

Presnovni sindrom in probiotiki

The metabolic syndrome and probiotics

Mario Gorenjak^{*1, 2}, Pavel Skok^{1, 3}

¹Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska 8, 2000 Maribor

²Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Univerza v Mariboru, Pivola 10, 2311 Hoče

³Univerzitetni klinični center Maribor, Ljubljanska 5, 2000 Maribor

Gastroenterolog 2016; 1: 39–47

Ključne besede: presnovni sindrom, debelost, dislipidemija, probiotiki, funkcionalni celični modeli

Key words: metabolic syndrome, obesity, dyslipidemia, probiotics, functional cell models

IZVLEČEK

Presnovni sindrom je poznan že od poznih 80-ih let in je sestav klinično izraženih znakov, kot so centralna debelost, visok krvni tlak, povišana raven plazemske glukoze na tešče ali diagnosticirana sladkorna bolezen, nizek HDL in povišani serumski trigliceridi. Vsi ti klinično izraženi znaki so skupaj ali posamezno močno povezani z nastankom srčno-žilnih bolezni, ki so vodilni vzrok smrti v sodobnem svetu. Pretekle raziskave so pokazale, da lahko probiotične bakterije ugodno vplivajo na bolezen, kot so sestavine presnovnega sindroma. V laboratorijski *in vitro* študiji smo dokazali, da bakterijski sev *Lactobacillus plantarum* PCS 26 izraža učinke, ki bi v gostitelju s presnovnim sindromom lahko pripomogli k lažšanju posameznih sestavin sindroma. Rezultati študije prav tako predstavljajo temelj za izvedbo klinične študije s probiotičnim bakterijskim sevom PCS 26, kot dodatkom k že ustaljeni farmakološki terapiji, pri bolnikih s presnovnim sindromom.

ABSTRACT

The metabolic syndrome has been documented since the late 1980s and is composed of clinical expressed symptoms as central obesity, high blood pressure, raised fasting plasma glucose or diagnosed diabetes, low HDL, and raised serum triglycerides. All those clinically expressed symptoms are together or independently strongly correlated with cardiovascular diseases, which are the leading cause of death in the modern world. Previous research has shown that probiotic bacteria exert positive effects on diseases, which are components of the metabolic syndrome. In the laboratory *in vitro* study, we have demonstrated that bacterial strain *Lactobacillus plantarum* PCS 26 exerts effects, which could alleviate particular components of the syndrome in the host with metabolic syndrome. The results from the present study also represent a fundamental point for realization of the clinical trial with probiotic bacterial strain PCS 26 as a supplement to established pharmacological interventions in patients with the metabolic syndrome.

*Dr. Mario Gorenjak, mag. bioinf.

Medicinska fakulteta, Univerza v Mariboru, Taborska 8, 2000 Maribor,

Fakulteta za kmetijstvo in biosistemske vede, Pivola 10, 2311 Hoče,

e-pošta: mario.gorenjak@um.si

UVOD

Presnovni sindrom, znan tudi kot »sindrom X« ali »sindrom inzulinske rezistence«, je poznan že od poznih 80-ih let (1). Po opredelitvi IDF (angl. *International Diabetes Federation*) iz leta 2006 je za opredelitev presnovnega sindroma potrebna prisotnost centralne debelosti, značilne za posamezne etnične skupine, in najmanj dve drugi sestavini: plazemska glukoza na tešče $\geq 5,6$ mmol/L, zvišani serumski trigliceridi $\geq 1,7$ mol/L, znižan serumski lipoprotein visoke gostote (HDL) ≤ 1 mmol/L za moške ter $\leq 1,3$ mmol/L za ženske in krvni tlak $\geq 130/85$ mmHg (2, 3). Kot vzrok za nastanek presnovnega sindroma so navedene tri kategorije: debelost in okvare maščobnega tkiva, inzulinska rezistenca, ter sestav neodvisnih dejavnikov kot so molekule jetrnega, žilnega in imunološkega izvora (4). K vsaki kategoriji pa prispevajo tudi genetski in pridobljeni dejavniki (4). Tako kot presnovni sindrom so tudi posamezne sestavine sindroma močno povezane z nastankom srčno-žilnih bolezni, ki so vodilni vzrok smrti v sodobnem svetu (5–7).

Poznano je, da je visceralna maščoba presnovno aktiven organ, ki je močno povezan z občutljivostjo na inzulin (8). V stanju centralne debelosti je visceralno maščobno tkivo sestavljeno iz velikih na inzulin odpornih adipocitov s prisotnim infiltratom vnetnih celic in deluje kot vir potencialno patogenih molekul, ki sodelujejo pri nizkostonjenjskem vnetju (4, 6, 9–14). Infiltrirane vnetne celice prav tako uravnavajo obnašanje adipocitov v smislu izločanja hormonov in citokinov z provnetnimi ter aterogenimi učinki (8, 15–17). Dokazano je bilo tudi, da igra disbioza črevesne mikroflore aktivno vlogo pri razvoju debelosti (18). Najočitnejše razlike črevesne mikroflore so bile zmanjšanje števila *Bifidobacterium spp.* pri debelih osebah ter povečanje števila gram negativnih bakterij pri osebah s sladkorno boleznijo tipa 2 (19–22).

Lipopolisaharid (LPS), ki je sestavni del celične stene gram negativnih bakterij in vzročni dejavnik za nastanek vnetja ter presnovnih bolezni, je ob prekomernem vnosu maščob s prehrano v veliki meri

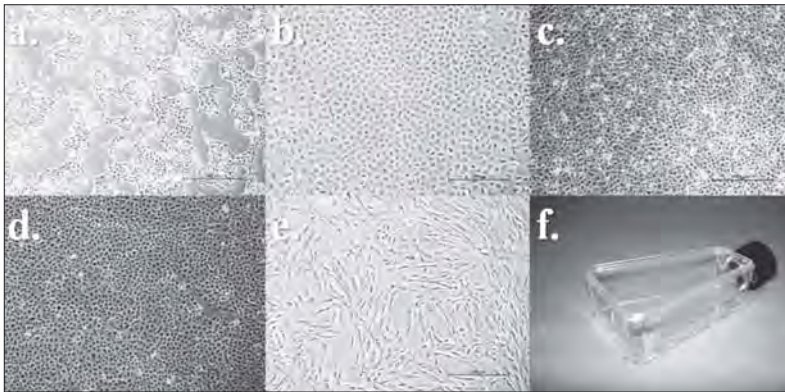
absorbiran v prebavni cevi (19). Mehanizmi, ki dovoljujejo absorpcijo LPS-a v prebavni cevi, niso natančno poznani, vendar so lahko povezani s povišano filtracijo plazemskega LPS-a v limfni sistem skupaj z absorpcijo maščob (23).

Študije na miših so tudi dokazale, da prekomerni vnos maščob s prehrano vodi k povišanim vrednostim LPS-a v plazmi, povzroča presnovno endotoksemijo in zmanjšuje število *Bifidobacterium spp.* (19, 20, 24). Ker je znano, da probiotične bakterije lahko izražajo koristne učinke v gostitelju, je bil naš namen z laboratorijsko *in vitro* študijo preveriti in ovrednotiti ali probiotične bakterije lahko izražajo pozitivne učinke, ki bi v gostitelju s presnovnim sindromom lahko pripomogle k lažšanju sindroma in preprečevanju zapletov. V ta namen smo uporabili humane celične linije tankega črevesja, visceralnih preadipocitov in monocitov/makrofagov. V poskusih smo uporabili bakterijske seve *Lactobacillus plantarum* PCS 20, PCS 26 in referenčne seve *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103), *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) ter *Escherichia coli* Nissle 1917.

METODOLOGIJA

Gojenje in vzdrževanje celičnih linij

V *in vitro* laboratorijski študiji smo uporabili celične linije nekarcinogenega izvora (Slika 1): humane fetalne epitelijske celice tankega črevesja (HUIEC), humane fetalne epitelijske celice tankega črevesja (H4–1), humane monocite/makrofage (TLT), humane visceralne preadipocite (VPA) in humane epitelijske celice tankega črevesja (HIEC) (25, 26). Celične linije so bile gojene v 25 cm² gojitvenih posodah (Corning Inc., Corning, New York) v celičnem mediju DMEM advanced (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija) z dodanimi 100 IU/mL penicilina (Sigma, Steinheim, Nemčija), 0,1 mg/mL streptomicina (Fluka, Buchs, Švica), 2 mmol/L L-glutamina (Life Technologies, Carlsbad, Kalifornija) in 5 % fetalnega govejega seruma (FBS) (Life Technologies). Gojenje celic je potekalo v vlažni atmosferi s 5 % CO₂ pri 37 °C.



Slika 1. Uporabljene celične linije. a. H4-1; b. HUIEC; c. HIEC; d. TLT; e. VPA; f. Gojitvena posodica 25 cm². Merilo: 500 µm.
 Figure 1. Used cell lines. a. H4-1; b. HUIEC; c. HIEC; d. TLT; e. VPA; f. Growth flask 25 cm². Measure: 500 µm.

Bakterijski sevi in pogoji rasti

Bakterijski sevi *Lactobacillus plantarum* PCS 20, PCS 26, *Lactobacillus rhamnosus* LGG (ATCC 53103) in *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) so bili propagirani in gojeni v De Man Rogosa, Sharpe (MRS) bujonu (Merck, Darmstadt, Nemčija). *Escherichia coli* Nissle 1917 je bila propagirana in gojena v hranljivem bujonu (Merck). Inkubacija sevov je potekala 24 h pri 37 °C pod anaerobnimi pogoji z uporabo Anaerogena (Oxoid, Hampshire, Združeno Kraljestvo).

Laboratorijski *in vitro* poskusi

Laboratorijski *in vitro* poskusi so natančno opisani v doktorski disertaciji z naslovom »Mehanizmi delovanja probiotičnih in protektivnih bakterij PCS 20, PCS 26 ter LGG v preprečevanju metaboličnega sindroma«, ki je dosegljiva na spletnem naslovu digitalne knjižnice Univerze v Mariboru <https://dk.um.si/Izpis-Gradiva.php?id=46643&lang=slv>.

Rezultati

V sklopu laboratorijskih *in vitro* poskusov smo najprej preverili viabilnost in presnovno aktivnost celičnih linij, izpostavljenih probiotičnim bakterijam. Rezultati niso pokazali nobenih toksičnih učinkov probiotičnih bakterij na celični liniji

HIEC in HUIEC ali zmanjšanja presnovne aktivnosti celičnih linij.

Pritrjevanje na črevesni epitelij

V nadaljevanju smo preverili ali imajo probiotične bakterije PCS 20, PCS 26 in LGG sposobnost pritrjevanja na črevesne epitelijske celice H4-1 in HUIEC. Najboljšo sposobnost pritrjevanja smo ugotovili pri sevu PCS 26, ki je imel v povprečju za 250 % večjo sposobnost pritrjevanja na celice v primerjavi z referenčnim sevom LGG ($p < 0,01$).

Sposobnost zaviranja pritrjevanja *E. coli*

Vsi trije bakterijski sevi PCS 2, PCS 26 in LGG so prav tako imeli sposobnost zaviranja pritrjevanja po Gramu negativne *Escherichie coli* na celičnih linijah H4-1 in HUIEC. Na celični liniji H4-1 je PCS 20 zavrl pritrjevanje *E. coli* za 43 % ($p = 0,025$), PCS 26 za 48 % ($p = 0,012$) in LGG za 39 % ($p = 0,038$) v primerjavi s kontrolo. Na celični liniji HUIEC je bila sposobnost zaviranja pritrjevanja *E. coli* še bolj izražena. Bakterijski sev PCS 20 je zavrl pritrjevanje *E. coli* za 57 % ($p < 0,01$), PCS 26 ($p < 0,01$) za 88 % in LGG za 69 % ($p < 0,01$) v primerjavi s kontrolo.

Sposobnost zaviranja rasti *E. coli*

Vsi trije bakterijski sevi so tudi zavirali rast *E. coli* na trdnih gojiščih. Rast *E. coli* je najbolj zavrl sev LGG, kjer je širina levega in desnega inhibicijskega pasu znašala 3,6 cm. Seva PCS 20 in PCS 26 sta enako učinkovito zavrla rast *E. coli* s povprečno širino inhibicijskega pasu 1,8 cm.

Odpornost na prisotnost žolča

Bakterijske seve smo preverili tudi na odpornost na žolč. Ob 0,3 % (w/v) koncentraciji žolča smo ugotovili statistično značilno ($p < 0,01$) nižjo absorbanco svetlobe v gojiščih. Najbolj odporen na

prisotnost žolča je bil sev PCS 26, kjer je bila absorbanca nižja za 43 % v primerjavi s kontrolo brez dodanega žolča. Sledil mu je sev PCS 20, kjer je bila absorbanca nižja za 60 % ter LGG, kjer je bila absorbanca nižja za 90 %.

Sposobnost odstranjevanja holesterola

Vsi trije sevi so pokazali sposobnost odstranjevanja holesterola iz medija. Največ holesterola v primerjavi s kontrolo (22,8 mg/dL) je odstranil sev PCS 26, kjer je bila koncentracija holesterola po inkubaciji 17,18 mg/dL ($p < 0,01$). Pri sevu LGG, smo po inkubaciji izmerili 18,5 mg/dL holesterola ($p < 0,01$) in pri sevu PCS 20 smo po inkubaciji izmerili 20,01 mg/dL holesterola ($p = 0,005$).

Izražanje encima hidrolaze žolčnih soli

Bakterijska seva PCS 20 in PCS 26 sta pokazala aktivnost encima hidrolaze žolčnih soli na gojiščih z dodanimi z glicinom konjugiranimi žolčnimi solmi (GCA: glikoholična kislina; GCDCA: glikohodeoksiholična kislina). Pri gojiščih z dodanimi s tavrinom konjugiranimi žolčnimi solmi pa bakterijska seva PCS 20 in PCS 26 nista pokazala aktivnosti encima hidrolaze žolčnih soli (TCA:

tavroholična kislina; TDCA: tavrodeoksiholična kislina; TCDCA: tavrohenodeoksiholična kislina). Bakterijski sev LGG ni pokazal aktivnosti encima hidrolaze žolčnih soli na nobenem gojišču. Sev *Lactobacillus acidophilus*, ki je bil uporabljen kot referenčni sev za določanje aktivnosti encima hidrolaze žolčnih soli, je pokazal aktivnost encima hidrolaze žolčnih soli na vseh gojiščih, razen na gojišču z dodano GCDCA, kjer ta sev ne uspeva.

Vpliv probiotičnih bakterij na izražanje genov lipidne homeostaze

Preverili smo vpliv probiotičnih bakterij na jetrne receptorje X (*NR1H3* in *NR1H2*) in tarčnih genov *NPC1L1*, ki je glavni igralec pri absorpciji holesterola v tankem črevesju, ter *ABCG5* in *ABCG8*, ki sta glavna prenašalca sterolov na enterocitih (27, 28). Vzporedno z zgoraj navedenimi geni smo preverili tudi izražanje gena *LPL*, ki igra pomembno vlogo pri presnovi lipidov (29). V ta namen smo uporabili celični liniji tankega črevesja HIEC in HUIEC.

Sev PCS 26 je statistično značilno povečal izražanje gena *NR1H3* za 49 % ($p < 0,01$) v celični liniji HIEC in za 44 % ($p < 0,01$) v celični liniji HUIEC (Slika 2a). Pri sevih PCS 20 in LGG pa vpliva na

Tabela 1. Povzetek rezultatov aktivnosti encima hidrolaze žolčnih soli.

Table 1. Summary of bile salt hydrolase activity results.

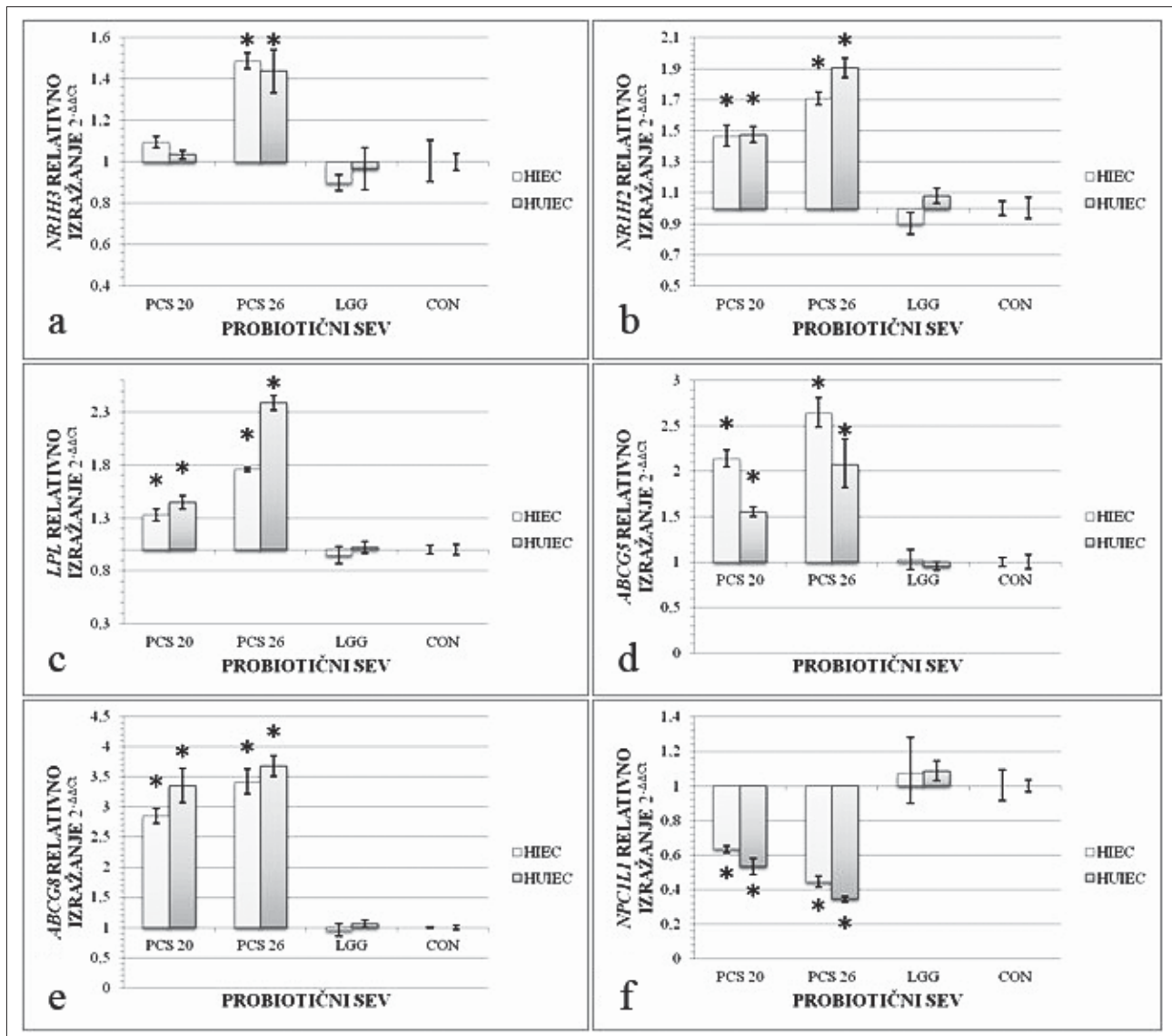
	0.2 % TCA	0.2 % TDCA	0.05 % TCDCA	0.2 % GCA	0.05 % GCDCA
Lactobacillus plantarum PCS 20	-	-	-	+	+
Lactobacillus plantarum PCS 26	-	-	-	+	+
Lactobacillus rhamnosus LGG	-	-	-	-	-
Lactobacillus acidophilus	+	+	+	+	NA

NA: ni rasti, neuporaben rezultat. TCA: tavroholična kislina; TDCA: tavrodeoksiholična kislina; TCDCA: tavrohenodeoksiholična kislina; GCA: glikoholična kislina; GCDCA: glikohodeoksiholična kislina.

NA: not applicable, no growth. TCA: taurocholic acid; TDCA: taurodeoxycholic acid; TCDCA: taurochenodeoxycholic acid; GCA: glycocholic acid; GCDCA: glycochenodeoxycholic acid.

izražanje gena *NR1H3* nismo ugotovili. Izražanje gena *NR1H2* je bilo povečano ob prisotnosti sevov PCS 20 in PCS 26 (Slika 2b). PCS 26 je povečal izražanje gena *NR1H2* za 71 % ($p < 0,01$) v celicah HIEC ter za 91 % ($p < 0,01$) v celicah HUIEC. PCS 20 je povečal izražanje gena *NR1H2* v povprečju za 47 % ($p < 0,01$) v obeh celičnih linijah, medtem ko LGG ni pokazal vpliva na izražanje gena

NR1H2. Sev PCS 26 je prav tako povečal izražanje gena *LPL* za 76 % ($p < 0,01$) v celični liniji HIEC in za 139 % ($p < 0,01$) v celični liniji HUIEC (Slika 2c). Sev PCS 20 je povečal izražanje gena *LPL* v manjšem obsegu kot PCS 26. V celični liniji HIEC je sev PCS 20 povečal izražanje gena *LPL* za 33 % ($p < 0,01$) in v celicah HUIEC za 45 % ($p < 0,01$). Pri sevu LGG ponovno nismo ugotovili vpliva na



Slika 2. Relativno izražanje genov lipidne homeostaze v celičnih linijah HIEC in HUIEC. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti relativnega izražanja treh neodvisnih poskusov v trojnikih \pm standardna napaka izražanja. Za določanje statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo (CON) smo uporabili statistični test ANOVA s post hoc Bonferronijevim testom ($*p \leq 0,05$). a. gen *NR1H3*; b. gen *NR1H2*; c. gen *LPL*; d. gen *ABCG5*; e. gen *ABCG8*; f. gen *NPC1L1*.

Figure 2. Relative expression of lipid homeostasis genes in HIEC and HUIEC cell lines. Results are presented as mean relative expression of three independent experiments in triplicates \pm standard error of expression. Statistically significant differences in comparison with the control were calculated using ANOVA post hoc Bonferroni test ($*p \leq 0.05$). a. gene *NR1H3*; b. gene *NR1H2*; c. gene *LPL*; d. gene *ABCG5*; e. gene *ABCG8*; f. gene *NPC1L1*.

izražanje gena *LPL*. Prav tako smo ugotovili povečanje izražanje genov *ABCG5* in *ABCG8* ob prisotnosti sevov PCS 20 in PCS 26 v obeh celičnih linijah (Slika 2d in e). Sev PCS 26 je v celični liniji HIEC povečal izražanje gena *ABCG5* za 165 % ($p < 0,01$) in gena *ABCG8* za 242 % ($p < 0,01$). V celični liniji HUIEC je sev PCS 26 povečal izražanje gena *ABCG5* za 110 % ($p < 0,01$) in gena *ABCG8* za 268 % ($p < 0,01$). Sev PCS 20 je povečal izražanje gena *ABCG5* za 114 % ($p < 0,01$) v celični liniji HIEC in za 56 % ($p = 0,009$) v celični liniji HUIEC ter tudi gena *ABCG8* za 185 % ($p < 0,01$) v celični liniji HIEC in za 235 % ($p < 0,01$) v celični liniji HUIEC. Sev LGG ponovno ni pokazal vpliva na izražanje genov *ABCG5* in *ABCG8*. V primerjavi s povečanim izražanjem genov *NRIH3*, *NRIH2*, *LPL*, *ABCG5* in *ABCG8* pa smo ob prisotnosti sevov PCS 20 in PCS 26 ugotovili obratno sorazmeren vpliv na izražanje gena *NPC1L1* (Slika 2f). Sev PCS 26 je znižal izražanje gena *NPC1L1* za 55 % ($p = 0,002$) v celični liniji HIEC in za 65 % ($p < 0,01$) v celični liniji HUIEC. Sev PCS 20 je zmanjšal izražanje gena *NPC1L1* za 36 % ($p = 0,022$) v celični

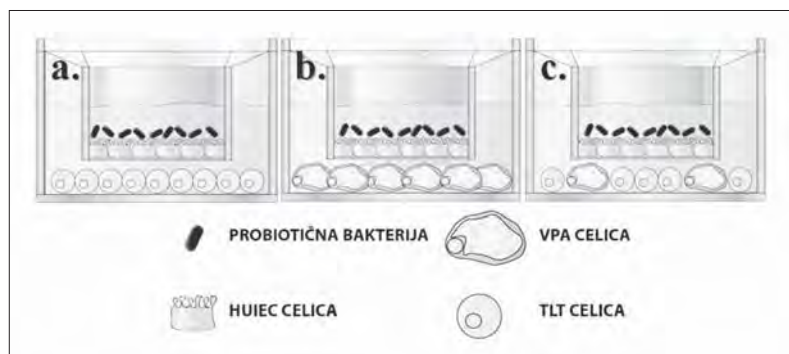
liniji HIEC in za 47 % ($p < 0,01$) v celični liniji HUIEC. Pri LGG-ju vpliva na izražanje gena *NPC1L1* nismo ugotovili.

Imunomodulatorni vpliv probiotičnih bakterijskih sevov

Za preverjanje imunomodulatornega vpliva probiotičnih bakterijskih sevov smo sestavili posebne funkcionalne celične 3 dimenzionalne (3D) modele (Slika 3)

V funkcionalnem celičnem 3D-modelu s celicami TLT v bazo-lateralnem predelu smo ob prisotnosti seva PCS 26 ugotovili za 0,7 pg/mL višjo koncentracijo tumor nekrotizirajočega dejavnika alfa (TNF- α). V tem modelu smo prav tako ugotovili porast koncentracije interleukina 13 (IL-13) ob prisotnosti vseh treh sevov PCS 20, PCS 26 in LGG. Pri sevu PCS 26 smo ugotovili porast koncentracije IL-13 za 3,5 pg/mL ($p = 0,05$), pri sevu LGG za 3,3 pg/mL ($p = 0,05$) in pri sevu PCS 20 za 2,1 pg/mL ($p = 0,046$). V funkcionalnem celičnem

3D-modelu s celicami VPA v bazo-lateralnem predelu smo ugotovili nižjo koncentracijo IL-13 ob prisotnosti sevov PCS 20, PCS 26 in LGG. Sev PCS 20 je znižal koncentracijo IL-13 za 7,9 pg/mL ($p = 0,05$), LGG za 7,5 pg/mL ($p = 0,05$) in PCS 26 je znižal koncentracijo za 4,3 pg/mL ($p = 0,05$). V funkcionalnem celičnem 3D-modelu z mešanimi celicami TLT in VPA v bazo-lateralnem predelu smo ugotovili porast koncentracije interleukina 12 (IL-12) ob prisotnosti seva LGG. Sev LGG je povečal koncentracijo IL-12 za 1 pg/mL ($p = 0,05$), česar pa pri ostalih dveh sevih nismo ugotovili. Opazili smo tudi porast koncentracije IL-13 za 2,9 pg/mL ob prisotnosti seva PCS 26, vendar se je razlika samo približala meji statistične značilnosti ($p = 0,07$).



Slika 3. Prikaz funkcionalnih celičnih 3D-modelov. a. Funkcionalni celični 3D-model, sestavljen iz celic HUIEC apikalno in celic TLT bazo-lateralno z dodanimi probiotičnimi sevi apikalno; b. Funkcionalni celični 3D-model, sestavljen iz celic HUIEC apikalno in celic VPA bazo-lateralno z dodanimi probiotičnimi sevi apikalno; c. Funkcionalni celični 3D-model, sestavljen iz celic HUIEC apikalno in mešanih celic TLT/VPA bazo-lateralno z dodanimi probiotičnimi sevi apikalno.

Figure 3. Functional cell 3D-models. a. Functional cell 3D-model composed of HUIEC cells apical and TLT cells basolateral, with added probiotic strains apical; b. Functional cell 3D-model composed of HUIEC cells apical and VPA cells basolateral, with added probiotic strains apical; c. Functional cell 3D-model composed of HUIEC cells apical and mixed TLT/VPA cells basolateral, with added probiotic strains apical.

Razprava

Naša študija je ena izmed prvih študij v svetovnem merilu, ki je s pomočjo celičnih linij nekarcinogenega izvora vrednotila ali lahko probiotične bakterije pripomorejo k lažšanju presnovnega sindroma. V študiji smo dokazali, da probiotične bakterije *Lactobacillus plantarum* PCS 20, *Lactobacillus plantarum* PCS 26 in *Lactobacillus rhamnosus* GG ne izražajo citotoksičnih učinkov in ne spreminjajo presnovne aktivnosti epiteljskih celic tankega črevesja. Vsi trije sevi so prav tako imeli sposobnost pritrjevanja na črevesni epitelij, sposobnost pritrjevanja na črevesni epitelij pa je eden izmed kriterijev za oceno bakterijskega seva kot probiotika (30, 31). Ugotovili smo tudi, da so vsi trije sevi sposobni zavirati pritrjevanje *E. coli* na črevesni epitelij in zavirati njeno rast na trdnih gojiščih. Predpostavljamo, da lahko sposobnost zaviranja pritrjevanja in rasti *E. coli* ugodno vpliva na potek bolezni pri bolnikih s sladkorno boleznijo tipa 2, saj je lipopolisaharid, ki je sestavni del stene gramnegativnih bakterij, vzročni dejavnik za razvoj presnovnih bolezni in vnetja (19, 22). Seva PCS 20 in PCS 26 sta bila tudi najbolj odporna na prisotnost žolča v gojišču, kar je pa pomembno pri prehodu bakterij skozi želodec (32). Probiotični sevi PCS 20, PCS 26 in LGG so prav tako bili sposobni odstranjevati holesterol iz medija, dodatno pa sta seva PCS 20 in PCS 26 še izražala aktivnost hidrolaze žolčnih soli. V nadaljevanju smo ugotovili, da seva PCS 20 in PCS 26 ugodno vplivata na izražanje genov lipidne homeostaze v celičnih linijah HIEC in HUIEC. Zvečano izražanje jetrnih receptorjev X (*NR1H3* in *NR1H2*) in njihovih tarčnih genov (*LPL*, *ABCG5*, *ABCG8* in *NPC1L1*) lahko pospeši izločanje holesterola preko žolča in hkrati zavira absorpcijo holesterola v prebavni cevi. Dokazano je bilo, da povečano izražanje genov *ABCG5* in *ABCG8* zmanjša absorpcijo holesterola v prebavni cevi ter pospešuje izločanje holesterola preko žolča (33). Študije v preteklosti so prav tako dokazale, da so bili mišji modeli *NPC1L1*-null (brez gena *NPC1L1*) odporne na hiperholesterolemijo, povzročeno s prehrano (34,

35). Na mišjih modelih je bilo dokazano tudi, da povečano izražanje gena *LPL* lahko vodi k zmanjšanju serumskih trigliceridov, saj povečano izražanje gena *LPL* deluje zaščitno proti hiperlipidemiji in aterosklerozi v miših (36, 37). Čeprav raven serumskega holesterola ni omenjena pri opredelitvah presnovnega sindroma, je vsekakor pomemben dejavnik pri nastanku ateroskleroze in posledično srčno-žilnih bolezni. Zato smo mnenja, da sposobnost zniževanja holesterola pod vplivom probiotičnih bakterij lahko pripomore k lažšanju presnovnega sindroma in z njim povezanih stanj. Preverili smo tudi vpliv bakterijskih sevov PCS 20, PCS 26 in LGG na imunski odziv v smislu izločanja citokinov v posebnih funkcionalnih celičnih 3D-modelih. Ugotovili smo, da so vsi trije sevi PCS 20, PCS 26 in LGG bili sposobni vplivati na povišano izločanje IL-13 v funkcionalnem celičnem 3D-modelu, ki je bil sestavljen iz celic HUIEC in TLT. V nasprotju z modelom, sestavljenim iz celic HUIEC in TLT, smo v modelu s celicami HUIEC in VPA ugotovili, da so vsi trije sevi vplivali na zmanjšano izločanje IL-13. V tem poskusu sev PCS 26 ni vplival na zmanjšanje izločanja IL-13 v takem obsegu kot PCS 20 in LGG. V modelu, ki je bil sestavljen iz celic HUIEC in mešanih celic TLT ter VPA v bazo-lateralnem predelu, je na povišanje izločanja IL-13 vplival samo bakterijski sev PCS 26, vendar je bila razlika samo mejno statistično značilna. Znano je, da IL-13 ugodno vpliva na žilne obloge, kot je bilo dokazano v študiji z glodavci (38). Ugotovljeno je tudi bilo, da je IL-13 fiziološki signal preko katerega se zavre proizvodnja glukoze v jetrih (39). V prvem modelu, ki je bil sestavljen iz celic HUIEC in TLT, je bakterijski sev PCS 26 povzročil tudi povišano izločanje TNF- α . TNF- α v maščobnem tkivu je dejavnik, ki prispeva k inzulinski rezistenci in dislipidemiji (40). TNF- α lahko pripomore tudi k protitumornemu delovanju T-celic, po drugi strani pa lahko neuravnano in povečano izločanje vodi v vnetne stanja, kot so revmatoidni artritis in Crohnova bolezen (41–43). Povišano izločanje TNF- α smo ugotovili samo v modelu z monociti/mkrofagi, ne pa tudi pri ostalih modelih, kar nakazuje, da lahko sev PCS 26 pri-

pravi imunski sistem na protimikrobno delovanje (44). V modelu, ki je bil sestavljen iz celic VPA in TLT v bazo-lateralnem predelu smo prvič ugotovili vpliv seva LGG na povišano izločanje IL-12. Povišano izločanje IL-12 v gostitelju lahko spodbuja prirojen imunski sistem, lahko pa tudi vodi v vnetje (45, 46).

Zaključek

Ukrepi preprečevanja ali lajšanja presnovnega sindroma lahko v prihodnosti pomembno zmanjšajo breme srčno-žilnih bolezni in z njimi povezanih zapletov. V naši laboratorijski *in vitro* študiji smo ugotovili, da probiotični bakterijski sev *Lactobacillus plantarum* PCS 26 izraža pozitivne učinke, ki bi v gostitelju s presnovnim sindromom, lahko pripomogli k lajšanju posameznih sestavin sindroma. Rezultati naše študije nedvomno predstavljajo temelj za izvedbo klinične študije s probiotičnim bakterijskim sevom PCS 26, kot dodatkom k že ustaljeni farmakološki terapiji, pri bolnikih s presnovnim sindromom.

LITERATURA

1. Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988; 37(12): 1595–607
2. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23(5): 469–80
3. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome—a new worldwide definition. *Lancet* 2005; 366: 1059–62
4. Grundy SM. Clinical Management of Metabolic Syndrome: Report of the American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute/American Diabetes Association Conference on Scientific Issues Related to Management. *Circulation* 2004; 109(4): 551–56
5. Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A, Chen RS. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation* 2004; 109(1): 42–6
6. Duvnjak L, Duvnjak M. The metabolic syndrome - an ongoing story. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60 Suppl 7: 19–24
7. Haffner S, Cassells HB. Metabolic syndrome - a new risk factor of coronary heart disease? *Diabetes Obes Metab* 2003; 5(6): 359–70
8. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21(6): 697–738
9. Pannacciulli N, Cantatore FP, Minenna A, Bellacicco M, Giorgino R, De Pergola G. C-reactive protein is independently associated with total body fat, central fat, and insulin resistance in adult women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(10): 1416–20
10. Mendall MA, Patel P, Asante M, Ballam L, Morris J, Strachan DP, et al. Relation of serum cytokine concentrations to cardiovascular risk factors and coronary heart disease. *Heart* 1997; 78(3): 273–7
11. Festa A, D'Agostino R, Jr., Williams K, Karter AJ, Mayer-Davis EJ, Tracy RP, et al. The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2001; 25(10): 1407–15
12. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Yannakoulia M, Chrysohooou C, Stefanadis C. The implication of obesity and central fat on markers of chronic inflammation: The ATTICA study. *Atherosclerosis* 2005; 183(2): 308–15
13. Das UN. Obesity, metabolic syndrome X, and inflammation. *Nutrition* 2002; 18(5): 430–2
14. Visser M, Bouter LM, McQuillan GM, Wener MH, Harris TB. Elevated C-reactive protein levels in overweight and obese adults. *JAMA* 1999; 282(22): 2131–5
15. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1785–8
16. Neels JG, Olefsky JM. Inflamed fat: what starts the fire? *J Clin Invest* 2006; 116(1): 33–5
17. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92(3): 347–55
18. Cani PD, Delzenne NM. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr Opin Pharm* 2009; 9(6): 737–43
19. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007; 56(7): 1761–72
20. Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007; 50(11): 2374–83
21. Waldram A, Holmes E, Wang Y, Rantalainen M, Wilson ID, Tuohy KM, et al. Top-down systems biology modeling of host metabotype-microbiome associations in obese rodents. *J Proteome Res* 2009; 8(5): 2361–75
22. Larsen N, Vogensen FK, van den Berg FW, Nielsen DS, Andreasen AS, Pedersen BK, et al. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One* 2010; 5(2): e9085
23. Black DD, Tso P, Weidman S, Sabesin SM. Intestinal lipoproteins in the rat with D-(+)-galactosamine hepatitis. *J Lipid Res* 1983; 24(8): 977–92
24. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008; 57(6): 1470–81

25. Cencic A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology – A review. *Int J Food Microbiol* 2010; 141: S4–S14
26. Gorenjak M, Skok P, Cencic A. Novel promising functional cell models to study molecular events in metabolic syndrome. *Nutr Ther Metab* 2012; 30(1): 34–41
27. Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 2004; 303(5661): 1201–4
28. Hazard SE, Patel SB. Sterolins ABCG5 and ABCG8: regulators of whole body dietary sterols. *Pflugers Arch* 2007; 453(5): 745–52
29. Zhang Y. Regulation of Lipoprotein Lipase by the Oxysterol Receptors, LXRA and LXRbeta. *J Biol Chem* 2001; 276(46): 43018–24
30. Langerholc T, Maragkoudakis PA, Wollgast J, Gradisnik L, Cencic A. Novel and established intestinal cell line models – An indispensable tool in food science and nutrition. *Trends Food Sci Technol* 2011; 22: S11–S20
31. FAO, WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada. April 30 and May 1, 2002. (5.3.2014) http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf?ua=1
32. Nissen L, Chingwaru W, Sgorbati B, Biavati B, Cencic A. Gut health promoting activity of new putative probiotic/protective *Lactobacillus* spp. strains: A functional study in the small intestinal cell model. *Int J Food Microbiol* 2009; 135(3): 288–94
33. Yu L. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 2002; 110(5): 671–80
34. Davis HR, Jr., Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Zhu LJ, Graziano MP, et al. Deficiency of Niemann-Pick C1 Like 1 prevents atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *Arterio Thromb Vasc Biol* 2007; 27(4): 841–9
35. Davis HR, Jr., Zhu LJ, Hoos LM, Tetzloff G, Maguire M, Liu J, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem* 2004; 279(32): 33586–92
36. Yagyu H, Ishibashi S, Chen Z, Osuga J, Okazaki M, Perrey S, et al. Overexpressed lipoprotein lipase protects against atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *J Lipid Res* 1999; 40(9): 1677–85
37. Niho N, Mutoh M, Takahashi M, Tsutsumi K, Sugimura T, Wakabayashi K. Concurrent suppression of hyperlipidemia and intestinal polyp formation by NO-1886, increasing lipoprotein lipase activity in Min mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(8): 2970–4
38. Cardilo-Reis L, Gruber S, Schreier S, Drechsler M, Milicevic-Papac N, Weber C, et al. Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype. *EMBO Mol Med* 2012; 4: 1072–86
39. Stanya KJ, Jacobi D, Liu S, Bhargava P, Dai L, Gangl MR, et al. Direct control of hepatic glucose production by interleukin-13 in mice. *J Clin Invest* 2013; 123(1): 261–71
40. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(6): 212–7
41. Calzascia T, Pellegrini M, Hall H, Sabbagh L, Ono N, Elford AR, et al. TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *J Clin Invest* 2007; 117(12): 3833–45
42. McDevitt H, Munson S, Ettinger R, Wu A. Multiple roles for tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha/beta in immunity and autoimmunity. *Arthritis Res* 2002; 4 Suppl 3: S141–52
43. Kollias G. TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34(5 Suppl1): 3–6
44. Trapecar M, Goropevsek A, Gorenjak M, Gradisnik L, Slak Rupnik M. A co-culture model of the developing small intestine offers new insight in the early immunomodulation of enterocytes and macrophages by *Lactobacillus* spp. through STAT1 and NF-kB p65 translocation. *PLoS One* 2014; 9(1): e86297
45. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(2): 133–46
46. Peluso I, Pallone F, Monteleone G. Interleukin-12 and Th1 immune response in Crohn's disease: pathogenetic relevance and therapeutic implication. *World J Gastroenterol* 2006; 12(35): 5606–10