

**IMUNOMODULAČNÝ ÚČINOK *LACTOBACILLUS PLANTARUM*,
INULÍNU A LÍNOVÉHO OLEJA U POTKANOV S CHEMICKY
INDUKOVANOU KARCINOGENÉZOU**
IMMUNOMODULATORY EFFECT OF *LACTOBACILLUS PLANTARUM*,
INULIN AND FLAX SEED OIL IN RATS WITH CHEMICALLY INDUCED
CARCINOGENESIS

Žofčáková Jana¹, Bertková Izabela¹, Bomba Alojz¹, Lukán Norbert²

¹ Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta, UPJŠ v Košiciach

² IV. interná klinika UPJŠ LF a UN LP, Rastislavova 43, 041 90, Košice – Staré Mesto

Summary

The immune system plays an important role in defense against cancer. A number of natural substances have the anticarcinogenic potential, which may be mediated by their immunomodulatory properties. Probiotics, prebiotics and polyunsaturated fatty acids represents effective agents with anticarcinogenic and immunomodulatory effects. The aim of the experiment was to investigate the preventive effect of probiotics (Pro), prebiotics (Pre) and linseed oil (O) on the immune system of rats with chemically induced colorectal cancer. The experiment included 45 Sprague Dowley rats 4 months old, which were randomly divided into five groups (K1 - standard laboratory animal feed; K2 - standard laboratory animal feed + application of DMH, K2 + Pro - standard laboratory animal feed + application of DMH + *Lactobacillus plantarum* in fresh milk, K2 + O - standard laboratory animal feed supplemented with linseed oil + application of DMH, K2 + Pre - standard laboratory animal feed supplemented with inulin + application of DMH). Colorectal cancer was induced by five applications of 1,2-dimethylhydrazine repeated at weekly intervals at a dose of 21 mg.kg⁻¹ body weight. After 28 weeks, rats were anesthetized and samples of blood and small intestine were collected. The concentration of cytokines IL-2, IL-6 and IL-10 was measured in serum and jejunal mucosa homogenate using sandwich ELISA method. Phagocytic activity of blood monocytes and neutrophils was evaluated. Application of DMH had strong immunosuppressive effects. Bioactive substances supplemented in the diet positively affected the immune system of rats with chemically induced colorectal cancer. *L. plantarum* modulated primarily immune processes occurring in the jejunal mucosa. Administration of probiotic increased level of IL-10 and decreased concentration of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-17. The linseed oil increased level of IL-10 both in blood serum and jejunal mucosa. The best immunomodulatory effects were observed after inulin administration. The phagocytic activity was significantly increased only by administration of flaxseed oil. Probiotics, prebiotics and flaxseed oil are bioactive substances that exhibit the potential to modulate concentration of cytokines at the local and system level. The application of *L. plantarum* and inulin reduce inflammatory processes occurring in the jejunal mucosa by inhibiting the production of cytokines IL-6 and IL-17 and stimulation of IL-10 in rats with chemically induced colorectal cancer. We assume that the modulation of immune processes is one of the possible mechanisms by which probiotics and bioactive substances could inhibit the process of carcinogenesis.

Key words: probiotics, prebiotics, linseed oil, immunity, cancer prevention

ÚVOD

Každý rok je na svete diagnostikovaných viac než 1 milión nových prípadov kolorektálneho karcinómu. K rizikovým faktorom podieľajúcim sa na vzniku karcinómu hrubého čreva radíme obezitu, nedostatok pohybovej aktivity, alkohol, fajčenie a stravovacie návyky, ako je diéta s vysokým zastúpením mäsa a tukov a nízkym podielom ovocia, zeleniny a vlákniny. Karcinóm hrubého čreva sa vyvíja postupne cez štádium iniciácie, promócie a progresie, počas ktorých dochádza k akumulácii mutácií v protoonkogénoch a tumorsupresorových génoch, ktoré sa podieľajú na regulácii bunkového cyklu (Terzič et al., 2010). Sledovanie pacientov s dlhotrvajúcou ulceróznou kolitídou, ktorá je radená medzi nešpecifické črevné zápal, poukázalo na fakt, že títo pacienti majú vyššie riziko vzniku nádorov hrubého čreva. Zdá sa, že imunitný systém sa zásadným spôsobom uplatňuje ako promotor neoplastickej transformácie v hrubom čreve (Becker et al., 2005). Dôsledkom pretrvávajúceho chronického zápalu dochádza k vzniku reaktívnych kyslíkových radikálov a karcinogénnych metabolitov, ktoré indukujú v bunkách poškodenie DNA a mutácie. Chronický zápal vytvára podmienky pre progresiu neoplastického procesu, angiogénu a metastázovanie. Dochádza k zvýšenej produkcii mediátorov zápalovej reakcie ako cyklooxygenáza-2, prozápalové cytokíny a prostaglandíny, ktoré môžu potláčať bunkami sprostredkované imunitné reakcie a podporujú angiogénu. Inhibícia zápalu preto predstavuje dôležitú súčasť protinádorovej terapie (O'Byrne a Dalglish, 2001).

Ďalší faktor ovplyvňujúci rozvoj kolorektálneho karcinómu predstavuje črevná mikroflóra. Črevná mikroflóra je nevyhnutnou zložkou tráviaceho traktu, pretože sa podieľa na udržiavaní imunitnej a metabolickej homeostázy a poskytuje ochranu voči patogénnom. Na druhej strane nesprávna kompozícia mikroflóry môže podporovať proces karcinogenézy produkciou enzýmov, ktoré sa podieľajú na konverzii prokarcinogénov na karcinogény. Črevný zápal môže byť vyvolaný aj aberantným pomerom obrannej (tolerogénnej) k agresívnej (prozápalovej, protumorigénnej, poškodenie indukujúcej) mikroflóre (Scanlan et al., 2008).

Cytokíny, mediátory imunitného systému, sú kľúčovými regulátormi zápalu a pôsobia buď prozápalovo alebo protizápalovo, a preto môžu rast a progresiu nádorov stimulovať alebo inhibovať (Hussain et al., 2007). Cytokíny sú primárne produkované ako odpoveď organizmu na bunkový stres vyvolaný buď exogénnymi alebo endogénnymi agensami s cieľom regulovať, kontrolovať a minimalizovať poškodenie bunky. Avšak nekontrolovaná a nepretržitá sekrécia cytokínov môže vyústiť do zmeny bunkového rastu, diferenciácie a apoptózy. Rozvoj karcinómu je podporovaný najmä prozápalovými cytokínmi IL-1, IL-6, IL-15, TNF- α , CSF (kolónie stimulujúci faktor) a MIF (inhibičný faktor migrácie makrofágov) (Smyth, 2004). Okrem prozápalových cytokínov dôležitú úlohu v rozvoji karcinogenézy zohrávajú imunoregulačné cytokíny IL-10 a TGF- β . Pri sledovaní efektu týchto cytokínov bol zistený ich duálny účinok. Napriek tomu, že IL-10 je vo všeobecnosti považovaný za protizápalový a imunosupresívny cytokín, niektoré experimentálne štúdie odhalili jeho prozápalové účinky (Mocellin et al., 2005). Predpokladá sa, že prokarcinogénny alebo antikarcinogénny účinok IL-10 závisí od jeho koncentrácie a lokalizácie, kde je produkovaný (Salazar-Onfray et al., 2007).

V súčasnosti sa stretávame so zvýšeným záujmom o náhradu syntetických látok bioaktívnymi látkami naturálneho pôvodu najmä v oblasti výživy a preventívnych postupov v medicíne. Experimentálne štúdie naznačujú, že probiotiká, prebiotické substráty a polynenasýtené mastné kyseliny predstavujú účinné bioaktívne látky, ktoré majú potenciál ovplyvňovať rôzne fyziologické procesy, nevynímajúc reakcie imunitného systému, a preto sú často využívané v prevencii chronických chorôb, ako sú srdcovo-cievne alebo nádorové ochorenia. Probiotiká sú podľa FAO/WHO (2002) definované ako živé mikroorganizmy,

ktoré ak sú prijímané v adekvátnom množstve pozitívne ovplyvňujú zdravotný stav príjemcu. V literatúre nachádzame mnohé experimentálne štúdie popisujúce imunomodulačné vlastnosti probiotík. Sú schopné ovplyvňovať proces fagocytózy, aktivitu NK buniek, regulačných T lymfocytov a dendritických buniek, produkciu cytokínov a sekrečného IgA, regulujú Th1 verzus Th2 rovnováhu a niektoré druhy probiotík modifikujú percentuálne zastúpenie subpopulácií buniek imunitného systému v sliznici tráviaceho traktu (Takeda a Okomura, 2007; Galdeano et al., 2007). Imunomodulačný účinok probiotík je však druhovo špecifický. Medzi prebiotiká patria nestráviteľné zložky potravy, ktoré pozitívne vplyvajú na príjemcu tým, že selektívne stimulujú rast a/alebo aktivitu jedného alebo obmedzeného počtu baktérií v hrubom čreve a tým podporujú jeho zdravie (Gibson a Roberfroid, 1995). Predpokladalo sa, že účinok prebiotík na imunitný systém je nepriamy a to prostredníctvom zmien v zložení črevnej mikrobioty, ktorá následne prichádza do kontaktu s imunitnými bunkami v črevnej sliznici (Seifert a Watzl, 2007). Prebiotiká však môžu imunitný systém ovplyvňovať aj priamo prostredníctvom svojich metabolitov, mastných kyselín s krátkym reťazcom, ako je butyrát alebo propionát. Bunky imunitného systému majú v membráne prítomné povrchové receptory pre väzbu mastných kyselín. Mastné kyseliny týmto spôsobom stimulujú fagocytárnu aktivitu ako aj cytotoxickú aktivitu NK buniek (Seifert a Watzl, 2007). Polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA) predstavujú biologicky aktívne zlúčeniny lipidového charakteru, ktoré majú vplyv na viaceré funkcie organizmu, ako je lipidový metabolizmus alebo imunitné reakcie (Kaštel' et al., 2007). Ich pozitívny vplyv v prevencii kardiovaskulárnych ochorení je dlhodobou známy. Vo vzťahu k imunitným reakciám majú ω -3 a ω -6 PUFA antagonistický účinok. Kým ω -3 PUFA pôsobia protizápalovo a antiproliferatívne na bunky imunitného systému, ω -6 PUFA predstavujú prozápalové mediátory (Calder, 2009).

Keďže imunitný systém predstavuje jeden z dôležitých mechanizmov zodpovedných za obranu organizmu voči nádorovým bunkám, v experimente sme sa zamerali na jeho ovplyvnenie aplikáciou bioaktívnych naturálnych látok. Cieľom práce bolo sledovanie účinku probiotického kmeňa *Lactobacillus plantarum* LS/07 CCM 7766, inulínu a ľanového oleja na fagocytárnu aktivitu periférnych monocytov a granulocytov a na zmeny koncentrácie cytokínov IL-6, IL-10 a IL-17 v krvnom sére a v sliznici jejuna potkanov s chemicky indukovanou karcinogéznou.

MATERIÁL A METÓDY

Do experimentu bolo zaradených 45 potkanov kmeňa Sprague Dowley (25 samcov a 20 samíc) vo veku 4 mesiacov a s priemernou hmotnosťou na začiatku pokusu $356,3 \pm 18,3$ g. Zvieratá boli chované v konvenčných laboratórnych podmienkach na akreditovanom pracovisku LF UPJŠ, ktoré má akreditáciu na chov a vykonávanie pokusov na zvieratách v súlade s legislatívnymi ustanoveniami schválenými Etickou komisiou. Potkany boli kŕmené konvenčným laboratórnym krmivom, alebo krmivom s prímiesami bioaktívnych látok (inulín, ľanový olej) (Biofer, s.r.o., Prešov). Spotreba krmiva bola zaznamenávaná týždenne. Potkany boli náhodne rozdelené do 5 experimentálnych skupín:

- K₁ – kontrolná skupina, konvenčné laboratórne krmivo
- K₂ – kontrolná skupina, konvenčné laboratórne krmivo + aplikácia DMH
- K₂ + Pro - konvenčné laboratórne krmivo + probiotikum + aplikácia DMH
- K₂ + Pre - konvenčné laboratórne krmivo + prebiotikum + aplikácia DMH
- K₂ + O – konvenčné laboratórne krmivo + ľanový olej + aplikácia DMH

Doba trvania experimentu bola 28 týždňov. Týždeň po jeho začatí bol zvieratám v štyroch skupinách päť krát aplikovaný prokarcinogén 1,2-dimetylhydrazín (1,2-dimethylhydrazine, DMH, Merck, Nemecko) vyvolávajúci kolorektálny karcinóm u potkanov

v týždenných intervaloch, v dávke 21 mg.kg^{-1} živej hmotnosti. Probiotický kmeň *Lactobacillus plantarum* LS/07 CCM 7766 bol podávaný denne v mlieku v dávke $3 \times 10^9 \text{ cfu.ml}^{-1}$ MRS bujónu. Ako prebiotikum bol v experimente použitý inulín BeneoSynergy 1 (ORAFIT, Tienen, Belgicko), ktorý bol primiešaný do krmiva v dávke 8 % na kg krmiva. Ľanový olej (Dr. Kulich Pharma, ČR) s pomerom ω -6: ω -3 polynenasýtených mastných kyselín 1:3,1 bol primiešaný do konvenčného krmiva v dávke 4 % na kg krmiva.

Po skončení experimentu boli pokusným zvieratám v celkovej anestéze (ketamín v dávke 100 mg.kg^{-1} + xylazín 15 mg.kg^{-1} živej váhy, intraperitoneálne), odoberaté vzorky krvi, tenké a hrubé črevo. Krv bola scentrifugovaná 15 minút pri 2500 g, sérum odoberaté a uskladnené pri -80°C na následné stanovenie cytokínov IL-6, IL-17 a IL-10 sendvičovou ELISA metódou.

100 μl krvi bolo odoberaté do heparinizovanej skúmavky a inkubované so suspenziou teplom usmrtených kvasiniek (*Saccharomyces cerevisiae*) na miešačke 60 minút pri 37°C . Po inkubácii boli pripravené krvné nátery, ktoré boli zafarbené podľa May-Grünwalda a Giemsa-Romanowsky. Nátery boli vyhodnotené pod svetelným mikroskopom zrátaním 100 fagocytov (neutrofilý, monocyty) a počtu pohltých kvasiniek. Funkčná aktivita leukocytov bola vyhodnotená stanovením fagocytárnej aktivity a fagocytárneho indexu.

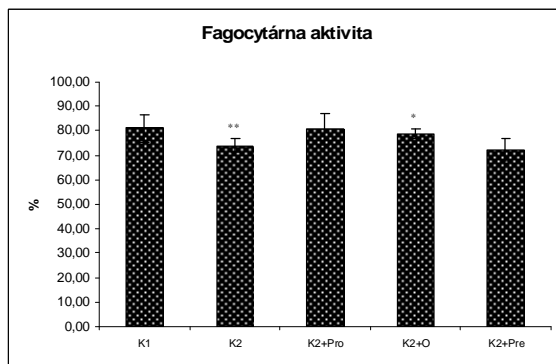
Sliznica tenkého čreva bola spracovaná podľa Nikawa et al. (1999). Tenké črevo bolo premyté v studenom fosfátovom pufrí (PBS) a zvážené. Následne bolo tenké črevo longitudinálne roztrihnuté a jejunálna sliznica bola zoškrabaná podložným sklíčkom, zvážená a uskladnená v ľade. K 50 mg sliznice bol pridaný 1 ml studeného PBS obsahujúceho 10 g.l^{-1} BSA a vzorka bola zhomogenizovaná na ľade a následne centrifugovaná 20 minút pri 4°C a 15000 g. V supernatante boli stanovené cytokíny IL-6, IL-17 a IL-10. Na stanovenie cytokínov boli použité ELISA súpravy (eBioscience Rat IL-6 Platinum ELISA; eBioscience Rat IL-17A Platinum ELISA; eBioscience Rat IL-10 Platinum ELISA). ELISA test bol vykonaný podľa inštrukcií výrobcu.

Na štatistické spracovanie a stanovenie významnosti rozdielov medzi jednotlivými skupinami sme použili Studentov dvojvýberový t test. $P \leq 0,05$ bolo považované za štatisticky významné. Výsledky sú vyjadrené ako priemer \pm smerodajná odchýlka.

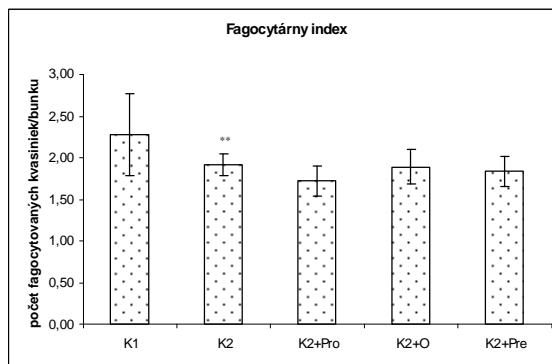
VÝSLEDKY A DISKUSIA

Priemerná hmotnosť zvierat na začiatku experimentu bola $356,3 \text{ g} \pm 18,3 \text{ g}$ a na konci pokusu došlo k signifikantnému nárastu hmotnosti na $428,0 \text{ g} \pm 25,8 \text{ g}$ ($p < 0,01$). Po aplikácii DMH došlo k miernemu poklesu hmotnosti vo všetkých skupinách avšak štatisticky nevýznamne.

Fagocytárna aktivita (%) vyjadruje pomer fagocytujúcich buniek k celkovému počtu fagocytov, pričom za fagocytujúcu bunku bola rátaná tá, ktorá pohltila aspoň jednu kvasinku. V kontrolnej skupine K_2 s indukovaným karcinómom hrubého čreva sme zaznamenali signifikantné zníženie fagocytárnej aktivity ($p < 0,01$) oproti kontrolnej zdravej skupine zvierat. Z podávaných biokatívnych látok, len aplikácia ľanového oleja pozitívne ovplyvnila fagocytárnu aktivitu (obr. 1). Fagocytárny index udáva počet kvasiniek, ktoré pripadajú na jednu fagocytujúcu bunku. Aplikácia dimetylhydrazínu štatisticky významne znížila schopnosť fagocytózy v kontrolnej skupine K_2 , avšak ani jedna z podávaných látok zásadným spôsobom neovplyvnila tento parameter (obr. 2).



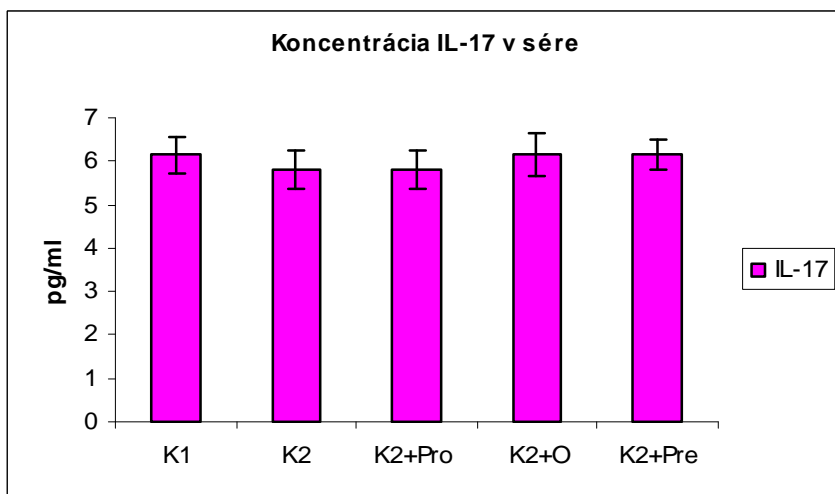
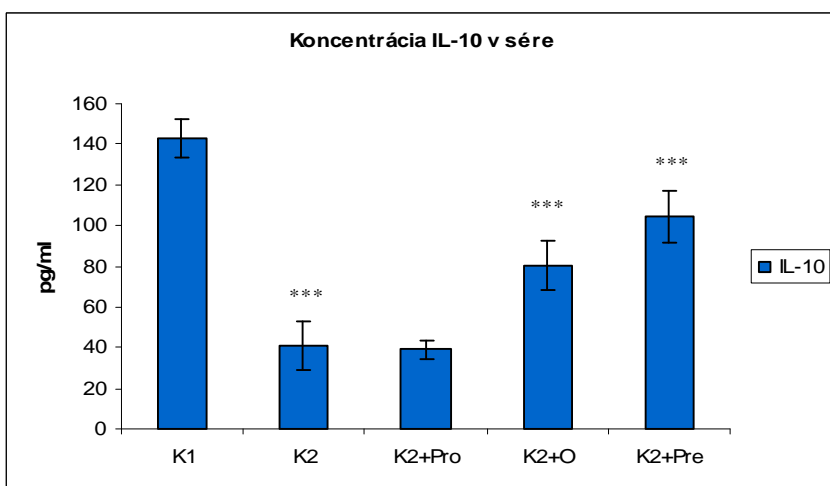
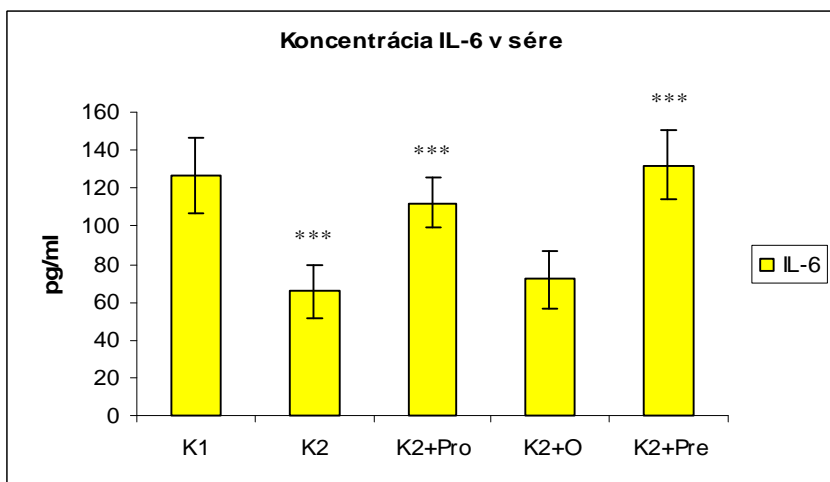
Obr. 1: Fagocytárna aktivita
(*p < 0,05; ** p < 0,01)



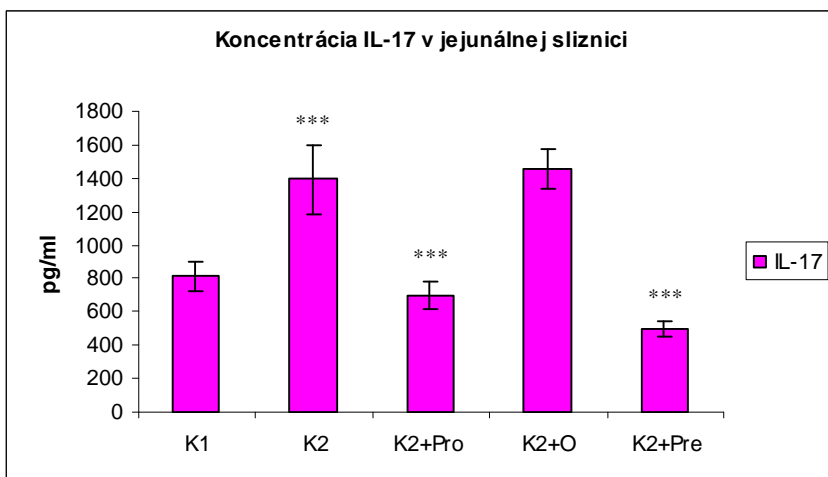
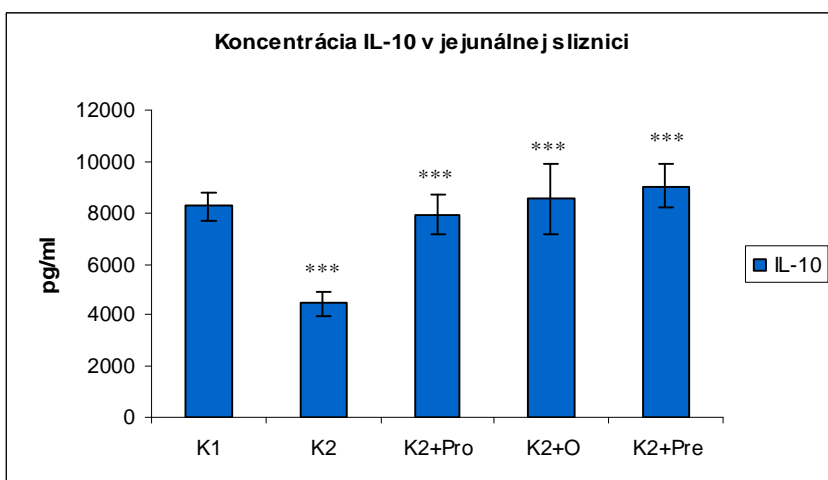
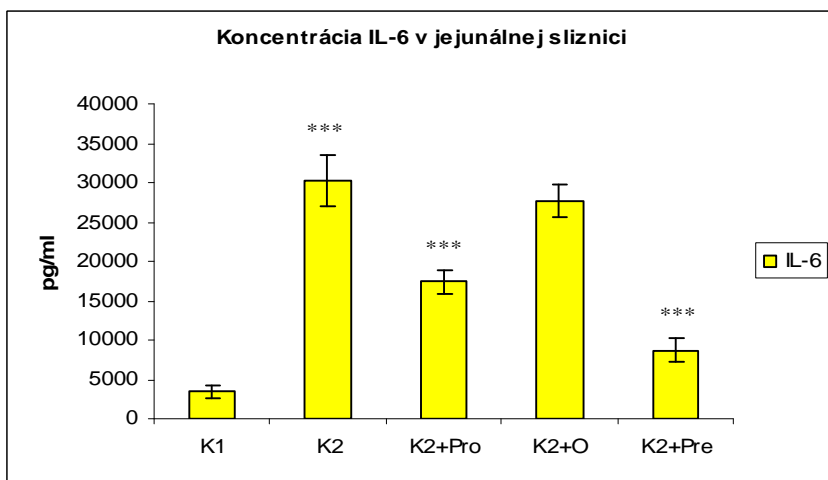
Obr. 2: Fagocytárny index
(** p < 0,01)

Na stanovenie schopnosti bioaktívnych látok ovplyvňovať humorálnu imunitu na systémovej úrovni bolo použité krvné sérum. ELISA súpravami sme stanovili koncentráciu cytokínov IL-6, IL-17 a IL-10. Oproti zdravej kontrolnej skupine K₁ sme v skupine po aplikácii DMH zaznamenali signifikantné (p < 0,001) zníženie koncentrácie cytokínov IL-6 a IL-10, avšak sérová hladina cytokínu IL-17 nebola ovplyvnená dimetylhydrazínom. Podávanie *L. plantarum* signifikantne zvýšilo koncentráciu IL-6 takmer na úroveň, ktorú sme stanovili v kontrolnej skupine K₁ (126,5 ± 19,6 pg.ml⁻¹). V skupine zvierat, u ktorých bola diéta obohatená o ľanový olej, došlo k zvýšeniu koncentrácie IL-10 (p < 0,001), pričom koncentrácie prozápalových cytokínov IL-17 a IL-6 neboli ovplyvnené. Suplementácia diéty inulínom signifikantne stimulovala sérové koncentrácie cytokínov IL-6 a IL-10 (obr. 3).

Sliznicový imunitný systém predstavuje prvotné miesto účinku bioaktívnych substancií obsiahnutých v potrave. Koncentrácia cytokínov IL-6, IL-10 a IL-17 bola stanovená ELISA metódou v jejunálnej sliznici potkanov. Aplikácia DMH signifikantne (p < 0,001) znížila koncentráciu regulačného cytokínu IL-10 a zvýšila koncentráciu prozápalových cytokínov IL-6 a IL-17. Potrava suplementovaná mliekom s probiotickým kmeňom *Lactobacillus plantarum* inhibovala produkciu prozápalových cytokínov IL-6 a IL-17, ktoré podporujú karcinogénny proces prebiehajúci v hrubom čreve. Koncentrácia IL-10 v sliznici vplyvom podávania probiotika dosiahla hodnoty zdravej kontrolnej skupiny (7928,7 ± 797,5 pg.ml⁻¹). Aplikácia ľanového oleja signifikantne zvýšila len koncentráciu sliznicového IL-10 (8539,6 ± 1347,2 pg.ml⁻¹). V pokusnej skupine zvierat, u ktorej bola diéta obohatená o inulín došlo v jejunálnej sliznici k výraznej stimulácii produkcie IL-10 (9037,5 ± 859,4 pg.ml⁻¹) a zároveň k inhibícii produkcie IL-6 aj IL-17 (8648,7 ± 1527,3 pg.ml⁻¹; 496,5 ± 51,9 pg.ml⁻¹) oproti kontrolnej skupine K₂ (obr. 4).



Obr. 3 Koncentrácia cytokínov IL-10, IL-6 a IL-17 v sére potkanov (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)



Obr.4: Koncentrácia cytokínov IL-6, IL-10 a IL-17 v jejunálnej sliznici potkanov (*p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

Aplikácia prokarcinogénu dimetylhydrazínu predstavuje pre organizmus stresový faktor, ktorý vyvoláva naštartovanie zápalových mechanizmov, čím prispieva k zahájeniu procesu neoplastickej transformácie buniek v hrubom čreve. Správne fungujúci imunitný systém disponuje spektrom mechanizmov, ktoré zabezpečujú rozpoznanie a zničenie neoplasticky transformovaných buniek. Dôležitú úlohu pri tom zohrávajú NK bunky, cytotoxické a regulačné T lymfocyty, fagocyty a dendritické bunky. Bunky imunitného systému komunikujú navzájom a s epitelovými bunkami prostredníctvom imunomediátorov - cytokínov. Probiotiká, prebiotiká a polynenasýtené mastné kyseliny majú potenciál ovplyvňovať imunitné procesy (Perdigón et al., 2002; Seifert a Watzl, 2007; Larsson, 2004, Philpott a Fergusson, 2004). Táto ich vlastnosť je dôležitá najmä u skupín osôb s nevyvinutým resp. nedostatočne fungujúcim imunitným systémom, ako sú deti, staršie osoby a imunokompromitovaní jedinci (Chiang et al., 2000). V experimente sme vychádzali z predpokladu, že stimulácia imunitných procesov aplikáciou spomínaných bioaktívnych látok zohráva dôležitú úlohu v prevencii kolorektálneho karcinómu. Zároveň sme v experimente ukázali, že pravidelný príjem prebiotík a probiotík inhibuje produkciu prozápalových cytokínov IL-6 a IL-17 v sliznici tekutého čreva, čím dochádza k zmierneniu zápalového procesu, ktorý podporuje vznik a progresiu kolorektálneho karcinómu.

Fagocytóza predstavuje jeden z mechanizmov vrodenej imunity sprostredkovaný predovšetkým neutrofilmi a monocytmi, ktorý zabezpečuje obranu voči exogénnym patogénom a je nevyhnutná aj pre odstraňovanie starých alebo poškodených buniek. Mikirova et al. (2008) dokumentujú, že granulocyty pacientov s rôznym typom nádorov v rôznom štádiu majú signifikantne zníženú schopnosť oxidatívneho vzplanutia a NADPH oxidázovú aktivitu. Dôsledkom je znížená schopnosť granulocytov fagocytovať poškodené bunky alebo cudzorodé častice. V súlade s týmto pozorovaním sme zaznamenali zníženú fagocytárnu aktivitu v karcinogénnej skupine potkanov. Napriek tomu, že viaceré štúdie popisujú stimulačný účinok probiotík na fagocytárnu aktivitu (Zhu et al., 2011; Medici et al., 2005), v našom experimente jedine ľanový olej s vyšším zastúpením ω -3 PUFA signifikantne zvýšil fagocytárnu aktivitu periférnych monocytov a granulocytov. Rovnako v kontrolnej skupine zvierat, ktorým bol aplikovaný DMH bol zaznamenaný signifikantne znížený fagocytárny index oproti zdravej skupine zvierat. Fagocyty v karcinogénnej skupine K2 neboli schopné pohltiť viac ako 2 kvasinky, kým fagocyty zdravých potkanov boli schopné pohlcovať minimálne 2 až 5 kvasiniek jednou bunkou. Tento parameter však nebol ovplyvnený ani jednou z podávaných substancií.

V experimente sme sledovali zmeny koncentrácie cytokínov IL-6, IL-10 a IL-17 po aplikácii probiotika, prebiotika a ľanového oleja a porovnali ich hladiny na systémovej a lokálnej úrovni. Keďže všetky bioaktívne látky boli podávané ako súčasť potravy, ich primárny účinok sa prejavil najmä na lokálnej úrovni v jejunálnej sliznici, kde je sústredená značná časť lymfatického tkaniva. Zdá sa, že bioaktívne substancie alebo ich metabolické produkty môžu interagovať s imunitnými bunkami nachádzajúcimi sa v črevnej stene a indukovať v nich produkciu cytokínov.

Balkwill a Mantovani (2001) uvádzajú, že onkologické ochorenia predstavujú paradox vo vzťahu k zápalu. Nádory produkujú prozápalové cytokíny, chemokíny a sú infiltrované leukocytmi. Na druhej strane, nádorové ochorenia sú charakteristické neschopnosťou zahájiť zápalovú reakciu na inom mieste ako je nádor, a cirkulujúce monocyty izolované od pacientov trpiacich rôznym druhom rakoviny nie sú schopné reagovať na chemoatraktanty. Aplikácia bioaktívnych látok, ktoré inhibujú mechanizmy vrodenej imunity, predovšetkým zápalové procesy sa prejaví chemoprotektívnym účinkom, naopak stimulovanie zápalových mechanizmov v nádorovom mikroprostredí vedie k progresii nádoru (Philpott a Fergusson, 2004). Medzibunková signalizácia prostredníctvom cytokínov môže prispievať k progresii nádorov dvoma spôsobmi: stimuláciou rastu a diferenciacie buniek, a inhibíciou apoptózy

transformovaných buniek v zápalovom ložisku (Lu et al., 2006). Prozápalové cytokíny podporujú rozvoj rôznych typov nádorov. V rozvoji kolorektálneho karcinómu dôležitú úlohu zohráva IL-6. Tento interleukín je za normálnych podmienok dôležitým regulačným faktorom proliferácie intestinálnych buniek. U pacientov s kolorektálnym karcinómom jeho sérova hladina stúpa úmerne so štádiom a veľkosťou nádora (Chung a Chang, 2003; Kaminska et al., 2000). Potkany v karcinogénnej skupine K2 mali koncentráciu IL-6 v krvnom sére signifikantne nižšiu oproti kontrolnej skupine K1. Táto skutočnosť môže byť dôsledkom počiatočného stupňa neoplastickej transformácie v hrubom čreve, keďže histologicky sme u týchto zvierat pozorovali len zápalové ložiská, ale nádory neboli prítomné. Aplikácia probiotika a prebiotika výrazne stimulovala produkciu IL-6 na systémovej úrovni. Predpokladáme, že tieto substancie môžu stimulovať zápalové mechanizmy v takej miere, ktorá je spojená s ich protektívnym účinkom proti kolorektálnemu karcinómu, keďže ani v skupinách K2+Pro a K2+Pre sme nepozorovali formované nádory. Nedávno bola popísaná nová subpopulácia T buniek – Th17 (Mangan et al., 2006), ktorá sa líši od Th1 aj Th2 subpopulácií. Lymfocyty Th17 sú charakteristické produkciou cytokínu IL-17, ktorý predstavuje kľúčový regulátor zápalu. IL-17 indukuje migráciu imunitných buniek do periférnych tkanív, kde aktivuje NF- κ B signálnu dráhu. Okrem toho, IL-17 stimuluje produkciu viacerých prozápalových cytokínov, vrátane TNF- α , IL-6 a IL-1 β . To znamená, že tento cytokín indukuje zápalovú reakciu, a navyš ju aj znásobuje (Lin a Karin, 2007). Navyš, bunky Th17 okrem IL-17, syntetizujú aj TNF- α a IL-6, ktoré s IL-17 pôsobia synergicky, čím stimulujú produkciu ďalších prozápalových mediátorov (Kolls a Lindén, 2004). V krvnom sére sme nezaznamenali zmeny koncentrácie IL-17 medzi kontrolnými skupinami K1 a K2. Podobne hladina IL-17 na systémovej úrovni nebola ovplyvnená žiadnou z podávaných látok. V rámci imunitného dohľadu nad karcinogénnym procesom má kľúčovú funkciu imunosupresívny a protizápalový cytokín IL-10. Jeho dôležitá funkcia je zreteľná najmä u IL10^{-/-} knock-out myši, u ktorých dochádza ihneď po narodení k spontánnemu rozvoju zápalu hrubého čreva a následnému vývoju kolorektálneho karcinómu indukovaného kolitídou (Berg, 1996). U zvierat v skupine K2, došlo k signifikantnému poklesu IL-10 v krvnom sére, avšak suplementácia diéty ľanovým olejom a inulínom mala pozitívny účinok na jeho hladinu. Ľanový olej obsahujúci vyšší obsah ω -3 polynenasýtených mastných kyselín stimuluje protizápalové procesy na systémovej úrovni. Suplementácia diéty ω -3 polynenasýtenými mastnými kyselinami má inhibičný účinok na produkciu prozápalových cytokínov IL-1 β a IL-6 v kultúre humánnych polymorfonukleárných buniek (Vedín et al., 2008). Modulácia zápalu polynenasýtenými mastnými kyselinami súvisí nielen s ich koncentráciou ale i s pomerom medzi ω -3 a ω -6 PUFA, pretože tieto dve skupiny pôsobia v organizme antagonisticky. Membrána zápalových buniek obsahuje vysoký podiel ω -6 PUFA, teda kyseliny arachidónovej, ale má nízky podiel ω -3 PUFA, hlavne kyseliny eikozapentaénovej (Calder, 2003). Predpokladáme, že obohatenie potravy najmä vyšším podielom ω -3 PUFA stimuluje mechanizmy udržiavajúce homeostázu organizmu, čím PUFA môžu pôsobiť preventívne voči vzniku nádorov, alebo aj inhibovať už naštartovaný neoplastický proces. Zdá sa teda, že suplementácia diéty ω -3 PUFA má preventívny účinok nielen na rozvoj kardiovaskulárnych ochorení, ale ich protizápalový účinok je dôležitý aj v prevencii kolorektálneho karcinómu.

Účinok probiotík, prebiotík a ľanového oleja na zmeny koncentrácie cytokínov sme v oveľa väčšej miere zaznamenali na lokálnej úrovni, v sliznici tenkého čreva potkanov. V karcinogénnej skupine K2 sme v sliznici jejuna namerali skoro desaťnásobne vyššiu koncentráciu IL-6, zhruba dvojnásobne vyššiu koncentráciu IL-17 a hodnota IL-10 bola signifikantne znížená, čo svedčí o prebiehajúcom lokálnom zápale. Prekarcinogénne lézie v karcinogénnej skupine boli potvrdené aj histologicky. Aplikáciou *L. plantarum* a inulínu sme dosiahli zníženie prozápalových cytokínov a stimuláciu regulačného IL-10. Tieto

substancie sú schopné obnovovať narušenú homeostázu na sliznici. Inhibičný účinok *L. plantarum* CBL/J na rast myelómových buniek ovplyvnením koncentrácií cytokínov TNF- α a IL-1 β popisujú Haza et al. (2003). Podobne Matsumoto (2005) popisuje inhibičný účinok *Lactobacillus casei* Shirota na produkciu prozápalových cytokínov IL-6 a IFN- γ monocytmi izolovanými z *lamina propria* myši s chronickým črevným zápalom. Pri porovnaní skupín K2+Pro a K2+Pre sme v skupine suplementovanej inulínom zaznamenali pozitívnejšie výsledky než pri aplikácii *L. plantarum*. Predpokladáme, že inulín ako selektívne pôsobiace prebiotikum podporuje kolonizáciu tráviaceho traktu najmä bifidobaktériami, ktoré následne priaznivo ovplyvňujú imunitné procesy (Sekine et al., 1994; Miettinen et al., 1996; Zhu et al., 2011) a týmto mechanizmom pravdepodobne inhibujú proces neoplastickej transformácie v hrubom čreve.

Zvýšenie účinnosti jednotlivých bioaktívnych látok môžeme dosiahnuť ich vzájomnou kombináciou. Viaceré štúdie popisujú výraznejší antikarcinogénny a imunomodulačný účinok probiotík v kombinácii s prebiotikami alebo PUFA. Ogawa et al. (2005) uvádza, že *Lactobacillus casei* spp. v kombinácii so špecifickým substrátom dextránom signifikantne stimuluje aktivitu NK buniek u myši. Podobne kombinácia *Bifidobacterium lactis* a *Lactobacillus rhamnosus* s inulínom obohateným o oligofruktózu stimulovala aktivitu NK buniek a produkciu IL-10 u potkanov s karcinómom hrubého čreva, pričom došlo k zníženiu počtu nádorov v hrubom čreve (Roller et al., 2004). PUFA primárne podporujú adhéziu probiotických laktobacilov na stenu tráviaceho traktu (Bomba et al., 2003), čím podporujú tesný kontakt mikroorganizmov s bunkami slizničného lymfatického tkaniva.

Výživa nepochybne patrí medzi dôležité faktory ovplyvňujúce vznik kolorektálneho karcinómu. V dlhodobom procese vývoja karcinómu hrubého čreva sa výživa môže uplatniť ako faktor, ktorý sa podieľa na iniciačnej fáze karcinogenézy, v prípade, že obsahuje chemické mutagény. Oveľa častejšie faktory výživy ovplyvňujú fázu promócie a progresie, kedy sa malígny proces vyvíja a diseminuje. Na druhej strane, potrava obsahuje aj látky, ktoré majú protektívny účinok a inhibujú karcinogénny proces. K takýmto zložkám radíme vlákninu, prebiotické substráty, polynenasýtené mastné kyseliny, vitamíny, rastlinné extrakty a nepochybne i fyziologicky aktívne probiotické bakteriálne kultúry. Tieto bioaktívne látky sú schopné zmiernovať črevné zápaly, modulovať kompozíciu črevnej mikroflóry, podporovať imunitné funkcie, čím prispievajú k protinádorovej aktivite organizmu.

ZÁVER

V štúdiu sme poukázali na imunomodulačné a antikarcinogénne vlastnosti probiotika, prebiotika a ľanového oleja u potkanov s chemicky vyvolaným kolorektálnym karcinómom. Modulácia imunitných funkcií predstavuje jeden z možných mechanizmov, ktorým spomínané mikroorganizmy a bioaktívne látky bránia vzniku a rozvoju kolorektálneho karcinómu. Práca prispieva k doterajším poznatkom v oblasti výskumu probiotických mikroorganizmov a naturálnych látok a rozširuje možnosti účinnej prevencie nádorových chorôb výživou a výživovými doplnkami.

Podakovanie

Práca vznikla za podpory grantu VEGA č. 01/0372/10 grantovej agentúry MŠ SR.

LITERATÚRA

1. BALKWILL, F., MANTOVANI, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow?. In *Lancet*, vol. 357, 2001, p. 539–545.

2. BECKER, C., FANTINI, M.C., WIRTZ, S., NIKOLAEV, A., LEHR, H.A., GALLE, P.R., ROSE-JOHN, S., NEURATH, M.F. 2005. IL-6 Signaling Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. In *Cell Cycle*, vol. 4, 2005, no. 2, p. 217-220.
3. BERG, D.J., DAVIDSON, N., KÜHN, R., MÜLLER, W., MENON, S., HOLLAND, G., THOMPSON-SNIPES, L., LEACH, M.W. RENNICK, D. 1996. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4⁺ Th1-like responses. In *Journal of Clinical Investigation*, vol. 98, 1996, p. 1010-1020.
4. BOMBA, A., NEMCOVÁ, R., GANCARČÍKOVÁ, S., HERICH, R., PISTL, J., RÉVAJOVÁ, V., JONECOVÁ, Z., BUGARSKÝ, A., LEVKUT, M., KASTEĽ, R., BARAN, M., LAZAR, G., HLUCHÝ, M., MARSÁLKOVÁ, S., POSIVÁK, J. 2003. The influence of ω -3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 pufa) on lactobacilli adhesion to the intestinal mucosa and on immunity in gnotobiotic piglets. In *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, vol. 116, 2003, p. 312–316.
5. CALDER, P.C. 2003. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Inflammation: From Molecular Biology to the Clinic. In *Lipids*, vol. 38, 2003, p. 343–352.
6. CALDER, P.C. 2009. Polyunsaturated fatty acids in inflammatory processes: New twists in an old tale, In *Biochimie*, vol. 91, 2009, p. 791–795.
7. CHIANG, B.L., SHEIH, Y.H., WANG, L.H., LIAO, C.K., GILL, H.S. 2000. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. In *European journal of Clinical Nutrition*, vol. 54, 2000, p. 849-855.
8. CHUNG, Y.C., CHANG, Y.F. 2003. Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer. In *Journal of Surgical Oncology*, vol. 83, 2003, p. 222-226.
9. FAO/WHO. 2002. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. [Online]. 2002, [cit. 2011-10-06]. Dostupné na http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf
10. GALDEANO, C.M., DE MORENO DE LEBLANC, A., VINDEROLA, G., BIBAS BONET, M.E., PERDIGÓN, G. 2007. Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation Induced by Probiotic Bacteria. In *Clinical and Vaccine Immunology*, vol. 14, 2007, no. 5, p. 485-492.
11. GIBSON, G.R., ROBERFROID, M.B. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. In *The Journal of Nutrition*, vol. 125, 1995, p. 1401–1412.
12. HAZA, A.I., ZABALA, A., MORALES, P. 2004. Protective effect and cytokine production of a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from ewes' milk cheese. In *International Dairy Journal*, vol. 14, 2004, p. 29-38.
13. HUSSAIN, S.P., HARRIS, C.C. 2007. Inflammation and cancer: An ancient link with novel potentials. In *International Journal of Cancer*, vol. 121, 2007, p. 2373-2380.
14. KAMINSKA, J., KOWALSKA, M.M., NOWACKI, M.P., CHWALINSKI, M.G., RYSINSKA, A., FUKSIEWICZ, M. 2000. CRP, TNF-alpha, IL-1ra, IL-6, IL-8 and IL-10 in blood serum of colorectal cancer patients. In *Pathology Oncology Research*, vol. 6, 2000, p. 38-41.
15. KAŠTEĽ, R., BOMBA, A., VAŠKO, L., TREBUŇOVÁ, A., MACH, P. 2007. Effect on the immune system of germ-free piglets of probiotics potentiated with polyunsaturated fatty acids, In *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, vol. 120, 2007, p. 221–225.
16. KOLLS, J.K., LINDÉN, A. 2004. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. In *Immunity*, vol. 21, 2004, p. 467-476.

17. LARSSON, S.C., KUMLIN, M., INGELMAN-SUNDBERG, M., WOLK, A. 2004. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. In *The American journal of Clinical Nutrition*, vol. 79, 2004, p. 935-945.
18. LIN, W., KARIN, M. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. In *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 117, 2007, p. 1175-1183.
19. LU, H., OUYANG, W., HUANG, C. 2006. Inflammation, a Key Event in Cancer Development. In *Molecular Cancer Research*, vol. 4, 2006, no. 4, p. 221-233.
20. MANGAN, P.R., HARRINGTON, L.E., O'QUINN, D.B., HELMS, W.S., BULLARD, D.C., ELSON, C.O., HATTON, R.D., WAHL, S.M., SCHOEB, T.R., WEAVER, C.T. 2006. Transforming growth factor- β induces development of the Th17 lineage. In *Nature*, vol. 441, 2006, p. 231-234.
21. MATSUMOTO, S., HARA, T., HORI, T., MITSUYAMA, K., NAGAOKA, M., TOMIYASU, N., SUZUKI, A., SATA, M. 2005. Probiotic Lactobacillus-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. In *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 140, 2005, p. 417-426.
22. MEDICI, M., VINDEROLA, C.G., WEIL, R., PERDIGÓN, G. 2005. Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive Escherichia coli infection in mice. In *Journal of Dairy Research*. vol. 2005, 72, p. 243-249.
23. MIETTINEN, M., VUOPIO-VARKILA, J., VARKILA, K. 1996. Production of Human Tumor Necrosis Factor Alpha, Interleukin-6, and Interleukin-10 Is Induced by Lactic Acid Bacteria. In *Infection and Immunity*, vol. 64, 1996, no. 12, p. 5403-5405.
24. MIKIROVA, N.A., KLYKOV, A.A., JACKSON, J.A., RIORDAN, N.H. 2008. Granulocyte activity in patients with cancer and healthy subjects. In *Cancer Biology & Therapy*, vol. 7, 2008, no. 9, p. 1362-1367.
25. MOCELLIN, S., MARINCOLA, F.M., YOUNG, H.A. 2005. Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint. In *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 78, 2005, p. 1043-1051.
26. NIKAWA, T., ODAHARA, K., KOIZUMI, H., KIDO, Y., TESHIMA, S., ROKUTAN, K., KISHI, K. 1999. Vitamin A Prevents the Decline in Immunoglobulin A and Th2 Cytokine Levels in Small Intestinal Mucosa of Protein-Malnourished Mice. In *The Journal of Nutrition*, vol. 129, 1999, p. 934-941.
27. O'BYRNE, K.J., DALGLEISH, A.G. 2001. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. In *British Journal of Cancer*, vol. 85, 2001, no. 4, p. 473-483.
28. OGAWA, T., ASAI, Y., TAMAI, R., MAKIMURA, Y., SAKAMOTO, H., HASHIKAWA, S., YASUDA, K. 2005. Natural killer cell activities of symbiotic Lactobacillus casei spp. Casei in conjunction with dextran. In *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 143, 2005, p. 103-109.
29. PERDIGÓN, G., MALDONADO GALDEANO, C., VALDEZ, J.C., MEDICI, M. 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. In *European journal of Clinical Nutrition*, vol. 56, 2002, Suppl. 4, p. 521-526.
30. PHILPOTT, M., FERGUSON, L.R. 2004. Immunonutrition and cancer. In *Mutation Research*, vol 551, 2004, p. 29-42.
31. ROLLER, M., FEMIA, A.P., CADERNI, G., RECHKEMMER, G., WATZL, B. 2004. Intestinal immunity of rats with colon cancer is modulated by oligofructose-enriched inulin combined with Lactobacillus rhamnosus and Bifidobacterium lactis. In *British Journal of Nutrition*, vol. 92, 2004, p. 931-938.

32. SALAZAR-ONFRAY, F., LÓPEZ, M.N., MENDOZA-NARANJO, A. 2007. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. In *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 17, 2007, p. 171-182.
33. SCANLAN, P.D., SHANAHAN, F., CLUNE, Y., COLLINS, J.K., O'SULLIVAN, G.C., O'RIORDAN, M., HOLMES, E., WANG, Y., MARCHESI, J.R. 2008. Culture-independent analysis of the gut microbiota in colorectal cancer and polyposis. In *Environmental Microbiology*, vol. 10, 2008, p. 789-798.
34. SEIFERT, S., WATZL, B. 2007. Inulin and oligofructose: Review of experimental data on immune modulation. In *The Journal of Nutrition*, vol. 137, 2007, p. 2563–2567.
35. SEKINE, K., KAWASHIMA, T., HASHIMOTO, Y. 1994. Comparison of the TNF α levels induced by human-derived *Bifidobacterium longum* and rat-derived *Bifidobacterium animalis* in mouse peritoneal cells. In *Bifidobacteria Microflora*, vol. 13, 1994, p. 79-89.
36. SMYTH, M.J., CRETNEY, E., KERSHAW, M.H., HAYAKAWA, Y. 2004. Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. In *Immunological Reviews*, vol. 202, 2004, p. 275–293.
37. TAKEDA, K., OKOMURA, K. 2007. Effects of a Fermented Milk Drink Containing *Lactobacillus casei* Strain Shirota on the Human NK-Cell Activity. In *The Journal of Nutrition*, vol. 137, 2007, p. 791–793.
38. TERZIĆ, J., GRIVENNIKOV, S., KARIN, E., KARIN, M. 2010. Inflammation and Colon Cancer. In *Gastroenterology*, vol. 138, 2010, p. 2101-2114.
39. VEDIN, I., CEDERHOLM, T., FREUND, L.Y., BASUN, H., GARLIND, A., FAXÉN, I.G., JONHAGEN, M.E., VESSBY, B., WAHLUND, L.O., PALMBLAD, J. 2008. Effects of docosahexaenoic acid – reach n-3 fatty acids supplementation on cytokine release from blood mononuclear leukocytes: the OmegAD study. In *American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 87, 2008, no. 6, p. 1616-1622.
40. ZHU, J., ZHAO, L., GUO, H., JIANG, L., REN, F. 2011. Immunomodulatory effects of novel bifidobacterium and lactobacillus strains on murine macrophage cells. In *African Journal of Microbiology Research*, vol. 5, 2011, no. 1, p. 8-15.

Kontaktná adresa: RNDr. Jana Žofčáková, Ústav experimentálnej medicíny, Lekárska fakulta, UPJŠ v Košiciach, Trieda SNP 1, 040 11 Košice
email: jankazofcak@gmail.com