

LIPID PROFILE OF RATS AFTER DIET ENRICHED WITH FRUCTOSE AND POTENTIAL PROBIOTIC STRAINS OF THE GENUS *LACTOBACILLUS*.

Pavlina Teneva¹, Katya Kichukova¹, Ivelina Dobрева¹, Tanya Tacheva², Mariya Yakovlieva³, Stanisava Mihaylova³, Rositsa Tropcheva⁴, Ana Tolekova³, Svetla Danova⁴, Tatyana Vlaykova²

¹*Medical Collage, Trakia University, Stara Zagora, Bulgaria*

²*Dept. of Chemistry and Biochemistry, ³Dept. Physiology, Pathological Physiology and Pharmacology, Medical Faculty, Trakia Univesity, Stara Zagora, Bulgaria*

⁴*The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, Sofia, Bulgaria*

ЛИПИДЕН ПРОФИЛ НА ПЛЪХОВЕ ПРИ ДИЕТА ОБОГАТЕНА С ФРУКТОЗА И ПОТЕНЦИАЛНИ ПРОБИОТИЧНИ ЩАМОВЕ ОТ РОД *LACTOBACILLUS*.

Павлина Тенева¹, Катя Кичукова¹, Ивелина Добрева¹, Таня Тачева², Мария Яковлиева³, Станислава Михайлова³, Росица Тропчева⁴, Ана Толева³, Светла Данова⁴, Татяна Влайкова².

¹*Медицински колеж, Тракийски университет, Стара Загора*

²*Кат. Химия и биохимия, ³Кат. Физиология, патофизиология и фармакология, Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора*

⁴*Департамент по обща микробиология, Институт по микробиология «Стефан Ангелов», БАН, София*

SUMMARY

It has been well documented that gastrointestinal microflora is capable of prominent effect on the absorption, metabolism and storage of nutrients. An important approach for modulating the contents and activity of gut microflora is the admission of probiotics. There are several studies describing the positive influence of probiotic strains belonging to different genus and species to the serum glucose level and lipid profile in experimental animals and diseases models and in human. In this respect the aim of the current study was to explore the effect of two new potential probiotic strains of the genus *Lactobacillus* (*Lactobacillus brevis* 15 and *Lactobacillus plantarum* 13) on the lipid profile in rats on short-time fructose-rich diet. We performed an experiment for 8 weeks with 28 two months old Wistar rats which were assigned randomly to receive standard diet (Control group), fructose-rich diet (Fructose group), standard diet with probiotics 2 times per week (Probiotic group) and fructose-rich diet with probiotics 2 times per week (Probiotics+fructose group).

Results: The new potential probiotic strains at the applied doses were very well tolerated by the experimental animas independently on the diet regiment. At the end of the experimental period (at the 9th week) we found that animals on fructose + probiotics diet had the highest levels of TAG compared to all other three groups ($p < 0.05$), followed by those on fructose diet. The animals of control and probiotics groups had commensurable levels of TAG. At the 9th week the total cholesterol and HDL-cholesterol of all experimental groups were significantly higher than those of the controls, although none of the values had exceeded the referent levels.

Conclusions: Based on the results of our current study we may suggest that strains *Lactobacillus brevis* 15 and *Lactobacillus plantarum* 13 after 8-weeks administration at the particular doses two-times per week are very well tolerated and had some effect on the lipid metabolism. However the results of the current experimental conditions do not provide convincing evidence for beneficial effect of those strains on the lipid profile, possibly due to the relatively short period of the experiment and the rare admission of the probiotics.

Въведение

Чревната микрофлора влияе на цялостния метаболизъм и здравословния баланс в тялото, и има подчертана роля за съхранението на мазнините в организма (Backhed, Ding et al. 2004; Cani, Neyrinck et al. 2007). Важен подход прилаган за модулиране на чревната микрофлора е приемането на пробиотици (*pro-* за *bio-*живота). Млечнокиселите бактерии (МКБ) от родовете *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*; бифидобактериите (род *Bifidobacterium*), някои дрожди и непатогенни щамове *E. coli* са сред доказаните пробиотични микроорганизми (Kootte, Vrieze et al. 2012). Описани са за първи път от Orla – Jensen през 1924 г. и много от тях днес притежават GRAS статус - *Generally Recognised As Safe* (Adams and Marteau 1995; Carr, Chill et al. 2002). Представителите на род *Lactobacillus* са Грам (+), неспорообразуващи, неподвижни, анаеробни микроорганизми, които по морфология са пръчковидни. Родът *Lactobacillus* е много хетерогенен, поради голямата филогенетична възраст и вече наброява повече от 190 вида с подвидовете (Adams and Marteau 1995; Carr, Chill et al. 2002). Представителите на лактобацилите притежават уникална биологична активност и полезни свойства и се откриват в различни екологични ниши. Те са основен защитен компонент и регулатор за чревната и урогениталната микрофлора и оттам гарант за здравето и за нормалните физиологични процеси. Проявяват голямо разнообразие в метаболитната си активност. Могат да продуцират предшественици на биологично-активни вещества (с медицинско значение), протеини и макромолекули, някои от които участват в междуклетъчната сигнализация (Makarova, Slesarev et al. 2006), наред с полезните за организма млечна и други късоверижни киселини и уникалните по спектър на активност бактериоцини и био-пептиди. Лактобацилите продуцират повече крайни продукти в сравнение с млечно киселите стрептококи (група N) и са способни трайно да колонизират мукозните повърхности, оказвайки полезен ефект. Това качества са щамово-специфични и доказването им е възможно вследствие на комплексни *in vitro* и *in vivo* изследвания.

През последните години са направени редица изследвания с различни МКБ и са натрупани доказателства за положителния ефект на пробиотиците върху метаболитните нарушения. Проучват се и нови аспекти на полезно действие на МКБ-пробиотици.

Метаболитният синдром се характеризира с група метаболитни нарушения, включително инсулинова резистентност, повишена глюкоза на гладно, повишени плазмени триглицериди, артериална хипертония, затлъстяване и намаляване на липопротеините с висока плътност (Mallappa, Rokana et al. 2012). Терапиите съдържащи пробиотици са с доказан потенциал за намаляване нивата на холестерол и триглицериди в серума. Хистологични проучвания сочат, че хамстери приемали *Lactobacillus fermentum* 11976 намаляват атеросклеротичните увреждания в сравнение с контролните животни (Bhathena, Martoni et al. 2009).

В изследване целящо да бъдат проучени метаболитните ефекти от приема на пробиотични добавки съдържащи *Lactobacillus plantarum* DSM 15313 при мишки хранени с богата на мазнини храна (модел на затлъстяване и диабет) е установено, че пробиотиците оказват анти-диабетен ефект, като намаляват нивото на глюкоза в кръвта без да променят нивото на липидите и инсулин (Andersson, Branning et al. 2010). В проучване ефекта на *Lactobacillus plantarum* MA2 върху липидния метаболизъм и чревната микрофлора при плъхове, хранени на диета с високо съдържание на мазнини резултатите показват, понижаване на серумните нива на общия холестерол, LDL-холестерола и триглицеридите, но не се наблюдава промяна в нивата на HDL-холестерол. Значително се увеличава и броя на млечнокиселите бактерии в червата (Wang, Xu et al. 2009).

Установено е също, че пробиотични щамове от видовете *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus reuteri* в комбинация с фитостероли са естествен хипохолестеролемичен агент (Awaisheh, Khalifeh et al. 2013). Многобройните

механизми за хипохолестеролемичния ефект на пробиотиците са били хипотеза на минали *in vitro* проучвания, като един от основните изследвани механизми е деконюгирането на жлъчните киселини от ензими на бактериалните пробиотични щамове (Pavlovic, Stankov et al. 2012).

Имайки предвид положителните ефекти проявявани от различните щамове МКБ, ние си поставихме за цел да проучим влиянието на комбинацията от два оригинални български щама - *Lactobacillus brevis* 15 и *Lactobacillus plantarum* 13, върху показатели на липидния профил в кръв при плъхове при краткосрочна богата на фруктоза диета. Те са характеризирани *in vitro* като кандидат – пробиотици (Danova et al. 2009) и потенциалните им здравословни ефекти могат да бъдат допълнени с настоящото изследване.

Материали и методи

Микроорганизми, хранителни среди и условия за култивиране

Включени са два идентифицирани до вид щама - *Lactobacillus brevis* 15 и *Lactobacillus plantarum* 13. Те са изолирани от традиционни млечни продукти и притежават широк спектър на антимикробна активност (Tropcheva R. and Danova S., 2011) и висока транзитна толерантност в условията на ГИТ. За целите на експериментите са получени експоненциални култури и са лиофилизирани в стерилно обезмаслено мляко (10% w/v) в условия, гарантиращи лиофилизати с висока виталност за прием в нужната за пробиотици доза.

Експериментални животни

Проведен бе 8-седмичен експеримент с 28 двумесечни пъха от породата Wistar. След едноседмичен период на адаптация животните на случаен принцип бяха разделени в 4 групи: Con (I group) – контролна група животни гледани на стандартна диета; Pro (II group) – животни гледани на стандартна диета и приемащи пробиотици в дози 2 пъти в седмицата; Fr (III group) – животни хранени с богата на фруктоза храна (21% разтвор на фруктоза с водата за пиене); Fr+Pro (IV group) - животни хранени с богата на фруктоза храна и приемащи пробиотици в дози 2 пъти в седмицата. Дневната доза за прием на пробиотиците включваше 2 ml суспензия с $\sim 3.5 \cdot 10^9 \pm 1.2 \cdot 10^9$ CFU/ml от щам 15 и $\sim 1.6 \cdot 10^8 \pm 0.5 \cdot 10^8$ CFU/ml от щам 13.

Системно в началото на експеримента и на третата, шестата и деветата седмица бе вземана венозна кръв от опасната вена на плъховете и бе отделяна плазма. В края на експерименталния период (9-та седмица) животните бяха евтаназирани посредством анестезия с 5% натриев тиопентал и бе взета кръв чрез пункция на сърцето.

Работата с експерименталните животни бе проведена в съответствие с клаузите на Европейската директива за защита на животните, използвани за научни и експериментални цели от 22.09.2010 (210/63/EU), националните регулаторни документи и правилата на Комисията за хуманно отношение към лабораторни и опитни животни на Медицински факултет, Тракийски университет, Стара Загора.

Анализ на показатели на липидния профил

Изследваните показатели в плазмата на експерименталните животни бяха триацилглицероли (TAG), общ хоестерол (T-chol) и HDL-холестерол (HDL-chol). Измерванията бяха проведени в Лабораторията по Клинична лаборатория на Медицински колеж, Тракийски университет, Стара Загора с автоматичен анализатор DAYTONA и пълен набор от реактиви на фирма RANDOX, (Randox Laboratories Ltd, UK). Определянето на общия холестерол бе проведено с Cholesterol Oxidaze CDC ензимен крайноточков тест, на HDL-холестерол с Direkt HDL cholesterol ензимен колориметричен тест и на триглицеридите с Lipase/GPO-PAP/ no correction тест (Randox Laboratories Ltd, UK).

Статистически анализи

Статистическите анализи са проведени с подходящи тестове включени в пакети софтуерни продукти за Windows като StatView v.4.53. (Abacus Concepts, Inc.) и SPSS 16.0 (SPSS, Inc., 1989-2007). Средните стойности на количествените показатели в четирите независими групи бяха сравнявани с ANOVA тест, а статистическата достоверност на

разликите между групите беше определена чрез LSD test. Нивата в изследваните плазмени показатели в различните периоди на проследяване бяха сравнявани със Student pair *t*-тест за зависими групи. Разлики с нива на достоверност < 0.05 ($p < 0.05$) бяха считани за статистически достоверни.

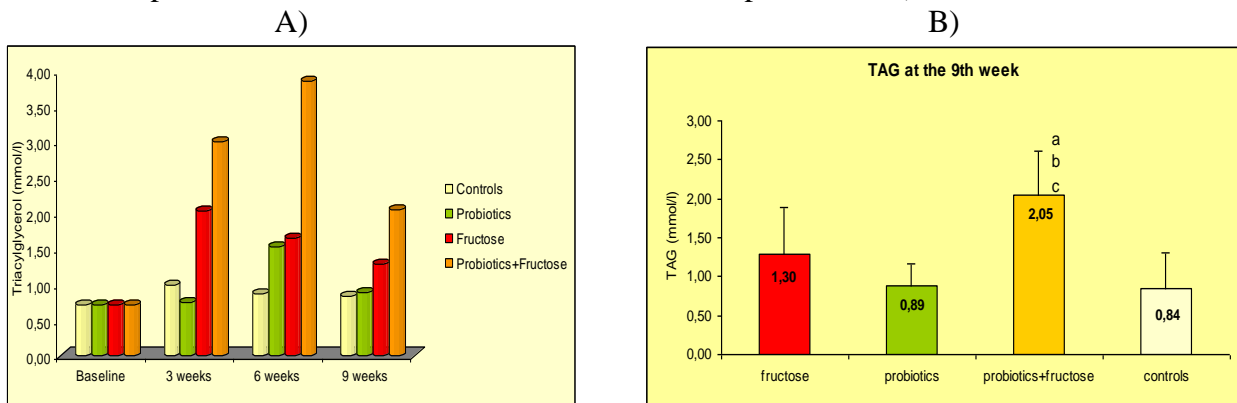
Резултати и обсъждане

При проследяване на състоянието на животните от експериментаните групи бе установено много добра поносимост както на подсладената с фруктоза вода (при групи Fr и Fr+Pro), така и на дозите пробиотици (при групите Pro и Fr+Pro). При нито едно от животните не се наблюдаваха промени във вида и консистенцията на фекалиите, което говори за нормално функциониране на храносмилателния тракт.

Нивата на триглицеридите в контролната група животни на стандартна диета не показва промени (Фигура 1a). Втората група приемала пробиотик (Pro) до третата седмица запази стойности на изследвания показател, близки до изходното ниво. Значително увеличение в концентрацията на триглицеридите - до 3,86 mmol/l в Fr+Pro (IV group) се установи на 6-та седмица. В трета група – животни приемали богата на фруктоза храна съществено увеличение на триглицеридите се наблюдава на 3-та седмица – два пъти и половина над стартовите стойности, и лек спад през 9-та седмица, като не достигат нивата в контролната група (Фигура 1a).

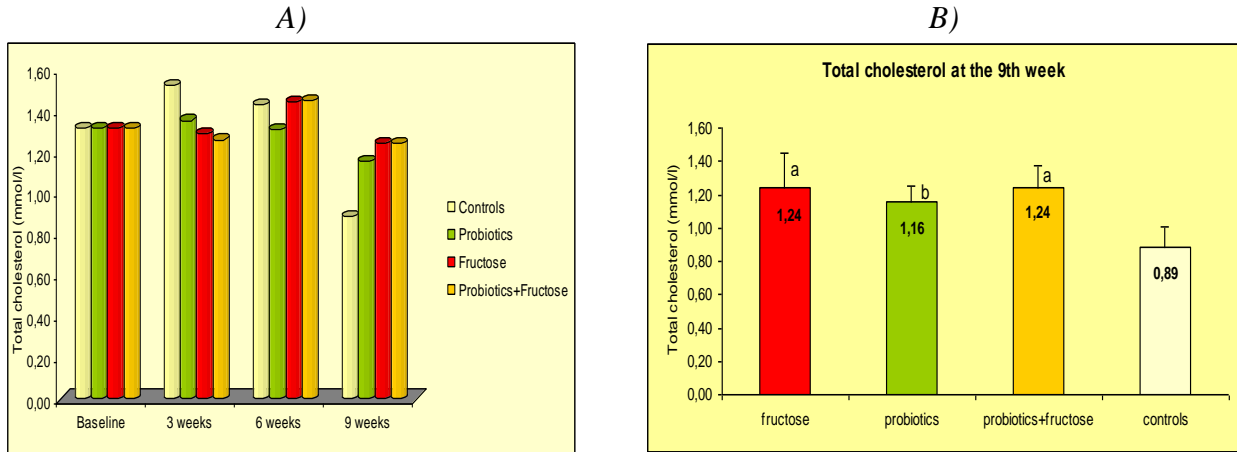
На 9-та седмица групата на животните приемали едновременно фруктоза и пробиотици (Fr+Pro) имаха статистически значими по-високи нива на ТАГ в сравнение с всички останали групи ($p=0.0001$ спрямо Con; $p=0.001$ спрямо Pro; $p=0.010$ спрямо Fr, ANOVA test with LSD post hoc test) (Фигура 1b).

Фигура 1: Серумни нива на триглицериди (TAG, mmol/l) през периодите на провеждане на експеримента (A) и в края на експеримента, на 9-та седмица (B). Стойностите са показани като средно аритметични±SD (a- $p=0.0001$ vs. Controls, b- $p=0.001$ vs. Probiotics, c- $p=0.010$ vs. Fructose, ANOVA test with LSD post hoc test)



Наблюдаваните флуктоации през периодите на проследяване в нивата на триглицеридите в отделните опитни групи приемали пробиотици (самостоятелно) и в комбинация с фруктоза, не могат да бъдат дискутирани еднозначно. Администрирането на фруктозата има доказан стимулиращ апетита ефект (orexigenic effect) и води до увеличение на циркулиращите триглицериди. Все още не е изяснена ролята на пробиотици при опосредстване на връзката липиден-въглехидратен метаболизъм за гостоприемника. В тази връзка е необходимо допълнителни изследвания и оптимизиране на схемата на експеримента.

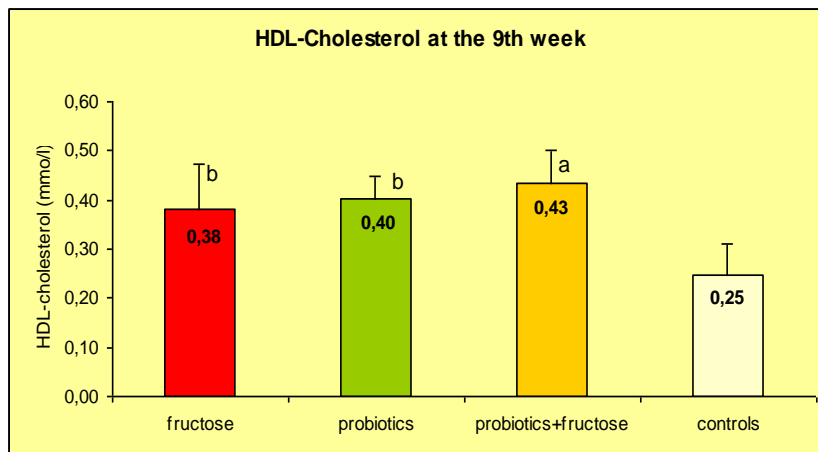
Фигура 2: Промени в нивата на общия холестерол (Total cholesterol, mmol/l) през периодите на провеждане на експеримента (A) и в края на експеримента, на 9-та седмица (B). Стойностите са показана като средно аритметични \pm SD (a-p=0.0001 vs. Con; b-p=0.009 vs. Con, ANOVA test with LSD post hoc test).



Нивата на общия холестерол в четирите групи експериментални животни не показва съществена динамика през 3-та и 6-та седмица (Фигура 2a). На 9-та седмица всички експериментални групи имаха статистически значимо по-високи стойности на холестерола в сравнение с тези на контролната група (p=0.0001 за Fr и за Fr+Pro спрямо Con; p=0.009 за Pro спрямо Con, ANOVA test with LSD post hoc test) (Фигура 2b)

Аналогични резултати за 9-та седмица бяха получени за нивата на HDL-холестерола (Фигура 3) - трите групи експериментални животни, Pro (II group), Fr (III group) и Fr+Pro (IV group), имаха статистически значимо по-високи стойности на този показател спрямо тези на контролната група (p=0.001 за Fr и за Pro спрямо Con; p<0.0001 за Fr+Pro спрямо Con, ANOVA test with LSD post hoc test).

Фигура 3. Серумни нива на HDL-холестерол през 9-та седмица (mmol/l). Стойностите са показана като средно аритметични \pm SD (a-p<0.0001 vs. Con; b-p=0.001 vs. Con, ANOVA test with LSD post hoc test).



Резултатите от нашите изследвания недвусмислено говорят, че комбинацията от двата щама потенциални пробиотици *Lactobacillus brevis* 15 и *Lactobacillus plantarum* 13 в прилаганите дози два пъти седмично се понасят изключително добре от експерименталните животни и имат определен ефект върху плазмените показатели на липидния метаболизъм. Но тези резултати не дават убедителни доказателства за ползата от техния прием върху липидния профил както при животни на нормална диета, така при тези с диета обогатена с фруктоза. Смятаме, че основна причина за това е краткосрочното натоварване с

въглехидрати - само 8 седмици, и сравнително редкия прием на пробиотиците – два пъти в седмицата. Ето защо е необходимо да разширим изследванията като променим експерименталната постановка като увеличим периода на въздействие и честотата на прием на пробиотичните щамове.

Благодарности

Настоящото изследване бе проведено с финансовата подкрепа на МФ, Тракийски университет за НИП 14/2012.

Библиография

1. Adams, M. R. and P. Marteau (1995). "On the safety of lactic acid bacteria from food." *Int J Food Microbiol* **27**(2-3): 263-4.
2. Andersson, U., C. Branning, et al. (2010). "Probiotics lower plasma glucose in the high-fat fed C57BL/6J mouse." *Benef Microbes* **1**(2): 189-96.
3. Awaisheh, S. S., M. S. Khalifeh, et al. (2013). "Effect of supplementation of probiotics and phytosterols alone or in combination on serum and hepatic lipid profiles and thyroid hormones of hypercholesterolemic rats." *J Dairy Sci* **96**(1): 9-15.
4. Backhed, F., H. Ding, et al. (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(44): 15718-23.
5. Bhatena, J., C. Martoni, et al. (2009). "Orally delivered microencapsulated live probiotic formulation lowers serum lipids in hypercholesterolemic hamsters." *J Med Food* **12**(2): 310-9.
6. Cani, P. D., A. M. Neyrinck, et al. (2007). "Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia." *Diabetologia* **50**(11): 2374-83.
7. Carr, F. J., D. Chill, et al. (2002). "The lactic acid bacteria: a literature survey." *Crit Rev Microbiol* **28**(4): 281-370.
8. Danova S., Georgieva R., Koleva P., Tropcheva R., Manasiev J., Nikolova D. (2009). "Biodiversity and activity of Lactic acid bacteria from traditional Bulgarian milk products," *Proceeding of International Scientific conference: Food Science, Engineering And Technologies*, 23-24 October 2009, Plovdiv, vol. LVI, Issue 1, 275-280
9. Kootte, R. S., A. Vrieze, et al. (2012). "The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus." *Diabetes Obes Metab* **14**(2): 112-20.
10. Makarova, K., A. Slesarev, et al. (2006). "Comparative genomics of the lactic acid bacteria." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(42): 15611-6.
11. Mallappa, R. H., N. Rokana, et al. (2012). "Management of metabolic syndrome through probiotic and prebiotic interventions." *Indian J Endocrinol Metab* **16**(1): 20-7.
12. Pavlovic, N., K. Stankov, et al. (2012). "Probiotics--interactions with bile acids and impact on cholesterol metabolism." *Appl Biochem Biotechnol* **168**(7): 1880-95.
13. Tropcheva R. and Danova S. (2011) "Screening for antibacterial activity of new isolated lactobacilli from yogurt and cheeses." *Science & Technologies*, Volume I; Number 1; Medicine, Publisher: Union of Scientists - Stara Zagora", ISSN: 1314-4111, 171-175.
14. Wang, Y., N. Xu, et al. (2009). "Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet." *Appl Microbiol Biotechnol* **84**(2): 341-7.