

PROBLÉMY PROBIOTICKÉ TERAPIE

prof. MUDr. Přemysl Frič, DrSc.

Interní klinika 1. LF UK a Ústřední vojenské nemocnice, Praha

Pokroky molekulární biologie významně rozšířily znalosti o vlastnostech probiotik a jejich terapeutických možnostech. V současnosti jsou k dispozici kromě nativních probiotik také probiotika rekombinantní a chimérická. Tato probiotika vytvářejí další terapeutické možnosti, jako jsou *in-situ* syntéza, sekrece a cílená aplikace biologicky aktivních molekul nebo vazba mikrobiálních toxinů na chimérickém lipopolysacharidu saprofytických mikrobů. Experimentální práce však značně předstihly klinické aplikace. V těchto je třeba přejít od obecné koncepce příznivého účinku probiotik k stanovení specifických účinků definovaných probiotických kmenů ve specifických situacích. V současné době jsou probiotické preparáty na trhu převážně jako potravinové doplňky, u nichž není vyžadována terapeutická účinnost. Možnosti probiotické terapie však vyžadují, aby byla vytvořena kritéria pro probiotická léčiva, což umožní další rozvoj této terapie v klinických oborech. V současné době jsou řešeny v souvislosti s probiotickou terapií některé další otázky jako možnost přenosu genotoxických a cytotoxických substancí, genů antibiotické rezistence, aplikace v neonatálním a perinatálním období nebo u imunosuprimovaných a polymorbidních jedinců. Výsledky těchto studií umožní využít potenciál probiotické terapie při zachování vysokého stupně její bezpečnosti.

Klíčová slova: probiotika, experimentální studie, klinické aplikace, nové otázky.

PROBLEMS OF PROBIOTIC THERAPY

Molecular biology significantly increased our knowledge of the properties of probiotics and their therapeutic potential. At present not only native but also recombinant and chimeric probiotics are available. These new generations of probiotics enable additional applications: *in-situ* synthesis, secretion and targeted administration of biological molecules as well as binding of microbial toxins by chimeric lipopolysaccharide of saprophytic microbes. Experimental trials are, however, much ahead of clinical applications. In these studies it is necessary to move from the general concept of suitable effects of probiotics to determination of specific effects of defined probiotic strains in specific situations. Probiotics are mostly marketed as nutritional supplements in which a therapeutic effect is not requested. Nevertheless, future development of probiotic therapy requires establishing of registration criteria for probiotic drugs. At present additional problems are investigated in connection with probiotic therapy. They include: transfer of genotoxic and cytotoxic substances, genes of antibiotic resistance, application in neonatal and perinatal life period, as well as in polymorbid and immunocompromised individuals. The results of these studies will hopefully enable to exploit the potential of probiotic therapy with simultaneous preservation of its high security.

Key words: probiotics, experimental studies, clinical application, new questions.

Interní Med. 2008; 10 (7 a 8): 345–347

Mikrobiální interferenční terapie

I. I. Mečnikov formuloval před více než 100 roky koncepci mikrobiální interferenční terapie. Jejím principem je podávání živých mikroorganismů převážně lidského původu (probiotik) s cílem využít jejich vlastností ke změně a stabilizaci střevní mikroflóry s následným příznivým účinkem na zdravotní stav hostitele, včetně předcházení některých chorob nebo zlepšení jejich průběhu. Tato koncepce byla v minulosti opakovaně zpochybňována a marginalizována. Od poloviny devadesátých let minulého století jsou však probiotika znovu předmětem rostoucího zájmu. Ten souvisí s koncepcí tzv. gastrointestinálního ekosystému, tj. vysoce integrovaného celku, který zahrnuje střevní mikroflóru, střevní epitel a slizniční imunitní systém. Složitá interakce těchto tří složek jsou předpokladem úplné morfologické a funkční vyzrálosti trávicí trubice. Metody molekulární mikrobiologie, imunologie, genetiky a biochemie umožnily experimentální studie, které podstatně rozšířily dosavadní znalosti o vlastnostech a funkcích probiotik (tabulka 1).

Tři generace probiotik

Tyto poznatky byly vesměs získány s přirozenými (nativními) probiotiky, která můžeme označit za probiotika první generace. V současnosti však

byla připravena metodami genetického inženýrství probiotika rekombinantní a tzv. chimérická (probiotika druhé a třetí generace).

Rekombinantní probiotika s dobrou adhezí ke střevnímu epitelu, *in-situ* syntézou, sekrecí a cílenou aplikací biologicky aktivních molekul představují další terapeutické možnosti. Experimentálně bylo takto připraveno již několik probiotik. *Lactococcus lactis* je schopen syntetizovat a secernovat interleukin-10 po odstranění genu thymidilátsyntázy a jeho náhradě syntetickou sekvencí kodující úplný lidský IL-10 (23). Toto probiotikum bylo použito s úspěchem v pilotní klinické studii u nemocných s Crohnovou chorobou (4). Rekombinantní *Streptococcus gordonii* s fragmentem

genomu cyanobakterie produkuje HIV-inhibiční protein (cyanovirin-N) (9). Modifikovaný *Lactobacillus jensenii* izolovaný z poševního hlenu secernuje CD4, který inhibuje vstup HIV do cílových buněk v závislosti na dávce (12). Rekombinantní *Escherichia coli* Nissle 1917 je schopna inhibitor fuzního peptidu HIV syntetizovat a secernovat na slizničním povrchu (20). Další rekombinantní probiotika (*Streptococcus gordonii* a *Lactobacillus zeae*) lze použít jako nosiče protilátek (3, 13) nebo vakcín (*Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*) (6, 10).

Konstrukce chimérických probiotik je založena na podobnosti povrchových glykoproteinů gramnegativních mikrobů a střevních epitelů. Ke genetické úpravě mikrobiálního povrchu byl zvolen saprofytický kmen *Escherichia coli* (CWG 308). Do jeho genomu byly přeneseny z genomu *Campylobacter jejuni*, *Neisseria gonorrhoeae* nebo *N. meningitidis* specifické glykosyltransferázy. Lipopolysacharid *E. coli* slouží jako kostra pro modifikaci cukerné složky napodobující gangliosid GM1, který funguje jako receptor pro toxiny na střevní epitelii (molekulární mimikry). Tuto funkci plní geny *Campylobacteru*. Kmeny *Neisserie* kodují enzym, který připojuje GM1 ke zkrácené verzi lipopolysacharidu exprimované hostitelským kmenem *E. coli*. Tím je vytvořen tzv. chimérický lipopolysacharid.

Tabulka 1. Vlastnosti a funkce probiotik

- kompetice s patogenními mikroby v adhezii na střevní epitelii a potenciace imunitních odpovědí na patogeny
- tvorba peptidů s bakteriostatickými a baktericidními účinky (mikrociny, koliciny)
- regulace funkcí střevní bariéry a mikrobiální translokace
- modulace funkcí střevních epitelů a vyzrávání slizničního imunitního systému
- inhibice přerůstání patogenů
- stimulace eliminace toxinů
- tvorba steroidů z cholesterolu
- ovlivnění střevních funkcí (vstřebávání, motilita, splanchnická cirkulace, tvorba a sekrece hlenu)

Tabulka 2. Probiotika – klinické aplikace

- idiopatické střevní záněty (proktokolitida, pouchitida, Crohnova nemoc)
- bakteriální a virové enterokolitidy
- postantibiotické enterokolitidy
- syndrom dráždivého střeva
- symptomatická nekomplikovaná divertikulární nemoc tračníku
- jaterní choroby
- akutní pankreatitida
- prevence a terapie infekce *H. pylori*
- intolerance laktózy
- alergická a atopická onemocnění
- urologická onemocnění
- gynekologická onemocnění
- prevence pooperačních septických komplikací

Exogenní glykosyltransferázy jsou v takto změněné *E. coli* aktivní a modifikovaný lipopolysacharid je schopen vázat mikrobiální toxin. To bylo prokázáno pro termolabilní toxin enterotoxigenní *Escherichia coli* (19) a toxin *V. cholerae* (8).

Klinické aplikace probiotik

Experimentální práce odkrývají nové možnosti pro aplikaci probiotik. Dosavadní klinické práce jsou rovněž četné a zasahují do řady klinických oborů (tabulka 2). Volba probiotika je však v těchto klinických aplikacích většinou pojata příliš obecně. Je proto třeba přejít od obecné koncepce příznivého působení probiotik ke stanovení specifických účinků definovaných probiotických kmenů ve specifických situacích. Potřebujeme znát optimální probiotikum pro daného pacienta a fázi jeho choroby, dávkování, způsob a dobu aplikace. Tyto požadavky mohou splnit z větší části kontrolované klinické studie. Na druhé straně však potřebujeme analýzy genomu dalších probiotik, neboť na tomto podkladě lze usuzovat na jejich terapeutické možnosti.

V současné době je dostupná řada probiotických a prebiotických preparátů a jejich kombinací. Tyto preparáty obsahují pouze jeden kmen (jednosložkové) nebo několik (2–9, vícenosložkové). Interakce jednotlivých kmenů ve vícenosložkových preparátech jsou však dosud ve velké míře neznámé. Kombinace některých kmenů laktobacilů a bifidobakterií může zlepšovat podmínky pro adhezi probiotik na střevní hlen (5). Nelze však vyloučit, že některé interakce mohou být naopak kompetitivní, a proto je oprávněný požadavek detailní definice jednotlivých kmenů ve vícenosložkových preparátech.

Naprostá většina probiotických preparátů je uváděna do prodeje jako potravinové doplňky, u nichž není požadován doklad terapeutické účinnosti. Současná situace je nepřehledná pro lékaře, lékárníky i nemocné, ale přináší značné finanční úspory spojené s registrací léčiv. Stav probiotické terapie však vyžaduje, aby byla vytvořena kritéria pro probiotická léčiva (terapeutická účinnost doložená

stanoveným počtem kontrolovaných klinických studií, dodržení podmínek dobré výrobní praxe, označení probiotik podle mezinárodní nomenklatury, koncentrace vyjádřená počtem kolonií (CFU) v aplikační jednotce). Výrobci kvalitních probiotických přípravků by měli uvážit, zda tato cesta není pro ně z hlediska dlouhodobější perspektivy výhodnější než současný stav. Měli by proto spolu s odbornými společnostmi a pracovišti podporovat kontrolované klinické studie, které jsou nezbytné pro další rozvoj probiotické terapie v klinických oborech.

Nové otázky kolem probiotik

Nerovnoměrnost v dosaženém stupni vývoje experimentálních poznatků a klinických aplikací se v poslední době komplikuje některými dalšími otázkami, které vyžadují interdisciplinární spolupráci. Patří k nim:

Přenos genotoxických a cytotoxických substancí

Nougayrede et al. (18) zjistili, že některé kmeny *Escherichia coli* (tzv. cluster B2), k nimž patří také probiotikum *E. coli* Nissle 1917, jsou schopny syntetizovat polyketidy a neribosomální peptidy. Tyto substance působí v tkáňových kulturách živočišných a lidských buněk genotoxické a cytotoxické změny. Dochází k útlumu buněčného cyklu a zmnožení buněčných elementů. Současně se indukuje nestabilita DNA, která může podporovat apoptózu a buněčnou smrt. Zpomalení buněčné obnovy umožňuje mikrobům delší adhezi na epitelie a delší pobyt ve střevě. Tyto účinky byly však pozorovány jen při vyšších koncentracích těchto substancí, než přichází v úvahu *in vivo* a pouze v tkáňových kulturách vysoce maligních buněčných linií, které jsou ve stavu permanentního mitotického dělení. Úvaha, že mikroby produkující polyketidy a neribosomální peptidy mohou být dispozičním faktorem vzniku kolorektálního karcinomu (11), se proto jeví jako zajímavá, ale nedostatečně podložená a předčasná.

Rezervoáry genů antibiotické rezistence

Některé kmeny laktobacilů a bifidobakterií obsahují vlastní i získané geny antibiotické rezistence lokalizované na mikrobiálním chromozómu a výjimečně na plazmidu (1, 2). Takové geny byly identifikovány např. v *Lactobacillus johnsonii*, *Bifidobacterium thermophilum* a *Lactococcus lactis* (24). Tyto geny mohou být přeneseny na patogeny a komenzální mikroby během výroby potravin a při pasáži trávicí trubici (7). Jejich přenos může znamenat překážku v léčení infekčních chorob. Závažnost této skutečnosti je třeba ověřit v klinických studiích. Zároveň však znovu získává na významu znalost genomu probiotických mikrobů.

Neonatální a perinatální období života

Složení střevní mikroflóry závisí na metodě porodu, výživě, podání antibiotik matce a kojenci. Neonatální období je kritické pro vývoj mikroflóry a její změny vyvolané podáním probiotik a prebiotik mohou dlouhodobě ovlivnit expresi mikrobiálních genů. Výsledky cílené aplikace těchto prostředků v neonatálním a perinatálním období jsou podle řady prací povzbudivé zejména v prevenci alergických a atopických chorob. Stále jsme však ve fázi získávání poznatků a je třeba varovat před neuváženou manipulací střevní mikroflórou v těchto časných obdobích života (16, 17).

Nemocní imunosuprimovaní a s významnou komorbiditou

Probiotika jsou nepatogenní komenzální mikroorganizmy a významné nežádoucí účinky jsou při jejich terapeutické aplikaci ve srovnání s jinými prostředky vzácné. Tato léčba má v podstatě fyziologický charakter, neboť sleduje dosažení rovnovážného stavu střevní mikroflóry a normalizaci odpovědi slizničního imunitního systému. V léčbě zánětlivých procesů je vhodné využít možnosti dlouhodobého synergizmu antibiotik a probiotik. Antibiotika snižují nebo eliminují patogenní mikroby ve fázi aktivního zánětu a probiotika slouží k udržení remise. Aplikace probiotik předpokládá dostatečně zachovanou funkci střevní bariéry, aby nedocházelo k nadměrné mikrobiální translokaci (např. při již probíhající vysoké aktivním zánětu s celkovou odezvou, léčbě zářením, imunosupresi nebo po recentní chirurgii dutiny ústní či trávicí trubice). V těchto situacích je nutno připustit možnost sekundární infekce ložiskové (jaterní absces, endokarditida) nebo celkové (sepsy). Opatrnost se doporučuje také při protrahovaném podávání *Saccharomyces boulardii* nemocným polymorbidním, imunosuprimovaným nebo v kritickém stavu (14, 15, 21). Naproti tomu nebyl zjištěn při dodržení uvedených doporučení zvýšený výskyt bakteriemi v důsledku častější aplikace *Lactobacillus* GG (22).

Závěr

Léčebné použití probiotik představuje novou metodu biologické terapie. Možnosti vyplývající z experimentálních prací vyžadují ověření v kontrolovaných klinických studiích s pečlivě připraveným protokolem. Obdobný postup je třeba aplikovat v úzké spolupráci s teoretickými obory při řešení otázek, které vyplývají z poznatků poslední doby. Takové postupy umožní využít potenciál probiotické terapie při zachování vysoké bezpečnosti.

prof. MUDr. Přemysl Frič, DrSc.
Interní klinika 1. LF UK a ÚVN
U vojenské nemocnice 1200, 169 02 Praha 6-Střešovice
e-mail: premysl.fric@uvn.cz

Literatura

1. Ammor MS, Flórez AB, Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol* 2007; 24: 559–570.
2. Ammor MS, Flórez AB, van Hoek AH, et al. Molecular characterization of intrinsic and acquired resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* 2008; 14: 6–15.
3. Beninati C, Oggioni MR, Boccanera M, et al. Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotypic in human commensal bacteria. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 1060–1064.
4. Braat H, Rottiers P, Hommes DW, et al. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 754–759.
5. Colado MC, Meriluoto J, Salminen S. Development of new probiotics by strain combinations: is it possible to improve the adhesion to intestinal mucus? *J Dairy Sci* 2007; 90: 2710–2716.
6. Duc le H, Cutting SM. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 1263–1270.
7. Flórez AB, Ammor MS, Mayo B. Identification of tet (M) in two *Lactococcus lactis* strains isolated from a Spanish traditional starter-free cheese made of raw milk and conjugative transfer of tetracycline resistance to lactococci and enterococci. *Int J Food Microbiol* 2008; 31: 189–194.
8. Focareta A, Paton JC, Morona R, et al. A recombinant probiotic for treatment and prevention of cholera. *Gastroenterology* 2006; 130: 1688–1695.
9. Giomarelli B, Provvedi R, Meacci F, et al. The microbicide cyanovirin-N expressed on the surface of commensal bacterium *Streptococcus gordonii* captures HIV-1. *AIDS* 2002; 16: 1351–1356.
10. Grangette C, Müller-Alouf H, Goudercourt D, et al. Mucosal immune responses and protection against tetanus toxin after intranasal immunization with recombinant *Lactobacillus plantarum*. *Infect Immun* 2001; 69: 1547–1553.
11. Hayashi T. Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. *Science* 2006; 313: 772–773.
12. Chang TL, Chang CH, Simpson DA, et al. Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11672–11677.
13. Krüger C, Hu Y, Pan Q, et al. In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 702–706.
14. Lestin F, Pertschy A, Rimek D. Fungemia after oral treatment with *Saccharomyces boulardii* in a patient with multiple co-morbidities. *Dtsch Med Wschr* 2003; 128: 2531–2533.
15. Lherm Z, Monet C, Nougère B, et al. Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients. *Intensive Care Med* 2002; 28: 797–801.
16. Neu J, Douglas-Escobar M, Lopez M. Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr Clin Pract* 2007; 22: 174–182.
17. Neu J. Perinatal and neonatal manipulation of the intestinal microbiome: a note of caution. *Nutr Rev* 2007; 65: 282–285.
18. Nougayrede JP, Homburg S, Taieb F, et al. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science* 2006; 313: 848–851.
19. Paton AW, Morona R, Paton JC. A new biological agent for treatment of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. *Nat Med* 2000; 6: 65–70.
20. Rao S, Hu S, McHugh L, et al. Toward a live microbial microbicide for HIV: Commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11993–11998.
21. Riquelme AJ, Calvo MA, Guzman AM, et al. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after *Saccharomyces boulardii* treatment in immunocompromised patients. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 41–43.
22. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, et al. *Lactobacillus bacteremia* during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1155–1160.
23. Steidler L, Neirynck S, Huyghebaert N, et al. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin-10. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 785–789.
24. van Hoek AH, Mayrhofer S, Domig KJ, et al. Mosaic tetracycline resistance genes and their flanking regions in *Bifidobacterium thermophilum* and *Lactobacillus johnsonii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 248–252.

PŘIPRAVUJEME ...

▶ Chřipka, prevence	◀	▶ Léčba antikoagulancii	◀
▶ Terapie plicní hypertenze	◀	▶ u vředové choroby žaludku	◀
▶ Kryoterapie	◀	▶ Léčba infekce roupy	◀
▶ Pacient s hematurií, léčba	◀	▶ Rizika těhotenství a porodu	◀
▶ Závažnost arytmií ve stáří	◀	▶ Sekundární hypertenze	◀
▶ Akutní infarkt myokardu u pacientů s DM	◀	▶ Jak ulevit pacientům	◀
		▶ od artritické bolesti	◀



VĚDOMOSTNÍ TESTY

již od září
v každém čísle

INTERNÍ MEDICÍNY
pro praxi

TOK INFORMACÍ CÍLENÝCH PŘÍMO PRO VAŠI ORDINACI