Thesis Title Effects of Probiotics on Heterocyclic Amine Binding, Nitrosamine Degradation and Microorganisms in Rat Intestinal Tract

Author Miss Yodsawee Duangjitcharoen

Degree Doctor of Philosophy (Pharmacy)

Thesis Advisory Committee Asst.Prof.Dr. Chaiyavat Chaiyasut Advisor

Assoc.Prof.Dr.Duangporn Kantachote Co-advisor

Asst.Prof.Dr. Chutinun Prasitpuriprecha Co-advisor

ABSTRACT

Potential probiotic strain for being health protectant especially intestinal illness is strain specific. Accordingly, this study was purposed to select the new strain of probiotic from non-human origin and human origin to discover probiotic strain with the properties of intestinal protectant that related with health and intestinal prevention. To assess the efficacy of probiotic, *in vitro* and *in vivo* studies were performed. *Lactobacillus plantarum* CM4 was the new probiotic strain from non-human origin in this study. CM4 cells could well tolerate and grow in 0.3% bile salt after 5 hours of incubation, in pH3 after 6 hours of incubation, and in 100µg/ml indole, phenol, p-cresol presence condition for 144hours. In addition, live CM4 cells showed a statistically significant ($p \leq 0.05$) binding ability the tested-heterocyclic amines (HCA). It showed the most effective to bind 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) mutagen (50 µg/ml) after 24 hours of incubation

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

with 37.73% binding ability. Using 2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) mutagen, CM4 cell grown for144 hours could bind IQ with 85.34% binding. Moreover, CM4 strain had *N*-nitrosamine degrading ability at doses of 1.0-200 µg/ml. It could be better degrade diphenylnitrosamine (DPN) than 1-nitrosopyrrolidine (NPR) with dose response. Additionally, by *in vivo* study about intestinal adherence ability of probiotic, a live CM4 cells labeled with a fluorescent dye (cFDA-SE) was able to persist in mouse small intestine and colon for 5 days. It may imply that the CM4 strain could be the added value for the consuming pharmaceutical probiotic product based on scientific proves about its role for intestinal survival properties and colon cancer prevention through binding PhIP and IQ mutagen and degrading nitrosamine. Moreover, CM4 strain would be safe because of no death or illness of the animals. The new probiotic strain could decrease the activities of bacterial enzyme as β-glucuronidsae and azoreductase in rat feces. A statistical analysis of azoreductase activity by repeated measure ANOVA showed significantly different ($p=0.02$) from the control group. Importantly, it decreased the amount of indole, cresols, skatole, and the number of enterobacteria such as *E. coli* and *Salmonella* in rat feces during the probiotic-feeding period. In addition, production of lactic acid and short chain fatty acid as acetic acid and propionic acid in rat feces has revealed an increasing trend at that time.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของโพรไบโอติกต่อการจับเฮทเทอโรไซคลิกเอมีน การสลายไนโตรซามีนและจุลินทรีย์ในลำไส้หนูขาว

ผู้เขียน นางสาวยศวีร์ ดวงจิตต์เจริญ

ปริญญา วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เภสัชศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.ไชยวัฒน์ ไชยสุต อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

รศ.ดร. ดวงพร คันธโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผศ.ดร.ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีสมบัติในการปกป้องสุขภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งความเจ็บป่วยที่จะเกิดขึ้นกับระบบลำไส้นั้น จะเป็นสายพันธุ์ที่มีความจำเพาะ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายในการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกมาจากตัวอย่างที่มีแหล่งที่มาจากทั้งที่เกี่ยวข้องและไม่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติการป้องกันสุขภาพและระบบลำไส้ ซึ่งจะทำการทดสอบทั้งในระดับหลอดทดลองและในสิ่งมีชีวิต ผลการศึกษาพบว่า โพรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ที่คัดเลือกได้จากการศึกษาในครั้งนี้คือ *Lactobacillus plantarum* CM4 ซึ่งคัดแยกมาได้จากตัวอย่างที่ไม่เกี่ยวข้องกับมนุษย์ โดยโพรไบโอติก สายพันธุ์ CM4 นี้ สามารถทนและเจริญได้ในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.3 นาน 5 ชั่วโมง และที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับ 3 นาน 6 ชั่วโมงและ ทนสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีสารอินโดล ฟีนอล พาราครีซอล 100 ไมโครกรัม/มล. นาน 144 ชั่วโมง ยิ่งไปกว่านั้น เซลล์มีชีวิตสายพันธุ์ CM4 แสดงความสามารถในการจับสารทดสอบเฮทเทอโรไซคลิกเอมีนที่นำมาทดสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ ยังพบว่า โพรไบโอติกสายพันธุ์ CM4 มีคุณสมบัติการจับสารเฮเทอโรไซคลิกเอมีนชนิด PhIP ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัม/มล.ได้ร้อยละ 37.73 หลังจากระยะเวลาการทดสอบนาน 144 ชั่วโมง ในขณะที่สามารถจับสารเฮเทอโรไซคลิกเอมีนชนิด IQ ได้ร้อยละ 85.34 หลังจากระยะเวลาการทดสอบนาน 144 ชั่วโมง นอกจากนี้ ในการทดสอบการสามารถสลายสารไนโตรซามีนที่ช่วงความเข้มข้น 1.0-200ไมโครกรัม/มล. พบว่า โพรไบโอติกสายพันธุ์ CM4 สามารถสลายสารไนโตรซามีนชนิด diphenylnitrosamine (DPN) ได้มากกว่า 1-Nitrosopyrrolidine (NPR) อย่างมีรูปแบบขึ้นกับความเข้มข้นของสารทดสอบ และในการทดสอบในหนูถีบจักรพบว่า จุลินทรีย์โพรไบโอติกยังมีชีวิตมีคุณสมบัติในการเกาะติดลำไส้ของหนูถีบจักรได้ทั้งในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่นาน 5 วัน ด้วยการติดตามโดยอาศัยการติดฉลากด้วยสารฟลูออ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เรสเซ็นต์ cFDA-SE ให้แก่เซลล์ของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นแนวทางในการบ่งชี้ได้ว่าโพรไบโอติกสายพันธุ์ CM4 สามารถนำไปใช้ในทางเภสัชกรรมได้ โดยมีข้อมูลคุณสมบัติพื้นฐานที่ได้จากการทดลองทางวิทยาศาสตร์ที่แสดงถึงการมีคุณสมบัติในการรอดชีวิตเมื่อผ่านทางเดินอาหารได้รวมทั้งการมีคุณสมบัติในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่จากการพบการคุณสมบัติการสามารถจับสารก่อกลายพันธุ์กลุ่มเฮเทอโรไซคลิกเอมีนคือ PhIP และ IQ รวมถึงการสลายสารไนโตรซามีนได้ นอกจากนี้ จากการศึกษาในหนูขาวเพื่อศึกษาการปรับเปลี่ยนจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อมจุลินทรีย์ในลำไส้ พบว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ CM4 มีความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลอง ไม่พบการตายหรือการป่วยของหนูขาวตลอดการศึกษา และผลการศึกษาแสดงให้เห็นการสามารถลดปริมาณของเอ็นไซม์บีตากลูคูโรนิเดสและเอโซรีดักเตสจากการวิเคราะห์ในมูลของหนูขาวได้ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติกิจกรรมของเอ็นไซม์เอโซรีดักเตสโดยใช้สถิติ repeated measure ANOVA แสดงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($p=0.02$) รวมทั้งการลดปริมาณสารประกอบ อินโดล ฟีนอล ครีซอล สกาโตลได้ และการลดประมาณจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ คือ *E.coli* และ *Salmonella* ได้รวมทั้งศึกษาพบการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก นอกจากนี้ ยังพบการเพิ่มปริมาณของกรดอินทรีย์ชนิดกรดน้ำนม และกรดไขมันสายสั้น คือ กรดอะซีติกและโพรพิโอนิก ในช่วงของการทดลองที่มีการป้อนจุลินทรีย์โพรไบโอติกแก่หนูขาวอีกด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved