

# Funkční poruchy trávení a mikrobiom

Cílená kombinace 5 imunomodulačních probiotických kmenů a OMEGA3 mastných kyselin



## KLINICKÁ STUDIE

- 14-týdenní
- paralelní
- randomizovaná
- dvojitě zaslepená
- placebem kontrolovaná
- na souboru 109 pacientů

## Cílená kombinace 5 imunomodulačních probiotických kmenů a OMEGA3 mastných kyselin

Probiotické bakteriální kmeny v této studii byly pečlivě vybrány na základě jejich vědecky prokazatelných pozitivních účinků při managementu symptomů funkčních poruch trávení.



V roce 2018 byla provedena klinická studie cílené kombinace 5 probiotických bakterií, aby se vyhodnotil efekt na zmírnění příznaků funkčních poruch trávení, především syndromu dráždivého tračníku - IBS. Výsledky ukázaly, že zkoumaná probiotická směs je účinná při zlepšování závažnosti symptomů typu IBS. Po 6 týdnech léčby byl zjištěn signifikantně vyšší podíl úspěšnosti léčby, snížení vnímání bolesti podle různých klinických škál a modifikace střevní mikrobioty, charakterizovaná nárůstem bifidobakterií, které jsou stále detekovatelné 6 týdnů po vysazení probiotik.

# KLINICKÁ STUDIE

## Úvod

**Funkční gastrointestinální poruchy (FGID)**, známé jako **poruchy osy střevo-mozek**, se vyznačují výraznými změnami na úrovni profilu střevní mikrobioty a to snížením biodiverzity, výrazným snížením počtu bifidobakterií a laktobacilů, jakož i nárůstem počtu potenciálně patogenních bakterií (1)

Vzniklá **dysbióza** často vede k porušení integrity střevního epitelu, viscerální hypersenzitivitě a k abnormalitám motility střev, čímž se zvyšuje **dysfunkce střevní bariéry**.

K **FGID** řadíme mimo jiné **syndrom dráždivého tračníku (IBS)**, funkční dyspepsii (FD) či **spektrum symptomů** jako jsou bolesti/pálení břicha, nadýmání, nevolnost, plnost, zvracení a změněné návyky střev jako je průjem, zácpa nebo obojí.

Tato klinická studie odhalila, že probiotická směs **laktobacilů a bifidobakterií** je účinná při snižování závažnosti symptomů podobných IBS modifikací střevní mikrobioty, především zvýšením počtu bifidobakterií a laktobacilů. Závažnost symptomů IBS podle vybraných stupnic hodnocení se významně snížila ve skupině s probiotiky ve srovnání se skupinou s placebem i ve srovnání na začátku a na konci klinické studie.

## Cíle

**Primárním cílem** klinické studie bylo vyhodnotit účinnost a bezpečnost probiotické směsi u pacientů s **příznaky syndromu dráždivého tračníku**.

## Metodika

Pacienti s příznaky typu IBS vstoupili do prospektivní, dvojitě zaslepené, randomizované placebem kontrolované čtrnáctitýdenní studie.

Šestitýdennímu léčebnému období (3-8 týden) předcházela dvoutýdenní adaptační fáze a následovala 6-týdenní pozorovací fáze. Klinické údaje byly monitorovány v celé studii ověřenými dotazníky: **Systém hodnocení závažnosti IBS (IBS-SSS); Stupnice hodnocení gastrointestinálních symptomů (GSRS) a Stupnice formy stolice Bristol (BSFS)**. Fekální mikrobiota byla testována pomocí kultivace a 16S rRNA sekvenční analýzy (1).

**Tabulka 1.** Základní charakteristika účastníků studie

\*Medián (rozsah)

†Normální hodnota TTG-IgA <10 IU/ml

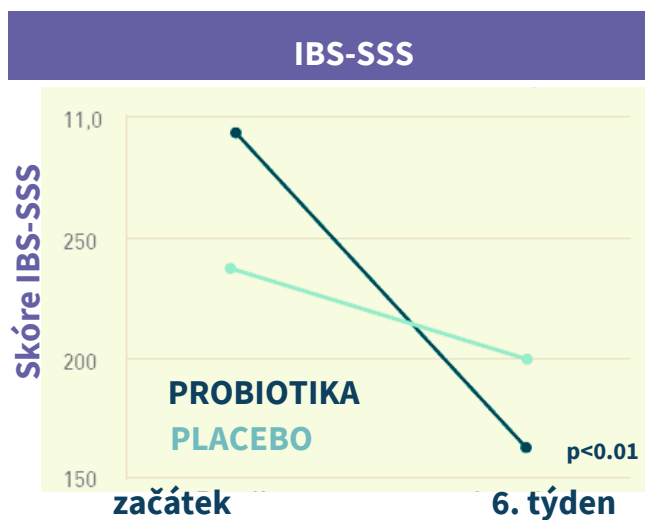
BMI, index tělesné hmotnosti; CI, interval spolehlivosti; NS, nevýznamný; TTG-IgA, tkáňová transglutamináza - imunoglobulín-A. Upraveno podle Francavilla a kol., 2019

	Probiotikum (n = 54)	Placebo (n = 55)	P
<b>Věk</b>	43.3± 19	44.6± 19	NS
<b>Pohlaví (m/ž)</b>	6/35	9/46	NS
<b>BMI kg/m2</b>	22.8±3.5	23.4±2.9	NS
<b>TTG-IgA (IU/mL)*†</b>	0.8 (0-1.2)	0.5 (0-2.1)	NS
<b>IBS-SSS</b>	295± 84.9 (95% CI, 26.9-32.0)	237.6±86.5 (95% CI, 13.4-27.5)	0.01
<b>GSRS</b>	18.7± 5.8 (95% CI, 14.6-26.1)	14.9± 5.1 (95% CI, 13.4-27.5)	0.02
<b>BSFS</b>	2.6± 1.2	2± 1.5	NS

## Výsledky

### 1) Systém hodnocení závažnosti IBS (IBS-SSS)

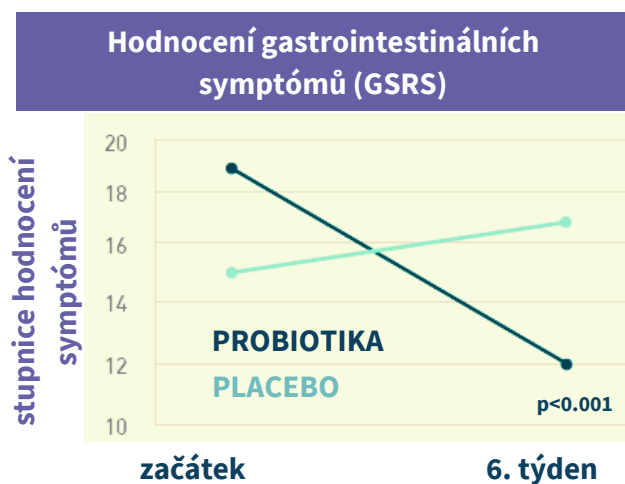
Závažnost symptomů IBS podle stupnice hodnocení IBS-SSS ve skupině s probiotiky se významně snížila ve srovnání s placebem (-21,4% ± 15,5% oproti -6,8% ± 21,7%;  $p < 0,01$ ) (Obrázek 1) (1).



Obrázek 1. Vyhodnocení závažnosti symptomů IBS.

### 2) Stupnice hodnocení gastrointestinálních symptomů (GSRs) a Stupnice formy stolice Bristol (BSFS)

Závažnost symptomů IBS podle stupnice hodnocení GSRs ve skupině s probiotiky se významně snížila ve srovnání s placebem (-19,8 % ± 16,6 % vs. 12,9 % ± 31,6 %;  $p < 0,001$ ) (Obrázek 2) (tabulka 2).



Obrázek 2. Vyhodnocení závažnosti gastrointestinálních symptomů.

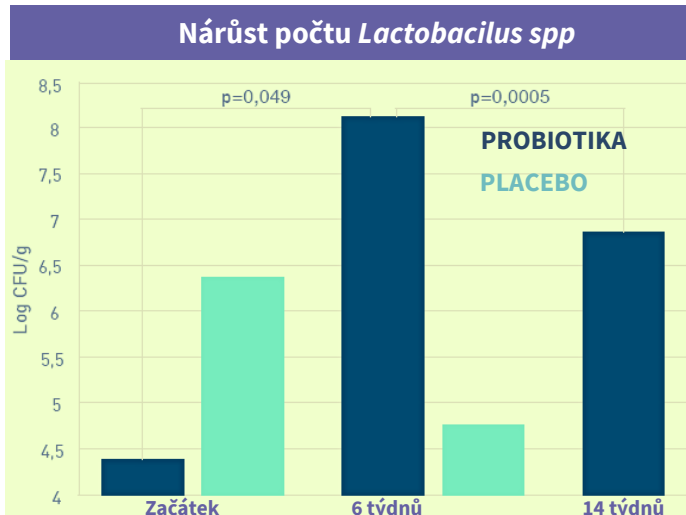
Na konci léčby se skóre BSFS ve skupině s probiotiky významně snížilo ve srovnání s placebem (-3,3 % ± 41,6 % vs. 51,5% ± 101,1 %;  $P < 0,01$ ) (1).

Klinické skóre	Probiotikum (n=54)	Placebo (n=55)	P
IBS-SSS	170.1 ± 53.4 (95% CI, 154-187)	200.8 ± 74.4 (95% CI, 179-223)	0.008
$\Delta oZ$	-15.9% ± 14,8% (95% CI, -20.4 - -11.4)	8.2% ± 25.9% (95% CI, 0.3-16.2)	0.001
GSRs	12.2 ± 5.5 (95% CI, 11.6-14.9)	16.7 ± 6.7 (95% CI, 14.5-18.8)	0.007
$\Delta oZ$	-19.8% ± 16.6% (95% CI, -24.8 - -14.8)	12.9% ± 31.6% (95% CI, 3.2-22.6)	0.001
BSFS	2.2 ± 1.3	3.1 ± 1.9	NS
$\Delta oZ$	-3.3% ± 41.6% (95% CI, -16 - 9.3)	51.5% ± 101.1% (95% CI, 20.4-82.6)	0.01

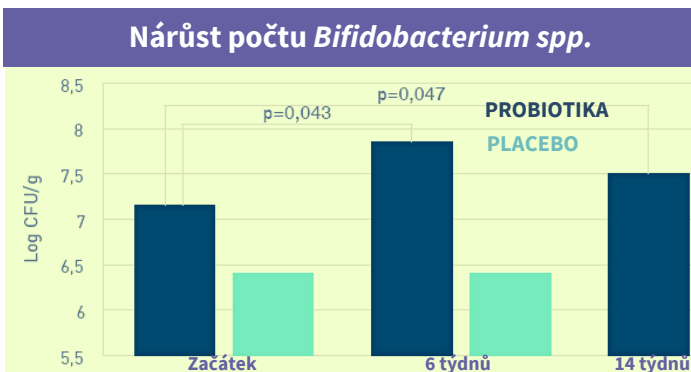
Tabulka 2. Klinické skóre na konci léčby; CI, interval spolehlivosti; NS, nevýznamný;  $\Delta oZ$  změna oproti začátku, upraveno podle Francavilla a kol., 2019.

### (3) Vyhodnocení fekálních kultivovatelných bakterií a mikrobiomu

Ve srovnání s výchozí hodnotou se celkové počty anaerobů zvýšili ze 7,02 na 8,35 log CFU/g (střední hodnoty,  $P=0,018$ ) po 6 týdnech léčby probiotiky. Léčba probiotiky vede také k nárůstu předpokládaných bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Bifidobacterium*) (Obrázek 3). Ve srovnání s výchozí hodnotou byla po 6 týdnech léčby probiotiky zjištěna i vyšší hladina předpokládaných bifidobakterií (Obrázek 4).



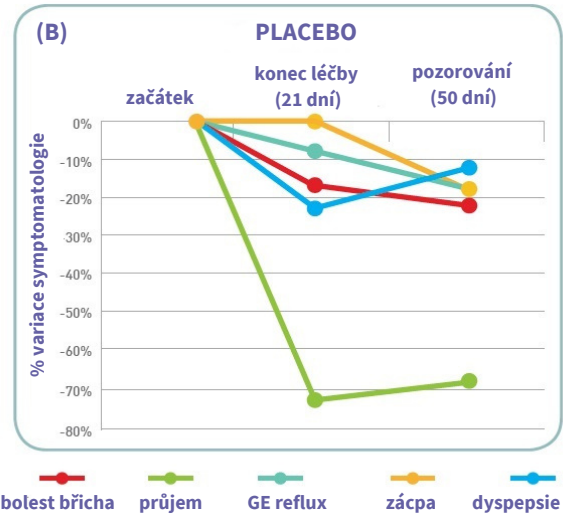
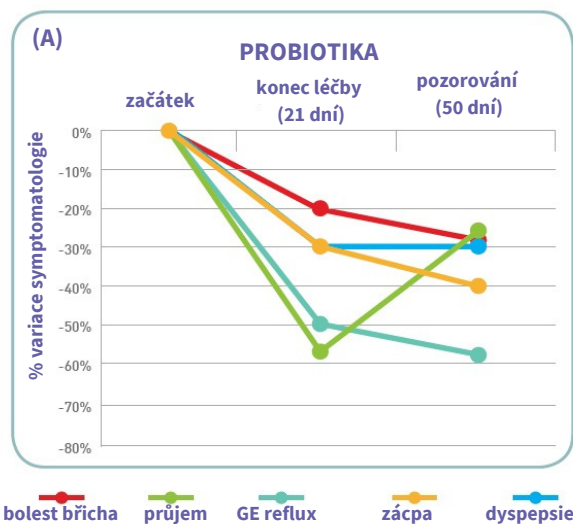
**Obrázek 3.** Nárůst počtu laktobacilů ve skupině placebo vs. ve skupině s probiotiky.



**Obrázek 4.** Nárůst počtů bifidobakterií ve skupině placebo vs. ve skupině s probiotikami.

## Úspěšnost léčby

Úspěšnost léčby byla signifikantně vyšší u pacientů užívajících probiotika ve srovnání s placebem při analýze záměru léčby (14,8 % oproti 3,6 %;  $p < 0,04$ ) i podle protokolu (15,3 % oproti 3,8 %;  $p < 0,04$ ) (Obrázek 5 A a B) (1).



**Obrázek 5.** Vyhodnocení variace symptomatologie u skupiny s probiotiky (A) a skupiny s placebem (B).

## IN VITRO STUDIE

Ceiakie je autoimunitní enteropatie způsobená nesnášenlivostí glutenových proteinů. *In vitro* studie z roku 2020 je zaměřena na vyhodnocení schopnosti cílené kombinace 5 probiotických bakterií hydrolyzovat glutenové peptidy po simulovaném gastrointestinálním trávení gliadinu v buňkách Caco-2.

Hodnotila se i schopnost bakteriálních hydrolyzátů působit proti toxickým účinkům peptidů odvozených od gliadinu v buňkách Caco-2. Výsledky této studie naznačují, že tyto probiotické kmeny jsou schopny snížit toxicitu gliadinu, který zůstává po pepticko-tryptickém štěpení degradací imunodominantních gliadinových peptidů, čímž inhibují jejich škodlivé účinky na střevní epitelové buňky a tak mohou mít ochrannou úlohu při celiakii.

## Cíle

**Primárním cílem** bylo zhodnotit schopnost cílené kombinace 5 probiotických bakterií trávit gliadinové peptidy *in vitro* a modifikovat gliadinem indukovanou prozánětlivou odpověď a změny struktury epitelu v linii lidských střevních buněk Caco-2 (2).

## Metodika

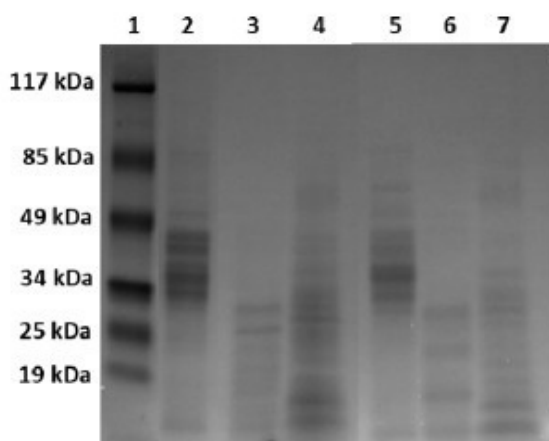
*In vitro* studie pozorovala proteolytickou aktivitu vybraných probiotických kmenů v alikvótech s komplexem gliadin/enzym (PT-gliadin, P: pepsin, T: trypsin nebo chymotrypsin w/w, poměr 1:40) i se surovým gliadinem v porovnání s kontrolním vzorkem bez probiotických bakterií (2).

## Výsledky

### 1) Proteolytická aktivita cílené kombinace 5 probiotických bakterií

Výsledky **analýzy gliadinu** prostřednictvím **SDS-PAGE** naznačují, že prvním enzymatickým štěpení kombinací pepsinu a trypsinu (PT, dráha 3) nebo samotným chymotrypsinem (chymo-, dráha 4) jsou vybrány probiotické bakterie schopné dále štěpit gliadin na fragmenty s molekulovou hmotností menší než 35 kDa (dráha 6,7).

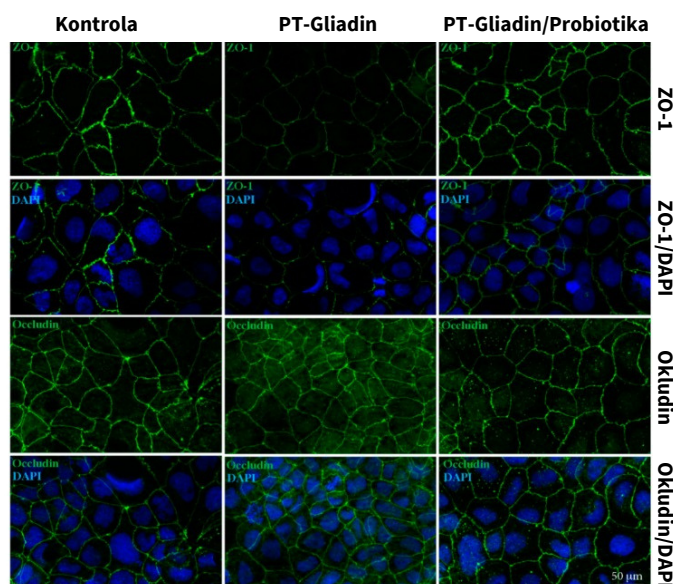
Navíc se zdá, že gliadin neošetřený trávicími enzymy (dráha 2) je částečně tráven bakteriemi (dráha 5), což říká ve prospěch jejich proteolytické aktivity i bez předchozího natrávení (Obrázek 6). Výsledky tedy naznačují, že probiotika dokáží pomoci s trávením gliadinu (2).



**Obrázek 6.** Analýza gliadinu elektroforézou na polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE). (1) Markery molekulové hmotnosti (MW); (2) Gliadin standard; (3) PT-gliadin; (4) chymo-gliadin; (5) gliadin + bakt.; (6) PT-gliadin + bakt.; (7) Chymo-gliadin + bakt. Upraveno podle Giorgi a kol., 2020.

### 2) Účinek PT-Gliadinu a PT-Gliadin/Probiotika na Caco-2 těsná spojení

Výsledky ukazují, že neošetřené monovrstvy Caco-2 měly typickou lokalizaci ZO-1 a okcludinu na buněčné periferii (3), zatímco ošetření PT gliadinem během 3 hodin indukovalo výrazné snížení fluorescence ZO-1 a redistribuci okcludinu na úrovni cytosolu, což může cytosolu oslabení těsných spojů bariéry a zvýšení její propustnosti. Když byly buňky ošetřeny PT-gliadinem/probiotiky, uvolňování ZO-1 ani redistribuce okcludinu nebyly pozorovány, což nasvědčuje schopnost probiotik chránit těsné spoje (Obrázek 7).



**Obrázek 7.** Buňky Caco-2 zabarvené pro detekci zonulinu (ZO-1) nebo okcludinu. Buňky byly ošetřeny 1 mg/ml PT gliadinu nebo PT-gliadinu/probiotik a po 3 hodinách ošetření byly buňky fixovány a zabarveny protilátkami proti ZO-1 nebo okcludinu a 4',6-diamidino-2-fenylindolem (DAPI) pro kontrastní barvení. Upraveno podle Giorgi a kol., 2020.

### 3) Modulace produkce IL-6 a oxidačního stresu buňkami Caco-2 vystavenými PT-gliadinu trávenému nebo netrávenému bakteriemi

PT-gliadin byl schopen způsobit významné zvýšení produkce IL-6 ve srovnání s kontrolou. V přítomnosti PT-gliadinu/probiotik nebylo možné pozorovat žádné zvýšení IL-6, místo toho bylo pozorováno významné snížení produkce IL-6 ve srovnání s kontrolními buňkami, což naznačuje protizánětlivý ochranný efekt probiotik (2).

## OMEGA-3 PUFA A ZVÝŠENÍ ÚČINNOSTI PROBIOTIK

Kombinace probiotik se synergicky působícími složkami přírodního původu je vhodným způsobem pro **zvýšení účinnosti probiotických přípravků**. Zdá se, že k potencování účinku probiotik lze použít řadu vhodných komponentů, jako jsou i **polynenasycené mastné kyseliny (PUFA)**. Jejich přítomnost podporuje adhezi probiotických bakterií (např. *Lactobacillus* spp.) na receptory střevní sliznice (4).

Omega-3 PUFA mohou mít pozitivní účinek tím, že při těchto onemocněních změni složení mikrobioty a zvýší produkci protizánětlivých sloučenin, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (acetát, propionát, butyrát). Kromě toho hromadí se důkazy ve studiích na zvířecích modelech naznačují, že souhra mezi střevní mikrobiotou Omega-3 mastnými kyselinami a imunitou, pomáhá udržovat integritu střevní stěny a interaguje s imunitními buňkami hostitele. Nakonec studie na lidech a zvířatech zdůraznily schopnost Omega-3 PUFA ovlivňovat osu střevo – mozek, a to prostřednictvím složení střevní mikrobioty (5).

### Závěr

Současný výzkum naznačuje, že závažnost symptomů funkčních poruch trávení, především IBS lze zmírnit suplementací probiotické směsi laktobacilů a bifidobakterií a to modifikací střevní mikrobioty a nápravou dysbiózy.

Výsledky klinické i in vitro studie naznačují, že vybrané kmeny laktobacilů a bifidobakterií jsou vhodné pro pacienty s funkčními poruchami trávení, jako je IBS i pro celiatiku, pro své antioxidační a protizánětlivé aktivity a úlohu při obnově střevní bariéry.

Navíc vybrané bakteriální kmeny se zaměřují přímo **na symptomy spojené s HIT, neprodukují**

**histamin** a tak jsou vhodné i pro lidi s histaminovou intolerancí (HIT).

Účinek cíleně vybraných 5 probiotických kmenů bakterií lze posílit synergicky působícími polynenasycenými mastnými kyselinami (PUFA) Omega3-EPA a Omega3-DHA, které podporují tvorbu protizánětlivých sloučenin a napomáhají probiotickým bakteriím uchytit se na střevní.

### Reference

- (1) Francavilla R, *et al.* Clinical and Microbiological Effect of a Multispecies Probiotic Supplementation in Celiac Patients With Persistent IBS-type Symptoms: A Randomized, Double-Blind, Placebo-controlled, Multicenter Trial. *J Clin Gastroenterol.* 2019 Mar;53(3):e117-e125.
- (2) Giorgi A, *et al.* A Probiotic Preparation Hydrolyzes Gliadin and Protects Intestinal Cells from the Toxicity of Pro-Inflammatory Peptides. *Nutrients.* 2020 Feb 14;12(2):495.
- (3) Lei S, *et al.* Somatostatin ameliorates lipopolysaccharide-induced tight junction damage via the ERK-MAPK pathway in Caco2 cells. *Eur. J. Cell Biol.* 2014, 93,299-307.
- (4) Bomba A, *et al.* Improvement of the probiotic effect of microorganisms by their combination with maltodextrins, fructo-oligosaccharides and polyunsaturated fatty acids. *Br J Nutr.* 2002 Sep;88 Suppl 1:S95-9.
- (5) Costantini L, Molinari R, Farinon B, Merendino N. Impact of Omega-3 Fatty Acids on the Gut Microbiota. *Int J Mol Sci.* 2017 Dec 7;18(12):2645.