазму собирали у поросят на подсосе (n равно 170) на 21 день постнатального периода (PND) и у поросят-отъемышей на 77 день постнатального периода (n равно 79), 190 день постнатального периода (n равно 35) и 253 день постнатального периода (n равно 35) для анализа

гомеостаза глюкозы на различных стадиях. В конце эксперимента на 267 день постнатального периода (n равно 24) проводили внутривенный (IV) глюкозо-толерантный тест для оценки гомеостаза глюкозы. Фекалии собирали на 21, 190, 211 и 253 дни постнатального периода (n равно 14/возраст сбора) для определения образования короткоцепочечных жирных кислот (кцЖК – SCFA - short chain fatty acids), отражающего ферментативную активность микробиоты. Семнадцать поросят умерщвляли на 21 день постнатального периода для исследования развития энтеропанкреатической оси и 24 свиньи на взрослой стадии для оценки адаптации энтеропанкреатической оси к 3-месячному рациону с высоким содержанием жиров (HF).

Фигура 2: Масса тела и потребление пищи у взрослых свиней A) Рост взрослых свиней (n равно 17 Контроль и n равно 18 кцФОС). Рост значительно увеличивался со временем (P меньше 0,001) независимо от питания в перинатальный период. B) Потребление энергии, выраженное в МДж/д/кг массы тела (n равно 17 Контроль и n равно 18 кцФОС). Потребление энергии уменьшалось со временем (P меньше 0,001), и наблюдалась тенденция к взаимосвязи между питанием в перинатальный период и временем (P равно 0,09). Средние значения ± стандартная ошибка среднего значения (SEM). *: P меньше 0,05 против Контроля. #: P меньше 0,10 против Контроля. Контроль, контрольный рацион; кцФОС, рацион с добавлением кцФОС; HF, рацион с высоким содержанием жиров.

Фигура 3: Плотность L-клеток, секретирующих GLP-1, в слепой кишке, и концентрация GLP-1 в плазме на 273 день постнатального периода A) Плотность L-клеток, секретирующих GLP-1, в слепой кишке (n равно 11 Контроль и n равно 13 кцФОС). B) Концентрация GLP-1 в плазме после голодания в течение ночи (n равно 11 Контроль и n равно 13 кцФОС). Средние значения ± стандартная ошибка среднего значения; *: P меньше 0,05; #: P меньше 0,10. Контроль, контрольный рацион; кцФОС, рацион с добавлением кцФОС.

Фигура 4: Реакция на глюкозу и инсулиновая реакция на внутривенный глюкозо-толерантный тест на 267 день постнатального периода, A) Профиль инсулина (n равно 11 Контроль и n равно 13 кцФОС). B) Профиль глюкозы (n равно 11 Контроль и n равно 13 кцФОС). Средние значения ± стандартная ошибка среднего значения; *: P меньше 0,05 против Контроля; #: P меньше 0,10 против Контроля. Контроль, контрольный рацион; кцФОС, рацион с добавлением кцФОС.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение будет лучше понято при помощи следующих примеров, иллюстрирующих изобретение неограничивающим образом.

Материалы и методы

Животные, рационы и схема исследования

Протокол исследования был разработан в соответствии с законодательством Европейского союза (директива 86/609/EEC) и Франции (приказ 2001-464 от 29.05.01) по уходу и применению лабораторных животных (соглашение о содержании животных под номером B-35-275-32). Двадцать девять свиноматок (Large White × Landrace) и их поросят ((Large White × Landrace) × Pietrain) из экспериментальной группы французского Национального института сельскохозяйственных исследований (INRA, Сен-Жиль, Франция) применяли в 2 воспроизведениях (n равно 17 в 1$^{-ом}$ воспроизведении (R1) и n равно 12 во 2$^{-ом}$ воспроизведении (R2)). За 28 дней до предполагаемого дня опороса свиноматкам давали стандартное питание (Cooperl, Ламбаль, Франция) с добавлением либо кцФОС (95% кцФОС с длиной молекулярной цепи от 3 до 5 мономерных звеньев, Profeed® P95, Beghin-Meiji, Маркольсайм, Франция; группа кцФОС; n

равно 14), либо мальтодекстрина в качестве контроля (MALDEX, Tereos Syral, Маркольсайм, Франция; группа Контроль; n равно 15) (фигура 1). Свиноматкам давали 3 кг день$^{-1}$ корма во время беременности, и они находились на неограниченном (ad libitum) рационе во время лактации, что приводило к приблизительному ежедневному потреблению 10 г кцФОС в течение экспериментальных периодов беременности и лактации, как подробно описано ранее (Le Bourgot et al., 2014). До отъема поросята, вскармливаемые свиноматкой, не имели доступа к подкорму. В период отъема (28 день постнатального периода) поросята находились на неограниченном (ad libitum) коммерческом стартерном рационе (Cooperl) с добавлением 0,15 % мальтодекстрина (Контроль; n равно 42) или кцФОС (кцФОС; n равно 37) в соответствии с материнской диетой в течение от 4 до 7 недель. Затем случайных свиней отбирали для продолжения исследования (n равно 17 Контроль и n равно 18 кцФОС) и выращивали на рационе для производственного выращивания (Cooperl) до достижения возраста 6 месяцев и на высокоэнергетическом рационе с высоким содержанием жиров (HF), разработанном в INRA, для обеспечения 22,6 % энергии из жиров до 9 месяцев (274 день постнатального периода) (фигура 1). Массу тела потомка измеряли еженедельно до отъема, а затем каждые две недели в течение периода приема добавок. Начиная со 155 дня постнатального периода (за 5 недель до введения рациона HF) свиней взвешивали еженедельно до конца эксперимента. Свиней подвергали ежедневному мониторингу на предмет потребления пищи, а также лихорадки или диареи. Не проводили лечение какими-либо лекарственными средствами или антибиотиками в течение всего экспериментального протокола. Композиция рационов свиноматок и свиней приведена в дополнительной таблице 1.

	Беременность	Лактация	Стартерный рацион (1ая фаза)	Стартерный рацион (2ая фаза)	Стандартный рацион	HF рацион
Ингредиенты (г кг$^{-1}$ на массу свежей продукции)						
Пшеница	229	256	-	232	262	420,3
Кукуруза	110	120	-	250	160	-
Ячмень	348	257	453	241	255,5	150,0
Пшеничные отруби	159	100	-	-	50	80
Соевая мука	100	180	175	226	190	150
Сало	-	-	-	-	-	100
Соевый белок	-	-	25	-	-	-
Обезвоженная сыворотка	-	-	200	-	-	-
Обезжиренное молоко	-	-	80	-	-	-
Меласса	-	30	-	-	30	20
Пальмовое масло	20	20	23	5,0	20	-
Мальтодекстрин или кцФОС	3,3	1,5	1,5	1,5	-	-

Карбонат кальция	17,3	12,0	14,1	11,3	12,9	8
Дикальцийфосфат	3,0	10,2	-	-	5	10
Хлорид натрия	4,5	4,5	-	4,0	4,5	5
Микроэлементы и витаминная смесь[1]	5,0	5,0	5,0	5,0	6,1	6

Дополнительная таблица 1. Композиция рационов

[1]Премикс (Cooperl, Ламбаль, Франция), добавляемый на килограмм рациона: ретинол 10000 ед., холекальциферол 1500 ед., α-токоферол 45 мг, менадион 2 мг, тиамин 2 мг, рибофлавин 4 мг, ниацин 20 мг, D-пантотеновая кислота 10,9 мг, пиридоксин 3 мг, D-биотин 0,2 мг, фолиевая кислота 3 мг, витамин B12 20 мкг, холин 500 мг, Fe 81,5 мг в виде карбоната и сульфата железа, Cu 10 мг в виде сульфата меди, Mn 40 мг в виде оксида марганца, Zn 99,2 мг в виде оксида цинка, Co 0,1 мг в виде карбоната кобальта, I 0,6 мг и Se 0,3 мг.

Сбор проб фекалий и крови

Образцы фекалий и крови собирали на разных этапах развития в ходе исследования. Образцы фекалий собирали на 21, 50, 190, 211 и 253 день постнатального периода (n равно 7 на группу питания и на возраст) для определения образования кцЖК, отражающей ферментативную активность микробиоты (фигура 1). Кровь собирали в подгруппе поросят на 21 день постнатального периода (n равно 91 Контроль и n равно 79 кцФОС) и после отъема, на 77 день постнатального периода (n равно 42 Контроль и n равно 37 кцФОС), на 190 день постнатального периода (n равно 17 Контроль и n равно 18 кцФОС) и 253 день постнатального периода (n равно 17 Контроль и n равно 18 кцФОС) в пробирки, содержащие ЭДТА. После центрифугирования образцы плазмы хранили при минус 20 °C для дальнейшего анализа концентраций глюкозы и инсулина, а также маркеров воспаления.

Сбор образцов ткани

На 21 и 274 дни постнатального периода умерщвляли 17 (n равно 9 Контроль и n равно 8 кцФОС) и 24 (n равно 11 Контроль и n равно 13 кцФОС) свиней соответственно, на экспериментальной бойне путем электрического оглушения и обескровливания (фигура 1). После вскрытия кишечной полости собирали портальную кровь (21 день постнатального периода) в пробирки, содержащие ингибитор дипептидилпептидазы-IV (DPP-IV) (10 мкл/мл крови, Millipore, Биллерика, США) и ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Ткани кишечника из подвздошной кишки, слепой кишки и толстой кишки (21 и 274 день постнатального периода) собирали, промывали холодным PBS (фосфатно-солевой буфер) и хранили при минус 80 °C до экстракции GLP-1 и анализа. Для более поздних иммуногистохимических анализов, вскрывали образцы объемом 1 $см^3$ из слепой кишки и из тела эндокринной поджелудочной железы и фиксировали в 4% параформальдегиде. Другой образец тела поджелудочной железы собирали и хранили непосредственно при минус 80 °C для экстракции инсулина. Образцы дорсальной длиннейшей мышцы, висцеральной жировой ткани и дорсальной подкожной жировой ткани замораживали в жидком азоте и хранили при минус 80 °C до дальнейшего анализа молекулярной биологии.

Внутривенный глюкозо-толерантный тест (ВВГТТ)

На 253 день постнатального периода вводили катетер под общим наркозом в одну наружную яремную вену животных (n равно 11 Контроль и n равно 13 кцФОС). Через неделю после операции, после ночного голодания, проводили внутривенный (IV) глюкозо-толерантный тест (ВВГТТ), состоящий из нескольких отборов проб крови: два основных образца брали за 30 и 15 минут до внутривенного введения глюкозы (0,5 г/кг массы тела) и в моменты времени 0 (сразу после окончания введения глюкозы), через 3, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 и 75 минут после введения глюкозы. Кровь собирали в пробирки, содержащие ЭДТА (или ЭДТА плюс ингибитор DPP-IV, как описано выше для основных образцов). После центрифугирования образцы плазмы хранили при минус 20 °C (или минус 80 °C для основных образцов) для последующих анализов. Анализы инсулина и глюкозы выполняли на всех образцах плазмы, а анализы GLP-1 выполняли только на основных образцах. Площадь приращения под кривой (AUC) рассчитывали в течение 75 и 30 минут для глюкозы и инсулина. Также рассчитали острую инсулиновую реакцию (AIR = средняя концентрация инсулина выше основных значений в течение первых 6 минут) и скорость исчезновения глюкозы (K_G = отрицательный наклон прямой регрессии, полученный с логарифмически преобразованными значениями глюкозы в плазме от 3 до 30 минут, в % в минуту). Чувствительность к инсулину оценивали по основным значениям глюкозы (G_b) и инсулина (I_b) натощак с применением модели гомеостаза для оценки индекса инсулинорезистентности (HOMA-IR = $(G_b \times I_b)/22,5$) и путем расчета индекса S_2, который, как описано, хорошо коррелирует с индексом чувствительности к инсулину, полученным золотым стандартом - эугликемическим гиперинсулинемическим клэмп-тестом (Christoffersen et al., 2009) и принимая во внимание $AUC_{0\text{-}30мин}$ инсулина и K_G. Реакцию на глюкозу и инсулиновую реакцию также интегрировали с применением минимальной модели, описанной Bergman (Bergman, 2005), для получения индекса S_I чувствительности к инсулину, а также индекса эффективности глюкозы S_G.

Анализы на гормоны, глюкозу, липиды и маркеры воспаления

Инсулин выделяли из поджелудочной железы в 20 мл этанолового раствора кислоты (1,5 % HCl 12M, 75 % абсолютного этанола, 23,5 % H_2O). Концентрации инсулина измеряли в экстрактах плазмы и поджелудочной железы (разведение 1:3000) способом РИА с применением йодированного свиного инсулина (INSULIN-CT, CisbioBioassays, Кодоле, Франция). GLP-1 экстрагировали из слизистой подвздошной кишки, слепой кишки и толстой кишки путем гомогенизации 1 г ткани в 5 мл этанолового раствора кислоты (1 % HCl 12M, 74 % абсолютного этанола, 25 % H_2O). Затем измеряли концентрацию GLP-1 в образцах плазмы и кишечника (разведения 1:1000, 1:200 и 1:250 для слизистой подвздошной кишки, слепой кишки и толстой кишки соответственно) с применением набора ELISA GLP-1 (активный) (Millipore). Глюкозу в плазме, неэтерифицированные жирные кислоты (НЭЖК), триглицериды, холестерин и гаптоглобин оценивали автоматическим спектрофотометрическим способом (Konelab 20i, Thermo Fisher Scientific, Илькирш, Франция) с применением специальных коммерческих наборов для каждого маркера (Biomérieux, Брюз, Франция), липосахариды в плазме измеряли с применением набора ELISA для свиного липосахарида (MyBiosource, Сан-Диего, США).

Иммуногистохимический анализ

После фиксации в течение 24 часов в 4% параформальдегиде, образцы поджелудочной железы и слепой кишки подвергали криозащите в течение ночи при 4 °C в PBS, содержащем 30 % сахарозы, в составе соединения OCT (TissueTek, Sakura Finetek Europe B.V., Зутервауде, Нидерланды), замораживали в изопентане и разрезали (10 мкм) с помощью криостата-микротома. Иммуногистохимический анализ поджелудочной железы проводили, как описано ранее (Blat et al., 2011), с получением количества и площади островков, а также процента эндокринной ткани. Срезы слепой кишки инкубировали с 4% нормальной

лошадиной сывороткой и Triton X-100 (0,5%) в PBS в течение 30 минут. Затем срезы в течение ночи подвергали воздействию анти-GLP-1 антител кролика (1:500; Abcam, Кембридж, Великобритания). Затем промывали PBS и инкубировали с антикроличьим антителом, конъюгированным с FITC (1:200; Jackson Immuno Research, Балтимор, США), в течение 3 часов. Срезы снова промывали PBS и покрывали покровным стеклом с Vectashield (Vector Labs, Берлингейм, США). Срезы исследовали с применением флуоресцентного микроскопа (Eclipse E400, Nikon Instruments France, Шампиньи-Сюр-Марн, Франция), прикрепленного к цифровой камере (Digital Still DXM 1200, Nikon Instruments Франция). Весь участок ткани сканировали с применением цифрового слайд-сканера (Nanozoomer 2.0-RS, Hamamatsu Photonics France SARL, Маси, Франция). Записанные файлы анализировали с применением программного обеспечения NDPI (Hamamatsu Photonics) для определения количества клеток, секретирующих GLP-1, на площадь слизистой оболочки.

Экстракция РНК и количественная ПЦР в реальном времени (количественная ПЦР)

Тотальную РНК из образцов жировой ткани и мышц экстрагировали способом TRIzol (Invitrogen, Франция). Извлеченные образцы РНК определяли количественно с применением спектрофотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Качество РНК проверяли с применением набора Agilent RNA 6000 Nano и биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technologies France, Маси, Франция). Все образцы соответствовали критериям качества. Тотальную РНК (2 мкг) применяли для получения кДНК путем обратной транскрипции, выполненной в соответствии с протоколом производителя (Набор High Capacity Complementary DNA Reverse Transcription; Applied Biosystems). ПЦР в реальном времени выполняли на устройстве для ПЦР в реальном времени StepOnePlus с применением мастер-микса SyberGreen (Applied Biosystems) для обнаружения. RPL4, GAPDH и YWHAZ применяли в качестве генов "домашнего хозяйства" для образцов мышечной и висцеральной жировой ткани, в то время как GAPDH и HPRT1 применяли в качестве генов "домашнего хозяйства" для образцов подкожной жировой ткани в соответствии с их стабильностью (дополнительная таблица 2). Исследуемые гены анализировали в соответствии со способом $2^{-\Delta\Delta CT}$, который основан на относительном количественном определении обработанной группы (кцФОС) по отношению к необработанной группе (Контроль).

Дополнительная таблица 2: Праймеры, которые используют для количественной ПЦР в реальном времени (RT-PCR)

Ген	Прямой (5’ – 3’)	Обратный (5’ – 3’)
Гены "домашнего хозяйства"		
RPL4	CAAGAGTAACTACAACCTTC	GAACTCTACGATGAATCTTC
GAPDH	CATCCATGACAACTTCGGCA	GCATGGACTGTGGTCATGAGTC
YWHAZ	ATGCAACCAACACATCCTATC	GCATTATTAGCGTGCTGTCTT
HPRT1	CCGAGGATTTGGAAAAGGT	CTATTTCTGTTCAGTGCTTTGAT
Целевые гены		
INSR	TTCTTCGAACCCCGAGTACCT	CGATGTCCCTGGCGTTTC
SREBP1C	CTTCCTTCAGCAGAGCAACCA	GTCCTTCAGAGACTTGCTTTTGTG
GLUT4	GGCAGCCCCTCATCATTG	TCGAAGATGCTGGTTGAATAGTAGAA
IL-10	TGAGAACAGCTGCATCCACTTC	TCTGGTCCTTCGTTTGAAAGAAA

TNFα	GGTTATCGGCCCCCAGAA	TGGGCGACGGGCTTATC

Измерение кцЖК в содержимом фекалий

Сразу после сбора добавляли 1 мл 0,5% раствора ортофосфорной кислоты на 1 г содержимого, и образцы центрифугировали при 1700 g в течение 15 минут при 4 °C. Супернатанты хранили при минус 20 °C до выполнения анализа кцЖК с помощью газовой хроматографии (Jouany et al., 1981).

Статистический анализ

Для обработки данных использовали анализ ANOVA с применением R Core Team (2013; R Фонд статистических вычислений (R Foundation for Statistical Computing), Вена, Австрия; URL http://www.R-project.org/). Двухфакторный анализ ANOVA с рационом (Контроль против кцФОС), воспроизведениями (R1 против R2) и их взаимосвязи в качестве факторов проводили для массы тела, метаболических и воспалительных параметров в каждом возрасте. Массу тела взрослой свиньи и потребление энергии в течение периода потребления рациона HF подвергали анализу ANOVA с повторными измерениями, включая рацион (Контроль против кцФОС), время (недели), воспроизведения (R1 против R2) и взаимосвязи между рационом и временем и рационом и воспроизведениями. Когда влияние рациона или взаимосвязь между рационом и временем были значительными, различия между группами питания в каждый момент времени дополнительно измеряли с помощью ретроспективного (post-hoc) анализа (тест Тьюки). Таким же образом с помощью ANOVA анализировали инсулиновую реакцию и реакцию на глюкозу на ВВГТТ с повторными измерениями, включая рацион (Контроль против кцФОС), время (минуты после введения глюкозы), воспроизведения (R1 против R2) и взаимосвязи между рационом и временем и рационом и воспроизведением с последующим ретроспективным анализом (тест Тьюки). Корреляцию между всеми параметрами оценивали с применением метода ранговой корреляции Спирмена. Все данные представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего значения. Статистическую значимость определяли как значение P меньше или равно 0,05, и тенденцию как значение P меньше или равно 0,10.

Результаты

Раннее введение кцФОС не влияло на массу тела и потребление энергии

Раннее введение кцФОС не влияло на массу тела на любой стадии развития (до 190 дня постнатального периода) (Таблица 1 и фигура 2A). Рацион HF не вызывал дальнейших различий в росте между свиньями, получавшими кцФОС, и свиньями контрольной группы (фигура 2A), даже если свиньи кцФОС имели тенденцию потреблять больше энергии в течение 1$^{-й}$ (P равно 0,02) и 8$^{-й}$ недель (P равно 0,07) получения рациона HF (фигура 2B).

Таблица 1: Рост потомства на протяжении всего исследования и состав тела на взрослой стадии

	Контроль	кцФОС	Значение p рациона
Масса тела при рождении, кг	1,46 ± 0,03	1,40 ± 0,02	0,11
Масса тела на 28 день постнатального периода, кг	9,15 ± 0,14	9,02 ± 0,16	0,54
Масса тела на 56 день постнатального периода, кг	19,48 ± 0,41	19,74 ± 0,49	0,66
Масса тела на 190 день постнатального периода, кг	146,7 ± 3,4	147,3 ± 3,6	0,56
Переход на рацион HF	Контроль	кцФОС	Значение p рациона

Масса тела на 274 день постнатального периода, кг	214,7 ± 3,3	217,6 ± 4,4	0,80

Средние значения ± стандартная ошибка среднего значения; PND, день постнатального периода; Контроль, контрольный рацион; кцФОС, рацион с добавлением кцФОС; HF, рацион с высоким содержанием жиров.

Раннее добавление кцФОС запрограммировало энтероинсулярную ось и метаболизм глюкозы у взрослых свиней

Плотность L-клеток, секретирующих GLP-1, в слепой кишке была выше (+ 33 %) в группе кцФОС по сравнению со свиньями группы Контроля (P равно 0,03; фигура 3A). Одновременно концентрация GLP-1 в плазме натощак имела тенденцию к увеличению приблизительно в два раза в группе кцФОС по сравнению с группой Контроля (P равно 0,09; фигура 3B). Интересно, что эти два параметра положительно коррелировали (P равно 0,05, R равно 0,47). В поджелудочной железе не было выявлено различий ни в доле эндокринной ткани (0,97 ± 0,16 % для группы Контроль и 0,96 ± 0,09 % для группы кцФОС), ни в содержании инсулина (6,70 ± 1,61 мкЕ/г для группы Контроля и 7,20 ± 1,57 мкЕ/г для группы кцФОС). Однако содержание инсулина в поджелудочной железе положительно коррелировало с плотностью L-клеток, секретирующих GLP-1. в слепой кишке (P равно 0,001, R равно 0,65).

Концентрация глюкозы и инсулина натощак в плазме не отличалась между группами ни до (190 день постнатального периода), ни после (253 день постнатального периода) периода рациона HF (таблица 2), как и концентрации липидов (триглицериды, свободные жирные кислоты и общий холестерин; данные не показаны). Когда гомеостаз глюкозы изучали путем внутривенной инъекции дозы глюкозы (ВВГТТ), животные, получавшие кцФОС, секретировали больше инсулина, чем животные контрольной группы без различий в профиле глюкозы (фигура 4). Рассчитанные показатели по профилям инсулина и глюкозы показали тенденцию к повышению AUC инсулина через 0-30 мин после инъекции глюкозы свиньям, получавшим кцФОС (P равно 0,07), а также к снижению индекса S_2 (P равно 0,09) и значительному снижению индекса S_I (P равно 0,02) (таблица 2). Отрицательную корреляцию установили между $AUC_{0\text{-}30мин}$ глюкозы и L-клетками, продуцирующими GLP-1 в слепой кишке (P равно 0,001, R равно -0,62).

Таблица 2: Показатели гликемии, инсулинемии и ВВГТТ до и после 3-месячного получения рациона HF у взрослых свиней

	Контроль	кцФОС	Значение p рациона
190[1] день постнатального периода			
Содержание глюкозы в крови натощак, ммоль/л	4,49 ± 0,12	4,46 ± 0,15	0,629
Содержание инсулина в крови натощак, мкЕ/мл	18,70 ± 1,29	18,17 ± 2,08	0,436
HOMA-IR	3,80 ± 0,32	3,80 ± 0,64	0,440
253[2] день постнатального периода			
Глюкоза, ммоль/л	4,75 ± 0,12	4,84 ± 0,12	0,872
Инсулин, мкЕ/мл	17,54 ± 2,47	18,15 ± 1,97	0,878

HOMA-IR	3,77 ± 0,55	4,03 ± 0,53	0,956
Показатели ВВГТТ			
$AUC_{глюкоза\ 0\text{-}30мин}$	503,5 ± 21,8	521,8 ± 14,8	0,483
$AUC_{инсулин\ 0\text{-}30мин}$	4235,1 ± 339,5	5316,5 ± 430,8	0,068
$AIR_{инсулин\ 0\text{-}6мин}$	114,5 ± 9,5	136,6 ± 11,6	0,164
K_G (%/мин)	4,19 ± 0,42	4,0 ± 0,27	0,695
S_2 ($мин^{-1}.(мкЕ.мл^{-1})^{-1}$)	3,72 ± 0,61	2,66 ± 0,23	0,085
S_i ($10^4.мин^{-1}.(мкЕ.мл^{-1})^{-1}$)	6,89 ± 0,81	5,31 ± 0,84	0,019
S_G ($10^2.мин^{-1}$)	2,51 ± 0,24	2,04 ± 0,21	0,109

Средние значения ± стандартная ошибка среднего значения.

[1] состояние на стандартном рационе; [2] состояние на рационе HF.

Контроль, контрольный рацион; кцФОС, рацион с добавлением кцФОС; PND, день постнатального периода; HOMA-IR, модель гомеостаза оценки инсулинорезистентности; HF, рацион с высоким содержанием жиров; AUC, площадь под кривой; AIR, острая инсулиновая реакция; K_G, скорость исчезновения глюкозы; S_2 и S_i, показатели чувствительности к инсулину; S_G, индекс эффективности глюкозы.

Раннее употребление кцФОС не изменяло чувствительность к инсулину, но приводило к снижению экспрессии провоспалительных цитокинов в периферических тканях.

Ни по одному из изученных генов, представляющих чувствительность к инсулину в мышечной и жировой тканях, не обнаруживали различий в уровнях мРНК между группами Контроль и кцФОС на 273 день постнатального периода (таблица 3). Экспрессия TNFα и IL-10 также не отличалась между животными, получавшими кцФОС, и контрольной группой в подкожной жировой ткани, но наблюдали достоверное снижение экспрессии TNFα в висцеральной жировой ткани свиней, получавшими кцФОС, по сравнению со свиньями группы Контроль (P равно 0,02; Таблица 3).

Таблица 3: Экспрессия генов, связанных с чувствительностью к инсулину и воспалением в мышцах и жировой ткани

	Контроль	кцФОС	Значение p рациона
Мышцы			
GLUT4	1,01 ± 0,04	1,00 ± 0,08	0,67
INSR	1,02 ± 0,06	1,11 ± 0,06	0,28
Подкожная жировая ткань			
GLUT4	1,11 ± 0,16	0,83 ± 0,08	0,12
INSR	1,05 ± 1,00	0,86 ± 0,08	0,14
SREBP1C	1,03 ± 0,09	0,83 ± 0,08	0,10

IL-10	1,12 ± 0,15	1,45 ± 0,24	0,66
TNFα	1,10 ± 0,13	1,22 ± 0,18	0,59
Висцеральная жировая ткань			
GLUT4	1,06 ± 0,23	0,76 ± 0,09	0,23
INSR	1,02 ± 0,17	0,85 ± 0,06	0,27
SREBP1C	1,01 ± 0,12	0,76 ± 0,09	0,20
TNFα	1,03 ± 0,20	0,50 ± 0,09	0,02

Значения выражены как отношение относительной экспрессии группы кцФОС к контрольной группе. Контроль, контрольный рацион; кцФОС, рацион с добавлением кцФОС. Прием кцФОС в перинатальный период приводил к изменению метаболической активности микробиоты в течение всей жизни потомства.

Общая продукция кцЖК увеличилась у поросят на подсосе (21 день постнатального периода), матери которых получали добавку кцФОС (P равно 0,001; таблица 5), в частности ацетат, пропионат, валерат и капроат. После отъема никаких различий не наблюдали ни в конце приема кцФОС (50 день постнатального периода), ни на 190 день постнатального периода при стандартной диете. Через три недели после начала рациона HF свиньи, получавшие кцФОС, имели тенденцию демонстрировать более высокую концентрацию ацетата в фекалиях (Контроль-HF: 52,3 ± 3,3 ммоль/кг и кцФОС-HF: 67,2 ± 7,5 ммоль/кг; P равно 0,09), который не сохранялся, через 6 недель не наблюдали различий между группами (таблица 5).

Таблица 5: Концентрация короткоцепочечных жирных кислот в фекалиях (ммоль/кг)

	Контроль	кцФОС	Значение p рациона
21 день постнатального периода			
Общее содержание кцЖК	16,5 ± 4,6	33,4 ± 2,8	0,001
Ацетат	10,0 ± 2,7	20,5 ± 1,5	0,003
Пропионат	1,9 ± 0,6	4,9 ± 0,6	0,005
Бутират	1,7 ± 0,6	3,1 ± 1,0	0,37
50 день постнатального периода	138,7 ± 24,2	127,3 ± 19,1	0,70
190 день постнатального периода	101,3 ± 12,4	106,0 ± 8,3	0,76
Переход на рацион HF	Контроль	кцФОС	Значение p рациона
211 день постнатального периода			
Общее содержание кцЖК	90,1 ± 6,1	114,1 ± 13,2	0,12
Ацетат	52,3 ± 3,3	67,2 ± 7,5	0,09
Пропионат	18,9 ± 1,3	23,0 ± 2,4	0,16
Бутират	10,7 ± 1,3	13,7 ± 2,4	0,28
253 день постнатального периода	91,4 ± 16,1	87,5 ± 7,1	0,83

Средние значения ± стандартная ошибка среднего значения. *Добавка кцФОС в перинатальный период приводила к достоверному увеличению содержания ацетата, пропионата, валерата и капроата в фекалиях (P меньше 0,05); #Добавка кцФОС в перинатальный период имела тенденцию увеличивать содержание ацетата в фекалиях (P равно 0,09).

Контроль, контрольный рацион; кцФОС, рацион с добавлением кцФОС; PND, день постнатального периода; HF, рацион с высоким содержанием жиров.

Обсуждение

Накопленные данные свидетельствуют о том, что питание во время внутриутробного и раннего постнатального периода приводит к микробиальному, метаболическому и иммунному развитию у потомства, что впоследствии сказывается на их чувствительности к метаболическим расстройствам. Программирование поджелудочной железы хорошо описано, но об импринтинге эндокринной функции кишечника известно мало, несмотря на увеличение количества данных, свидетельствующих о том, что кишечник подвержен такому пищевому импринтингу. Цель настоящего изобретения состояла в том, чтобы определить, могут ли перинатальные добавки с пребиотиками, которые, как известно, хорошо балансируют микробиоту кишечника, улучшить физиологию кишечника, энтероинсулярную ось и гомеостаз глюкозы у взрослого потомства для того, чтобы ограничить развитие метаболических и/или воспалительных расстройств, вызванных несбалансированным питанием, с применением обычных свиней в качестве модели человека. Авторы настоящего изобретения показали, что добавки кцФОС в перинатальный период программируют энтероэндокринную функцию с повышенной чувствительностью поджелудочной железы к глюкозе в зависимости от GLP-1, а также сопротивляемостью к воспалению, что может быть полезно, чтобы справиться с несбалансированным питанием во взрослом возрасте.

Добавки кцФОС в перинатальный период не оказывали воздействия на параметры роста, а также увеличение массы тела во время получения рациона HF, даже если свиньи, получавшие кцФОС, имели тенденцию поглощать больше энергии. Обе группы регулировали свое потребление энергии после первой недели перехода на рацион HF и не демонстрировали развития гиперфагии. В действительности, не выявлено влияния ни на системный воспалительный статус, ни на чувствительность периферических тканей к инсулину. Интересно, что даже если она тяжелее, висцеральная ткань свиней, получавших кцФОС, экспрессировала меньше TNFα по сравнению с группой Контроля. Hallam et. al. показали снижение доли общего жира в организме взрослых крыс, получавших рацион с высоким содержанием жиров и высоким содержанием сахарозы (HFHS), матери которых получали добавку с пребиотиком (Hallam & Reimer, 2013). Это несоответствие может быть объяснено более высокой дозой пребиотика и различным периодом приема добавок в их исследовании (21,6 % в течение всей беременности) по сравнению с настоящим изобретением (0,33 % в течение последней трети беременности и 0,15 % в период вскармливания и после отъема), а также различным составом рациона в зрелом возрасте (HF против HFHS) (Hallam & Reimer, 2013).

Тенденцию к более высокой концентрации GLP-1 натощак наблюдали у взрослых свиней, которые получали добавки кцФОС в раннем возрасте, в связи со значительным увеличением плотности L-клеток, секретирующих GLP-1, в слепой кишке. Эти данные указывают на повышенную способность взрослого потомка группы кцФОС секретировать GLP-1. Взрослые крысы после получения добавки олигофруктозы в перинатальный период не показали изменений в постпрандиальном уровне GLP-1, но показали увеличение концентрации желудочного ингибиторного пептида, другого гормона инкретина, секретируемого более проксимальными K-клетками (Hallam & Reimer, 2013). Кроме того, при приеме непосредственно внутрь

здоровыми взрослыми или взрослыми с метаболическими нарушениями (рацион HF или люди с избыточной массой тела), пребиотики увеличивают количество кишечных L-клеток, продуцирующих GLP-1, содержание GLP-1 и уровни циркулирующего в крови GLP-1 у людей, крыс и мышей (Cani et al., 2004; Cani et al., 2006; Delmee et al., 2006; Cani et al., 2007; Cani et al., 2009; Everard et al., 2011; Kaji et al., 2011; Parnell & Reimer, 2012), что, в свою очередь, может привести к улучшению их метаболического статуса (Everard & Cani, 2013). КцЖК, продуцируемые микробиотой после приема кцФОС, увеличивают образование и высвобождение GLP-1 энтероэндокринными L-клетками в кишечнике и способствуют дифференцировке L-клеток в криптах (Kaji et al., 2011). Авторы настоящего изобретения показали, что добавка кцФОС в перинатальный период оказывает такое же влияние на L-клетки, как и прямое потребление пребиотика через семь месяцев после прекращения приема пребиотика. Одной из гипотез является поддержание с течением времени благоприятной микробиоты, особенно с высокой ферментативной активностью, установленной в раннем возрасте. Это подтверждается положительной корреляцией, наблюдаемой между общей продукцией кцЖК и концентрацией GLP-1 в плазме. Общее содержание кцЖК было увеличено в фекалиях поросят на подсосе группы кцФОС (21 день постнатального периода), что указывает на потенциальную модуляцию микробиоты, поскольку продукция метаболита зависит от состава микробиоты в просвете кишечника и его субстратов. В связи с этими ранними модификациями метаболитов, добавки кцФОС матерям индуцировали улучшение толерантности к глюкозе у поросят на подсосе, количество инсулина, необходимое для возврата к базальной гликемии после вскармливания, уменьшалось. Изменений в плотности L-клеток кишечника не выявлено, но у поросят на подсосе группы кцФОС была выявлена тенденция к снижению концентрации GLP-1 в плазме. Ранее авторами изобретения было показано, что прием матерями кцФОС (поздняя беременность и весь период лактации) вызывал повышенную выработку бутирата в содержимом толстой кишки через месяц после отъема (Le Bourgot et al., в пересмотре) и повышенную ферментативную активность микробиоты у поросят возрастом три месяца (Le Bourgot et al., 2014). В настоящем изобретении авторами была выявлена другая адаптация к рациону HF с большим количеством ацетата, вырабатываемого у взрослых свиней из группы кцФОС через три недели после начала несбалансированного питания, что позволяет предположить, что различия в составе микробиоты могут сохраняться до зрелого возраста. Соответственно, модуляция микробиоты в раннем возрасте путем поглощения пребиотика матерями вызывала постоянные модификации с увеличением Bifidobacterium spp. и Clostridium coccoides у потомства крыс во взрослом возрасте (Hallam et al., 2014). Таким образом, в настоящем изобретении продемонстрировано программирование эндокринной функции кишечника, вероятно, опосредованное ранним установлением полезной микробиоты и ее метаболической активности.

После высвобождения из L-клеток кишечника GLP-1 стимулирует секрецию инсулина и оказывает трофический эффект на поджелудочную железу, регулируя пролиферацию и дифференцировку островковых клеток (Baggio & Drucker, 2007). Не наблюдалось различий в анатомии поджелудочной железы и содержании инсулина между взрослыми свиньями группы кцФОС и Контроля, но в группе кцФОС, как правило, выделялось больше инсулина в ответ на внутривенный (IV) глюкозный стимул без изменения профиля глюкозы. Это повышенное высвобождение инсулина подчеркнуло более высокую чувствительность поджелудочной железы к глюкозе у свиней группы кцФОС, поскольку они не демонстрировали резистентности к инсулину в периферических тканях. Это может быть связано с их более высокой базальной концентрацией GLP-1, как предположили Chan et. al. которые продемонстрировали, что увеличение дозы GLP-1 стимулировало высвобождение инсулина во время ВВГТТ у мышей (Chan et al., 2011). Наблюдалась положительная корреляция между плотностью L-клеток, секретирующих GLP-1, и

содержанием инсулина поджелудочной железы, что лежало в основе роли GLP-1 в выделении инсулина поджелудочной железы в настоящем исследовании. Это соответствовало данным о диабетических мышах, получавших корм с высоким содержанием жиров, у которых добавление олигофруктозы в течение четырех недель было эффективным для снижения постпрандиальной гликемии и натощак в сочетании с повышенными уровнями инсулина в плазме и поджелудочной железе, в зависимости от GLP-1 через повышенную концентрацию GLP-1 в плазме и общее содержание GLP-1 в проксимальном отделе толстой кишки (Cani et al., 2006). В настоящем изобретении авторами не было выявлено изменений профиля глюкозы во время выполнения внутривенного глюкозо-толерантный теста (ВВГТТ), но отрицательная корреляция, наблюдаемая между $AUC_{глюкоза}$ и L-клетками, продуцирующими GLP-1, подтверждает роль эндокринной функции кишечника в регуляции гомеостаза глюкозы.

Повышенная активность IAP (Intestinal alkaline phosphatase - кишечная щелочная фосфатаза) может помочь при хроническом снижении концентрации ЛПС в плазме и тем самым снизить метаболическую эндотоксемию, которая способствует метаболическим расстройствам, связанным с потреблением рациона HF (Everard & Cani, 2013). Хотя не было выявлено достоверных различий в уровне ЛПС в плазме, численные значения были на 37 % ниже у свиней группы кцФОС, и, еще раз, экспрессия TNFα в их висцеральной жировой ткани была значительно снижена по сравнению со свиньями контрольной группы. Соответственно, Hallam et al. показали снижение ЛПС в плазме у взрослых крыс, получавших добавку пребиотиков в раннем возрасте, что связано с более высокой распространенностью Bifidobacterium spp., которая предположительно опосредована молочными олигосахаридами (Hallam et al., 2014). В настоящем изобретении авторы наблюдали другой состав макроэлементов молока свиноматки с добавлением кцФОС матерям, что могло бы способствовать модуляции состава и метаболизма микробиоты, колонизирующей кишку новорожденного, и, следовательно, ее длительные эффекты (Hallam et al., 2014). Было показано, что экспрессия IAP контролируется микробиотой кишечника (Bates et al., 2007), а также высвобождением sIgA (секреторный иммуноглобулин A) в просвете кишечника (Ohland & Jobin, 2015), поддерживая потенциальную персистенцию модуляции микробиоты в зрелом возрасте, вызванной добавлением кцФОС в перинатальный период.

Регуляторные пути, включая эпигенетические модификации, не могут быть исключены, даже если их изучение не входит в объем настоящего изобретения. Действительно, эпигенетические изменения, происходящие во время внутриутробного и постнатального развития, приводят к формированию тканей и органов, что может повлиять на здоровье ребенка с возможными последствиями в зрелом возрасте. Кишечная микробиота оказывает существенное влияние на эпигеном хозяина своим составом и большим количеством продуцируемых метаболитов, таких как фолат, бутират и ацетат (Mischke & Plosch, 2013).

В целом, в настоящем исследовании впервые продемонстрировано, что кишечная эндокринная функция и восприимчивость к воспалению у взрослых свиней подвергаются пищевому импринтингу, который может участвовать в метаболическом импринтинге. Перинатальные добавки кцФОС, которые, как известно, хорошо формируют микробиоту, могут быть интересной стратегией для предотвращения метаболических расстройств и предрасположенности к воспалению на более поздних этапах жизни, особенно при столкновении с вредной питательной средой. Дальнейшие исследования специфической взаимосвязи между перинатальным приемом кцФОС и микробиотой остаются востребованы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Ajslev TA, Andersen CS, Gamborg M, Sorensen TI & Jess T. (2011). Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. Int J Obes (Lond) 35, 522-529.

Baggio LL & Drucker DJ. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology 132, 2131-2157.

Bates JM, Akerlund J, Mittge E & Guillemin K. (2007). Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. Cell Host Microbe 2, 371-382.

Bedford Russell AR & Murch SH. (2006). Could peripartum antibiotics have delayed health consequences for the infant? Bjog 113, 758-765.

Bergman RN. (2005). Minimal model: perspective from 2005. Horm Res 64 Suppl 3, 8-15.

Bertin E, Gangnerau MN, Bailbe D & Portha B. (1999). Glucose metabolism and beta-cell mass in adult offspring of rats protein and/or energy restricted during the last week of pregnancy. Am J Physiol 277, E11-17.

Boudry G, Jamin A, Chatelais L, Gras-Le Guen C, Michel C & Le Huerou-Luron I. (2013). Dietary protein excess during neonatal life alters colonic microbiota and mucosal response to inflammatory mediators later in life in female pigs. J Nutr 143, 1225-1232.

Boullier S, Tanguy M, Kadaoui KA, Caubet C, Sansonetti P, Corthesy B & Phalipon A. (2009). Secretory IgA-mediated neutralization of Shigella flexneri prevents intestinal tissue destruction by down-regulating inflammatory circuits. J Immunol 183, 5879-5885.

Cani PD, Dewever C & Delzenne NM. (2004). Inulin-type fructans modulate gastrointestinal peptides involved in appetite regulation (glucagon-like peptide-1 and ghrelin) in rats. Br J Nutr 92, 521-526.

Cani PD, Hoste S, Guiot Y & Delzenne NM. (2007). Dietary non-digestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. Br J Nutr 98, 32-37.

Cani PD, Knauf C, Iglesias MA, Drucker DJ, Delzenne NM & Burcelin R. (2006). Improvement of glucose tolerance and hepatic insulin sensitivity by oligofructose requires a functional glucagon-like peptide 1 receptor. Diabetes 55, 1484-1490.

Cani PD, Possemiers S, Van de Wiele T, Guiot Y, Everard A, Rottier O, Geurts L, Naslain D, Neyrinck A, Lambert DM, Muccioli GG & Delzenne NM. (2009). Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. Gut 58, 1091-1103.

Chan HM, Jain R, Ahren B, Pacini G & D'Argenio DZ. (2011). Effects of increasing doses of glucagon-like peptide-1 on insulin-releasing phases during intravenous glucose administration in mice. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 300, R1126-1133.

Chatelais L, Jamin A, Gras-Le Guen C, Lalles JP, Le Huerou-Luron I & Boudry G. (2011). The level of protein in milk formula modifies ileal sensitivity to LPS later in life in a piglet model. PLoS One 6, e19594.

Christoffersen B, Ribel U, Raun K, Golozoubova V & Pacini G. (2009). Evaluation of different methods for assessment of insulin sensitivity in Gottingen minipigs: introduction of a new, simpler method. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 297, R1195-1201.

Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko AV, Leung JM, Cho I, Kim SG, Li H, Gao Z, Mahana D, Zarate Rodriguez JG, Rogers AB, Robine N, Loke P & Blaser MJ. (2014). Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. Cell 158, 705-721.

De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G & Lionetti P. (2010). Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. Proc Natl Acad Sci U S A 107, 14691-14696.

Delmee E, Cani PD, Gual G, Knauf C, Burcelin R, Maton N & Delzenne NM. (2006). Relation between colonic proglucagon expression and metabolic response to oligofructose in high fat diet-fed mice. Life Sci 79, 1007-1013.

Everard A & Cani PD. (2013). Diabetes, obesity and gut microbiota. Best Pract Res Clin Gastroenterol 27, 73-83.

Everard A, Lazarevic V, Derrien M, Girard M, Muccioli GG, Neyrinck AM, Possemiers S, Van Holle A, Francois P, de Vos WM, Delzenne NM, Schrenzel J & Cani PD. (2011). Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. Diabetes 60, 2775-2786.

Fanca-Berthon P, Michel C, Pagniez A, Rival M, Van Seuningen I, Darmaun D & Hoebler C. (2009). Intrauterine growth restriction alters postnatal colonic barrier maturation in rats. Pediatr Res 66, 47-52.

Fujiwara R, Watanabe J & Sonoyama K. (2008). Assessing changes in composition of intestinal microbiota in neonatal BALB/c mice through cluster analysis of molecular markers. Br J Nutr 99, 1174-1177.

Garofano A, Czernichow P & Breant B. (1998). Beta-cell mass and proliferation following late fetal and early postnatal malnutrition in the rat. Diabetologia 41, 1114-1120.

Garofano A, Czernichow P & Breant B. (1999). Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. Diabetologia 42, 711-718.

Gluckman PD, Hanson MA & Beedle AS. (2007). Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. Am J Hum Biol 19, 1-19.

Godfrey KM, Gluckman PD & Hanson MA. (2010). Developmental origins of metabolic disease: life course and intergenerational perspectives. Trends Endocrinol Metab 21, 199-205.

Hallam MC, Barile D, Meyrand M, German JB & Reimer RA. (2014). Maternal high-protein or high-prebiotic-fiber diets affect maternal milk composition and gut microbiota in rat dams and their offspring. Obesity (Silver Spring) 22, 2344-2351.

Hallam MC & Reimer RA. (2013). A maternal high-protein diet predisposes female offspring to increased fat mass in adulthood whereas a prebiotic fibre diet decreases fat mass in rats. Br J Nutr 110, 1732-1741.

Jouany JP, Zainab B, Senaud J, Groliere CA, Grain J & Thivend P. (1981). Role of the rumen ciliate protozoa polyplastron-multivesiculatum, entodinium sp and isotricha-prostoma in the digestion of a mixed diet in sheep. Reproduction Nutrition Development 21, 871-884.

Kaji I, Karaki S, Tanaka R & Kuwahara A. (2011). Density distribution of free fatty acid receptor 2 (FFA2)-expressing and GLP-1-producing enteroendocrine L cells in human and rat lower intestine, and increased cell numbers after ingestion of fructo-oligosaccharide. J Mol Histol 42, 27-38.

Lalles JP. (2010). Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. Nutr Rev 68, 323-332.

Le Bourgot C, Ferret-Bernard S, Le Normand L, Savary G, Menendez-Aparicio E, Blat S, Appert-Bossard E, Respondek F & Le Huerou-Luron I. (2014). Maternal short-chain fructooligosaccharide supplementation influences intestinal immune system maturation in piglets. PLoS One 9, e107508.

Mischke M & Plosch T. (2013). More than just a gut instinct-the potential interplay between a baby's nutrition, its gut microbiome, and the epigenome. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 304, R1065-1069.

Mourot J. (2004). Control of the adiposity in breeding animals. Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France 157, 29-34.

Ohland CL & Jobin C. (2015). Microbial activities and intestinal homeostasis: A delicate balance between health and disease. Cell Mol Gastroenterol Hepatol 1, 28-40.

Pan XD, Chen FQ, Wu TX, Tang HG & Zhao ZY. (2009). Prebiotic oligosaccharides change the concentrations of short-chain fatty acids and the microbial population of mouse bowel. J Zhejiang Univ Sci B 10, 258-263.

Parnell JA & Reimer RA. (2012). Prebiotic fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA-cp rats. Br J Nutr 107, 601-613.

Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA & Stobberingh EE. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. Pediatrics 118, 511-521.

Reinhardt C, Reigstad CS & Backhed F. (2009). Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. J Pediatr Gastroenterol Nutr 48, 249-256.

Respondek F, Gerard P, Bossis M, Boschat L, Bruneau A, Rabot S, Wagner A & Martin JC. (2013). Short-chain fructo-oligosaccharides modulate intestinal microbiota and metabolic parameters of humanized gnotobiotic diet induced obesity mice. PLoS One 8, e71026.

Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall R, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Leotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM & Meheust A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. Br J Nutr 104 Suppl 2, S1-63.

Roura E, Koopmans SJ, Lalles JP, Le Huerou-Luron I, de Jager N, Schuurman T & Val-Laillet D. (2016). Critical review evaluating the pig as a model for human nutritional physiology. Nutr Res Rev 29, 60-90.

Schokker D, Zhang J, Vastenhouw SA, Heilig HG, Smidt H, Rebel JM & Smits MA. (2015). Long-lasting effects of early-life antibiotic treatment and routine animal handling on gut microbiota composition and immune system in pigs. PLoS One 10, e0116523.

Swanson KS, Grieshop CM, Flickinger EA, Bauer LL, Chow J, Wolf BW, Garleb KA & Fahey GC, Jr. (2002). Fructooligosaccharides and Lactobacillus acidophilus modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. J Nutr 132, 3721-3731.

Tolhurst G, Heffron H, Lam YS, Parker HE, Habib AM, Diakogiannaki E, Cameron J, Grosse J, Reimann F & Gribble FM. (2012). Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein-coupled receptor FFAR2. Diabetes 61, 364-371.

Trasande L, Blustein J, Liu M, Corwin E, Cox LM & Blaser MJ. (2013). Infant antibiotic exposures and early-life body mass. Int J Obes (Lond) 37, 16-23.

Yan X, Huang Y, Wang H, Du M, Hess BW, Ford SP, Nathanielsz PW & Zhu MJ. (2011). Maternal obesity induces sustained inflammation in both fetal and offspring large intestine of sheep. Inflamm Bowel Dis 17, 1513-1522.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фруктоолигосахариды (ФОС) для применения в раннем возрасте животного для предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте, где указанные метаболические расстройства выбраны из группы, включающей постпрандиальную гипергликемию, гипергликемию натощак, гиперлипидемию, избыточную массу тела, перегрузку подкожно-жировой клетчатки, перегрузку висцерального жира, замедленный катаболизм питательных веществ, кишечный и/или системный воспалительный статус, воспалительный статус жировой ткани или их комбинацию.

2. Фруктоолигосахариды для применения по п. 1, где указанные ФОС вводят в эффективном количестве

i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства, и/или

ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема.

3. Фруктоолигосахариды для применения по п. 1 или п. 2, где ФОС уравновешивают энтероинсулярную ось, предпочтительно путем увеличения так называемых инкретиновых гормонов или клеток, секретирующих инкретин.

4. Фруктоолигосахариды для применения по п. 3, где инкретин представляет собой GLP-1.

5. Фруктоолигосахариды для применения по любому из пп. 1-4, где эффективное количество ФОС для самки во время беременности и/или вскармливания ее потомства составляет от 1 до 20 г, предпочтительно от 4 до 18 г в день.

6. Фруктоолигосахариды для применения по любому из пп. 2-4, где эффективное количество ФОС для потомства составляет от 0,1 до 2 г, предпочтительно от 0,3 до 1 г в день.

7. Фруктоолигосахариды для применения по любому из пп. 2-4, где указанное потомство представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека или млекопитающее, не относящееся к человеку.

8. Фруктоолигосахариды для применения по любому из пп. 1-5, где указанные фруктоолигосахариды представляют собой короткоцепочечные фруктоолигосахариды.

9. Фруктоолигосахариды для применения в способе стимуляции эндокринной функции кишечника и повышения чувствительности поджелудочной железы к глюкозе во взрослом возрасте у потомства самки, где указанные ФОС вводят в эффективном количестве

i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства, и/или

ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема;

причем указанная стимуляция эндокринной функции кишечника или указанное повышение чувствительности поджелудочной железы к глюкозе приводит к предотвращению метаболических расстройств, связанных с дисбалансом во взрослом возрасте указанного потомства;

причем указанные метаболические расстройства выбраны из группы, включающей или состоящей из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, гиперлипидемии, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки, перегрузки висцерального жира, замедленного катаболизма питательных веществ, кишечного и/или системного воспалительного статуса или их комбинации.

10. Фруктоолигосахариды для применения для получения пищевой или нутрицевтической композиции, где указанную композицию вводят животному в раннем возрасте в способе предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте; указанные

метаболические расстройства выбраны из группы, включающей или состоящей из постпрандиальной гипергликемии, гипергликемии натощак, гиперлипидемии, избыточной массы тела, перегрузки подкожно-жировой клетчатки, перегрузки висцерального жира, замедленного катаболизма питательных веществ, кишечного и/или системного воспалительного статуса, воспалительного статуса жировой ткани или их комбинации.

11. Фруктоолигосахариды для применения по п. 10, где указанную композицию:

- вводят в эффективном количестве

i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства, и/или

ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема;

- указанная композиция уравновешивает энтероинсулярную ось, предпочтительно путем увеличения так называемых инкретиновых гормонов или клеток, секретирующих инкретин.

12. Фруктоолигосахариды для применения по п. 11, где инкретин представляет собой GLP-1 (глюкагоноподобный пептид-1).

13. Фруктоолигосахариды для применения по любому из пп. 9-11, где пищевая или нутрицевтическая композиция содержит от 0,1 до 20 г ФОС.

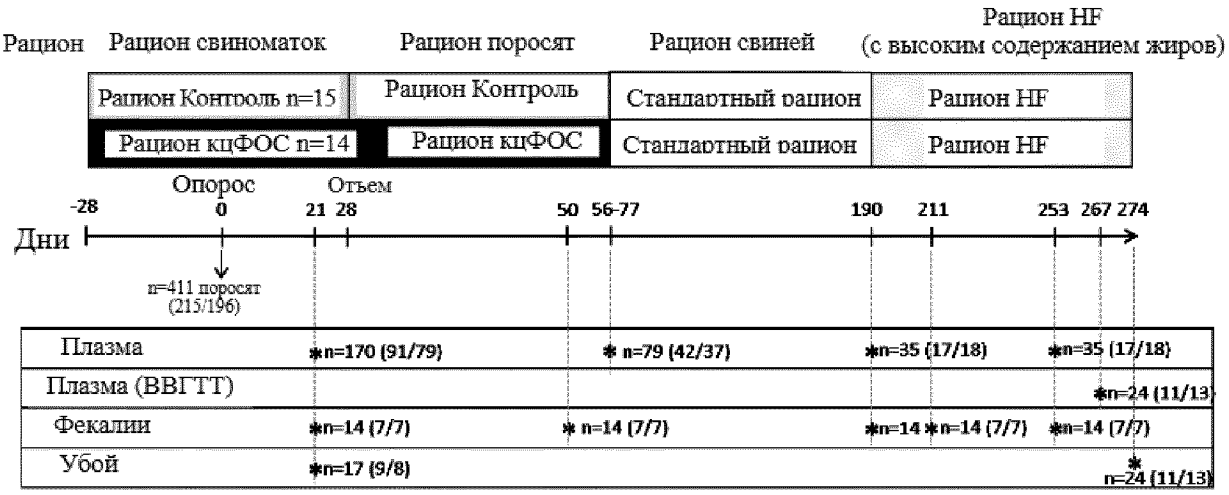
14. Фруктоолигосахариды для применения по любому из пп. 9-12, где пищевая или нутрицевтическая композиция содержит от 0,05 до 2 мас.% ФОС относительно композиции.

15. Способ выращивания убойных животных, не страдающих ожирением, включающий введение фруктоолигосахаридов в эффективном количестве:

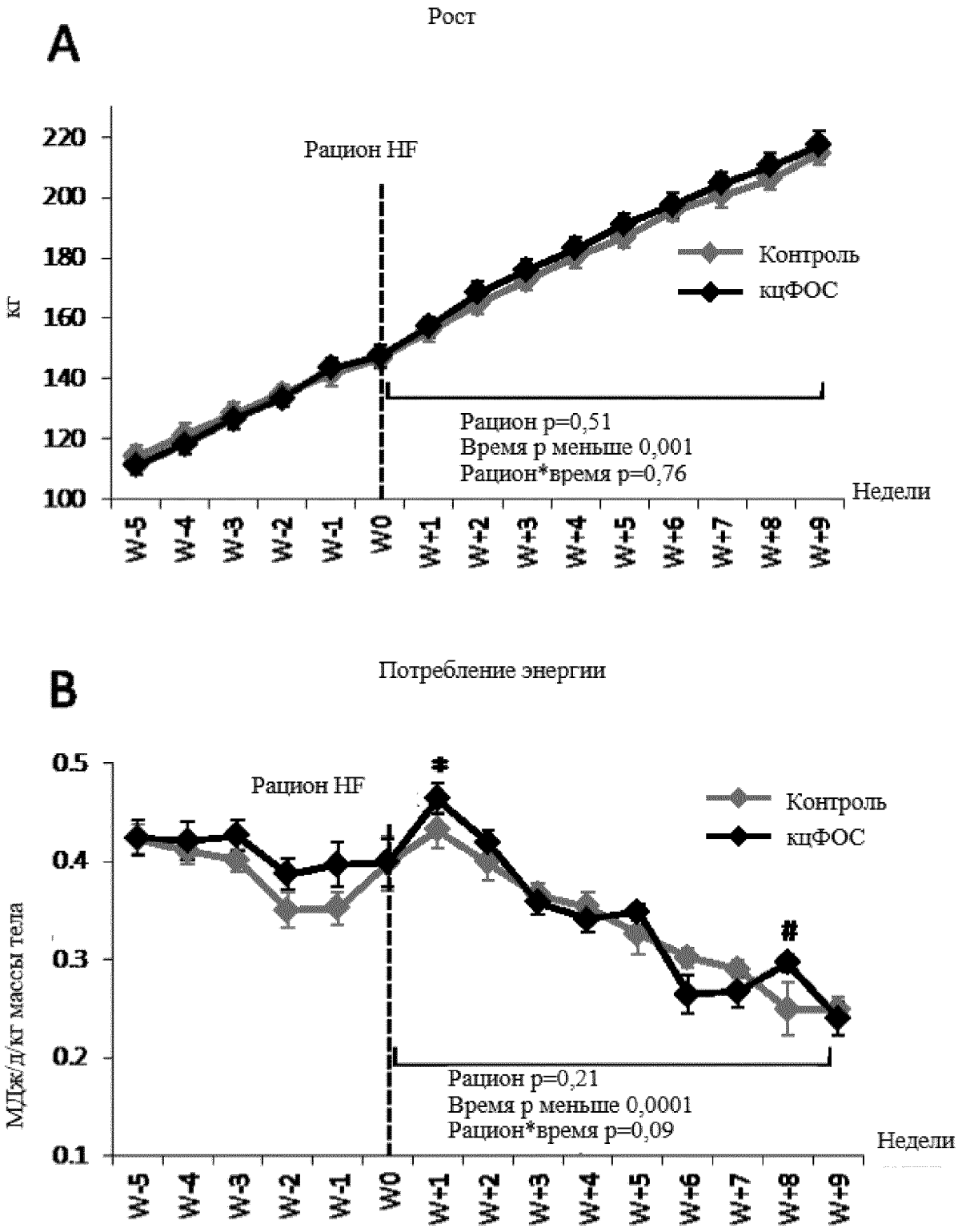
i) самке во время беременности и/или вскармливания ее потомства, и/или

ii) указанному потомству в течение по меньшей мере двух недель после отъема.

Перинатальное введение короткоцепочечных фруктоолигосахаридов
для предотвращения метаболических расстройств,
связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте

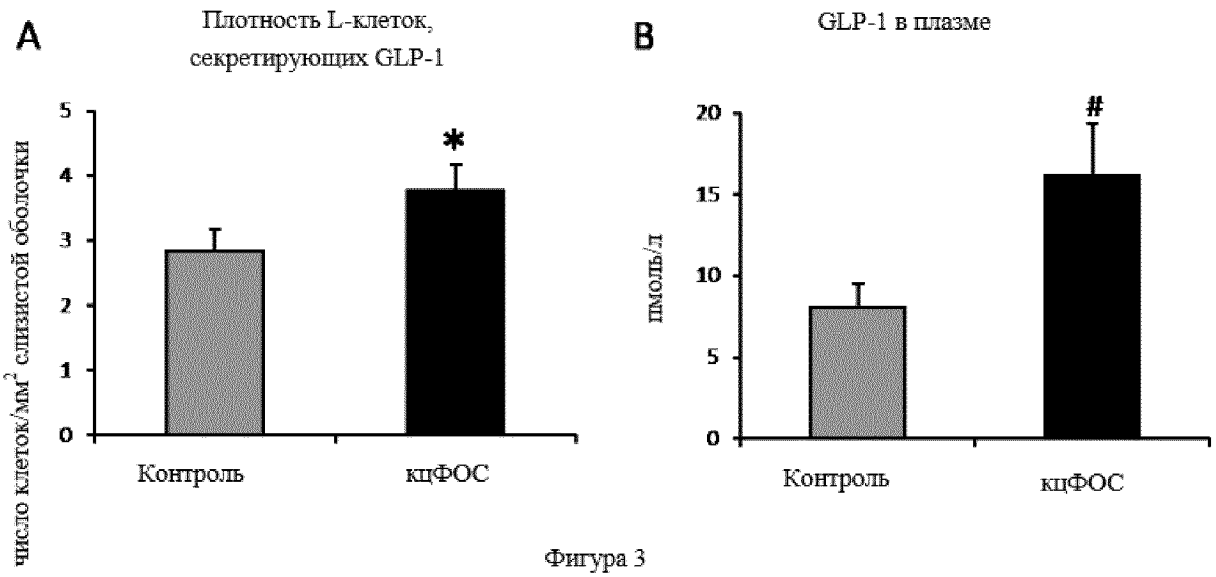


Фигура 1

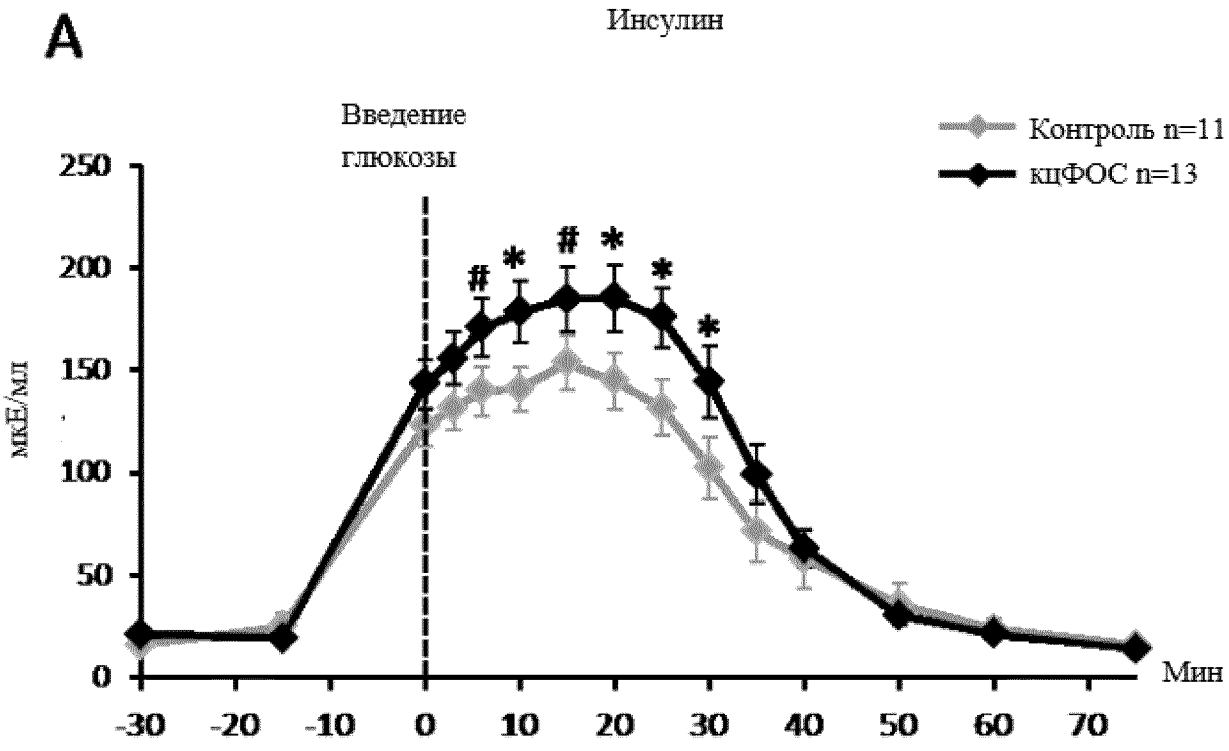

Рост
A
Рацион HF
Контроль
кцФОС
кг
220
200
180
160
140
120
100
Рацион p=0,51
Время p меньше 0,001
Рацион*время p=0,76
Недели
W-5
W-4
W-3
W-2
W-1
W0
W+1
W+2
W+3
W+4
W+5
W+6
W+7
W+8
W+9
Потребление энергии
B
Рацион HF
Контроль
кцФОС
МДж/д/кг массы тела
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
*
#
Рацион p=0,21
Время p меньше 0,0001
Рацион*время p=0,09
Недели
W-5
W-4
W-3
W-2
W-1
W0
W+1
W+2
W+3
W+4
W+5
W+6
W+7
W+8
W+9

Фигура 2

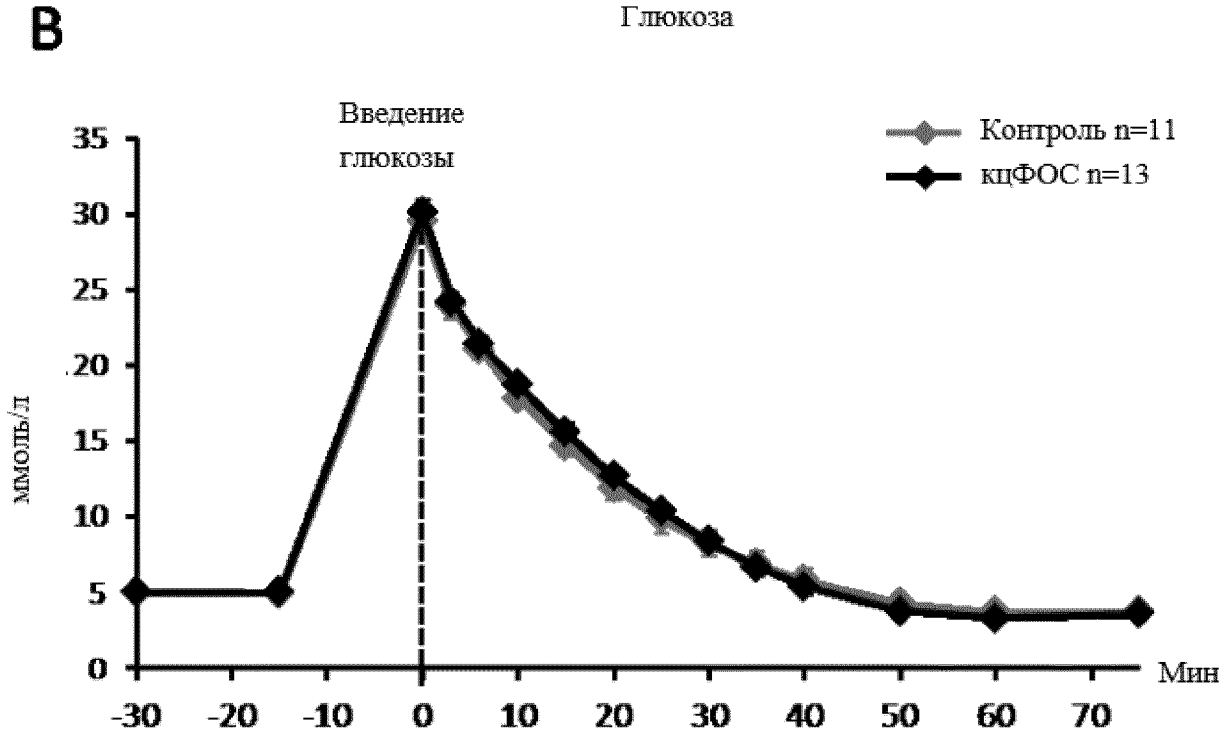
Перинатальное введение короткоцепочечных фруктоолигосахаридов для предотвращения метаболических расстройств, связанных с несбалансированным питанием во взрослом возрасте



Фигура 3



Рацион p=0,09, Время p меньше 0,0001, Рацион*время p=0,009



Рацион p=0,77, Время p меньше 0,0001, Рацион*время p=0,93

Фигура 4