

**ANTIOXIDAČNÝ ÚČINOK PROBIOTICKÉHO KMEŇA *Lactobacillus plantarum* U MODELOV ATEROSKLERÓZY A KARCINOGENÉZY**  
**ANTIOXIDATIVE EFFECT OF THE PROBIOTIC STRAIN *Lactobacillus plantarum* ON THE ATHEROSCLEROTIC AND CARCINOGENETIC MODELS**

**Pramuková Beáta<sup>1</sup>, Szabadosová Viktória<sup>1</sup>, Čokášová Denisa<sup>1</sup>, Žofčáková Jana<sup>1</sup>,  
Supuková Anna<sup>1</sup>, Salaj Rastislav<sup>1</sup>, Šoltésová Alena<sup>1</sup>, Brandeburová Andrea<sup>1</sup>, Hijová  
Emília<sup>1</sup>, Bertková Izabela<sup>1</sup>, Strojný Ladislav<sup>1</sup>, Bomba Alojz<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta, UPJŠ Košice

### Summary

Diet interventions and natural bioactive supplements have now been extensively studied to reduce risks of colon cancer and atherosclerosis, that are the major health problems throughout the world. The objective of our investigation was to study the anti-atherosclerotic and anti-carcinogenic effect of the probiotic strain *Lactobacillus plantarum* on the levels of oxidized low density lipoprotein (oxLDL) and antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) in *Sprague-Dawley* rats with colorectal cancer induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) and in rats with atherosclerosis induced by a high-fat diet (HF) (20 % fat in the diet). Forty-five male and female rats were divided into 5 groups: the untreated negative controls (K1 group) were fed a conventional diet, the untreated positive controls fed a conventional diet and with applied DMH (K2 group) and the untreated positive controls fed a HF diet (K3 group). Treated groups were K2+PRO (conventional diet + DMH + *L. plantarum*) and K3+PRO (HF diet + *L. plantarum*). *L. plantarum* significantly ( $p < 0.001$ ) decreased serum level of the oxLDL and significantly ( $p < 0.001$ ) increased serum level of the GPx in both treated groups. In conclusion, the results of this study confirmed that *L. plantarum* possess antioxidant behaviour and could exert a precautionary effect on colorectal cancer and atherosclerosis.

**Key words:** atherosclerosis, colorectal cancer, *Lactobacillus plantarum*, antioxidative effect

### ÚVOD

Zdravá výživa je dôležitým základom v prevencii kardiovaskulárnych chorôb (Dauchet et al., 2006), rakoviny (WHO/FAO, 2002), ako aj iných chronických ochorení. V ostatnom období mnohé epidemiologické štúdie a experimenty na zvieratách poukazujú na rozličné bioaktívne potravinové komponenty, ktoré sú spájané s redukciou týchto ochorení (Wollowski et al., 2001).

Ateroskleróza je progresívne patologické ochorenie, ktorého vznik je charakterizovaný endotelovou dysfunkciou, zápalom, proliferáciou buniek, formovaním aterosklerotických plakov, ich expanziou a ruptúrou, následnou trombózou postihnutej cievy a infarktom tkanív a orgánov. V iniciácii a rozvoji aterosklerózy hrá veľkú úlohu oxidačný stres, pri ktorom dochádza k nadmernej tvorbe reaktívnych foriem kyslíka (RFK) a súčasnému oslabeniu antioxidantného obranného systému organizmu. RFK sú spojené s chemotaxiou leukocytov, ktoré tak môžu priamo poškodiť endotelové a hladkosvalové bunky cievnej steny. RFK môžu oxidačne poškodiť biomolekuly akými sú uhl'ohydráty, proteíny a lipidy (Ross et al., 2001). Tak dochádza pri nadmernej tvorbe RFK aj k oxidácii LDL a vzniku oxLDL, ktoré sú pohlcované makrofágy v cievnej stene, pričom vznikajú penové bunky (Ahotupa et al., 2010). Nakoľko je oxidačný stres spojený s produkciou mitogénov a rastových faktorov, dochádza k stimulácii proliferácie buniek a vzniku včasných ateromatózných lézií.

U rakoviny je oxidačný stres spojený s nestabilitou DNA, hypermetyláciou a mutáciami reparačných génov DNA, stratou heterozygotnosti a bodovými mutáciami v mikrosatelitoch DNA. Taktiež je spojený s dereguláciou a skracovaním bunkového cyklu, ktoré vedú k neschopnosti opravy poškodenej DNA pred vstupom bunky z G1 fázy do S fázy bunkového cyklu. Oxidačný stres je považovaný za hlavný prispievajúci faktor vo vývoji rakoviny (Rosset al., 2001).

Preto je oxidačný stres hlavným príčinným mechanizmom ako pre aterosklerózu, tak aj pre kolorektálny karcinóm.

V ostatnom období sa veľká pozornosť upriamuje na probiotické mikroorganizmy, ktoré aktivujú imunitný systém črevnej mukózy a bránia jej kolonizácii patogénmi (Van Tassell a Miller, 2011). Klinicky sa dokázal aj ich antioxidačný, protizápalový (Hakansson a Molin, 2011), imunosupresívny a hypocholesterolemický účinok (Mikelsaar et al., 2010). Niektoré probiotiká inhibujú poškodenie DNA indukované karcinogénom v kolóne potkanov (Suzuki et al., 2004).

V našom experimente sme sledovali antioxidačný vplyv probiotického kmeňa *L. plantarum* na potkaních modeloch aterosklerózy a kolorektálnej karcinogenézy. Stanovený bol parameter oxidačného poškodenia lipoproteínov oxLDL a antioxidačný enzým GPx.

### MATERIÁL A METÓDY

Do pokusu bolo zaradených 45 potkanov kmeňa *Sprague-Dawley* (samce aj samice) vo veku 4 mesiace (Centrálny zvieratník Lekárskej fakulty UPJŠ v Košiciach, Slovensko), s priemernou hmotnosťou 349,7 g (rozpätie: 250 g – 448 g). Umiestnené boli v miestnosti s 12 hodinovým striedaním svetla a tmy v plastových boxoch s drôteným vrchom, pri teplote  $22 \pm 2$  °C. Zvieratá boli rozdelené do piatich nasledovných skupín po 9 jedincov (5 samcov a 4 samice):

- 1) K1 – negatívna kontrolná skupina kŕmená konvenčnou diétou (Biofer, Slovensko).
- 2) K2 – pozitívna kontrolná skupina kŕmená konvenčnou diétou (Biofer, Slovensko) a aplikovaným 1,2-dimetylhydrazínom (DMH) (Merck, Nemecko) na indukovanie kolorektálneho karcinómu.
- 3) K3 - pozitívna kontrolná skupina kŕmená vysokotukovou 20 % diétou (zdroj slnečnicový olej) (Biofer, Slovensko) na indukovanie aterosklerózy.
- 4) K2+PRO – pokusná skupina kŕmená konvenčnou diétou a aplikovaným DMH. Skupine bol podávaný probiotický kmeň *L. plantarum* ( $1 \times 10^9$  / ml) pripravovaný pri 37 °C. Následne bolo 4 ml kultúry zmiešanej s 36 ml nízkočučného mlieka a pri izbovej teplote naplnené do sklenených fľaš, ktoré sa potkanom podávali denne.
- 5) K3+PRO – pokusná skupina kŕmená vysokotukovou 20 % diétou, ktorej bol podávaný probiotický kmeň *L. plantarum* ( $1 \times 10^9$  / ml) pripravovaný ako pre skupinu K2+PRO.

Potkany mali prístup ku krmivu aj vode *ad libitum*.

DMH sa aplikoval jedenkrát týždenne po dobu 5 týždňov (2., 3., 4., 5. a 6. týždeň po nasadení diéty) v dávke 21 mg/ kg ž. hm. s. c..

Po ukončení experimentu, ktorý trval 7 mesiacov, bola potkanom v celkovej anestéze *i. p.* s Ketamínom 100 mg/ kg a Xylazínom 15 mg/ kg ž. hm. odobratá krv zo srdca.

V sére bola stanovená hladina oxLDL a GPx za použitia komerčných ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kitov (USCN Life Science Inc., USA).

Pre štatistické vyhodnotenie výsledkov bol použitý nepárový Studentov t-test a multifaktorová analýza variancie (ANOVA).

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky nameraných hodnôt parametrov oxLDL a GPx sú zhrnuté v tab. 1.

**Tab. 1 Koncentrácie meraných parametrov**

	oxLDL	GPx
	[ng/ml]	[U/ml]
<b>K1</b>	34,7 ± 5	15,7 ± 1,6
<b>K2</b>	41,2 ± 0,7	9,5 ± 0,7 <sup>b</sup>
<b>K3</b>	40,2 ± 6,8	9,5 ± 0,6 <sup>b</sup>
<b>K2+PRO</b>	30 ± 0,7 <sup>a</sup>	19,6 ± 0,4 <sup>a</sup>
<b>K3+PRO</b>	28,5 ± 1,1 <sup>a</sup>	19,7 ± 0,7 <sup>a</sup>

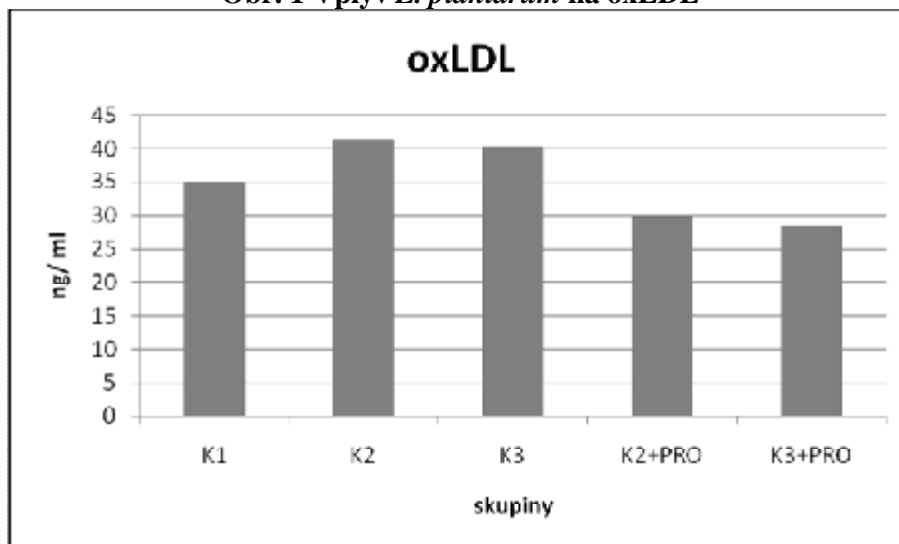
Hodnoty sú prezentované ako ± SD.

<sup>a</sup>p < 0,001 porovnanie pokusných skupín ku pozitívnym kontrolám

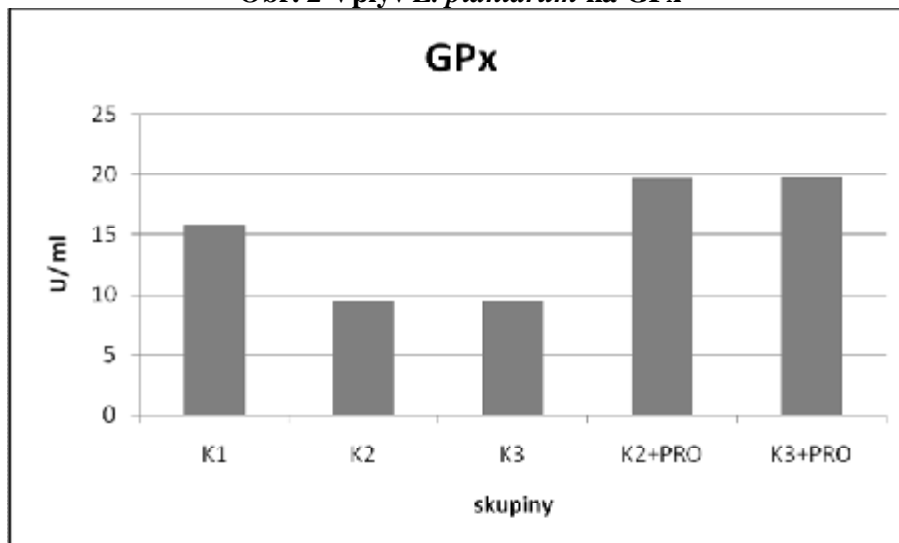
<sup>b</sup>p < 0,001 porovnanie pozitívnych kontrol ku negatívnym kontrolám

U skupín K2 a K3 došlo ku zvýšeniu hladín oxLDL oproti negatívnej kontrolnej skupine K1 čo naznačuje, že vysokotuková diéta a chemicky indukovaná karcinogénéza sú sprevádzané zvýšenou tvorbou kyslíkových radikálov, ktoré vedú k oxidácii LDL a následnej tvorbe oxLDL. Dokázalo sa to aj v mnohých iných štúdiách (Kullisaar et al, 2003, Suzuki et al., 2004). U skupín K2+PRO a K3+PRO, ktorým sa podával probiotický kmeň *L. plantarum*, došlo ku signifikantnému (p < 0,001) zníženiu hladiny oxLDL v sére (obr. 1). Tieto výsledky sú v súlade s výsledkami Mikelsaara *et al.* (2010) (Mikelsaar et al., 2010), kde *L. plantarum* taktiež znížili hladinu oxLDL v krvi.

**Obr. 1 Vplyv *L. plantarum* na oxLDL**



V našom pokuse bola hladina GPx u skupín K2 a K3 signifikantne (p < 0,001) znížená v porovnaní so skupinou K1. Podobné zníženie sledovali aj Kekec *et al.* (2009) v procese karcinogénézy a Paik *et al.* (2005) v procese aterogénézy. Signifikantné (p < 0,001) zvýšenie koncentrácie GPx v sére sa zaznamenalo u oboch pokusných skupín (obr. 2).

Obr. 2 Vplyv *L. plantarum* na GPx

Medzi oxLDL a GPx sa zistila štatisticky významná negatívna korelácia.

## ZÁVER

Z našich výsledkov vyplýva, že probiotický kmeň *L. plantarum* vykazuje antioxidantné účinky, ktoré by mohli byť využité v prevencii aterosklerózy i kolorektálneho karcinómu. Pre potvrdenie antioxidantného účinku sú potrebné následné klinické štúdie.

**Pod'akovanie:** Táto práca bola podporená Agentúrou MŠ SR pre štrukturálne fondy EÚ pod číslom projektu ITMS: 26220220104 (60 %) a projektom MŠ SR VEGA pod číslom 1/0372/10 (40 %).

## LITERATÚRA

1. AHOTUPA, M., SUOMELA, J.-P., VUORIMAA, T. et al. 2010. Lipoprotein-specific transport of circulating lipid peroxides. In *Annals of Medicine*, 2010, roč. 7, č. 42, s. 521-529.
2. DAUCHET, L., AMOUYEL, P., HERCBERG, S. et al. 2006. Fruit and vegetable consumption and risk of coronary heart disease: a meta-analysis of cohort studies. In *Journal of Nutrition*, 2006, roč. 10, č. 136, s. 2588-2593.
3. HAKANSSON, A., MOLIN, G. 2011. Gut microbiota and inflammation. In *Nutrients*, 2011, roč. 6, č. 3, s. 637 – 682.
4. KEKEC, Y., PAYDAS, S., TULI, A. et al. 2009. Antioxidant enzyme levels in cases with gastrointestinal cancer. In *European Journal of Internal Medicine*, 2009, roč. 20, č. 4, s. 403 – 406.
5. KULLISAAR, T., SONGISEPP, E., MIKELSAAR, M. et al. 2003. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. In *British Journal of Nutrition*, 2003, roč. 2, č. 90, s. 449 – 456.

6. MIKELSAAR, M., STSEPETOVA, J., HÜTT P. et al. 2010. Intestinal *Lactobacillus* sp. is associated with some cellular and metabolic characteristics of blood in elderly people. In *Anaerobe*, 2010, roč. 16, č. 3, s. 240 – 246.
7. PAIK, H.-D., PARK, J.-S., PARK, E. 2005. Effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD on lipid and antioxidant metabolism in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. In *Biological and Pharmacological Bulletin*, 2005, r. 28, č. 7, s. 1270 – 1274.
8. ROSS, J. S., STAGLIANO, N. E., DONOVAN, M. J. et al. 2001. Atherosclerosis and cancer. In *Annals of New York Academy of Sciences*, 2001, č. 947, s. 271 – 292.
9. SUZUKI, K., ITO, Y., WAKAI, K. et al. 2004. Serum oxidized low-density lipoprotein levels and risk of colorectal cancer: A case control study nested in the Japan collaborative cohort study. In *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2004, r. 13, č. 11, s. 1781 – 1787.
10. VAN TASSELL, M. L., MILLER, M. J. 2011. *Lactobacillus* adhesion to mucus. In *Nutrients*, 2011, roč. 5, č. 3, s. 613 – 636.
11. WHO/FAO. 2002. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a Joint WHO/FAO consultation, Geneva, 28 January – 1 February 2002. WHO: Geneva.
12. WOLLOWSKI, I., RECHKEMMER, G., POOL-ZOBEL, B. L. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. In *American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, roč. 73, č. 2, s. 451 – 455.

**Kontaktná adresa:**

RNDr. Beáta Pramuková, Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta UPJŠ, Trieda SNP č. 1, 040 11 Košice, e-mail: [beata.pramukova@gmail.com](mailto:beata.pramukova@gmail.com)