
Αρχές θεραπευτικής χορήγησης προβιοτικών – Δεδομένα σε πειραματόζωα

Διονύσιος Σγούρας

Προβιοτικά ή ευβιοτικά βακτήρια καθορίζονται ως «οι ζωντανοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι όταν καταναλώνονται ασκούν ευεργετική επίδραση στην υγεία του ανθρώπου πέραν της εγγενούς επίδρασης της γενικής διατροφής» (Ορισμός της μικτής επιτροπής του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών και του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας, 2001). Είναι κυρίως οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria), ειδικότερα γαλακτοβάκιλλοι, εντερόκοκκοι, καθώς επίσης και bifidobacteria και απαντώνται σε μεγάλους πληθυσμούς στα τρόφιμα που έχουν υποστεί ζύμωση. Η πρόσληψη τους γίνεται μέσω της κατανάλωσης κυρίως γαλακτοκομικών προϊόντων και επομένως αυτές οι ομάδες βακτηρίων αποτελούν ταυτόχρονα σημαντικό τμήμα της εντερικής χλωρίδας του ανθρώπου.¹ Βιβλιογραφικά η κατανάλωση προβιοτικών έχει αναφερθεί να επιφέρει ευεργετικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση και πρόληψη διαφόρων διαταραχών ιογενούς, βακτηριδιακής ή μυκητιακής αιτιολογίας του ουροποιητικού και γαστρεντερικού συστήματος όπως κολπίτιδες,^{2,3} διάρροιες,⁴ φλεγμονώδεις εντεροπάθειες,^{5,6} δυσκοιλιότητες⁷ και τροφιμογενείς αλλεργίες.^{8,9} Επίσης υπάρχουν μελέτες αναφορικά με τη χρήση προβιοτικών για την ενδυνάμωση της ανοσολογικής απόκρισης του επιθηλίου,¹⁰ την πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων^{11,12} και καρκίνου.¹³

Εντεταλμένος Ερευνητής, Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας, Ελληνικό Ινστιτούτο Παστέρ

Αναφορικά με τη λοίμωξη από Ελικοβακτήριο του πυλωρού (*Επ*), η έλλειψη εμβολίου και τα αυξανόμενα επίπεδα αποτυχίας της θεραπείας εκρίζωσης κατέδειξαν την ανάγκη για καινούργιες εναλλακτικές θεραπείες. Ειδικότερα η αυξανόμενη αντοχή στα χορηγούμενα αντιβιοτικά, η μειωμένη δραστηριότητα τους στο όξινο pH αλλά και η μη-συμμόρφωση των ασθενών στη θεραπεία οδήγησαν στην αναζήτηση καινούργιων θεραπευτικών σχημάτων. Αρχικές βιβλιογραφικές αναφορές κλινικών μελετών με ευεργετικά αποτελέσματα χορήγησης προβιοτικών σε ασθενείς με *Επ* λοίμωξη,¹⁴ είχαν σαν αποτέλεσμα τη θεώρηση ότι τα προβιοτικά θα μπορούσαν να συνεισφέρουν θετικά στην αντιμετώπιση της *Επ* λοίμωξης.¹⁵ Το Εργαστήριο Ιατρικής Μικροβιολογίας του Ελληνικού Ινστιτούτου Παστέρ διεξήγαγε ερευνητικές μελέτες για τη διαλεύκανση των μηχανισμών με τους οποίους τα προβιοτικά μπορούν να συνεισφέρουν στην αντιμετώπιση της *Επ* λοίμωξης μέσω δύο ερευνητικών προγραμμάτων. Το πρώτο χρηματοδοτήθηκε από το Υπουργείο Ανάπτυξης (Πρόγραμμα 97Διατροφο-26, ΓΓΕΤ 1999-2001) με θέμα την «Ανάπτυξη νέου τύπου γιαούρτης με προβιοτικές ιδιότητες - Μελέτη της επίδρασης στην υγεία» και το δεύτερο από το 5^ο Πλαίσιο Ευρωπαϊκής Έρευνας (Πρόγραμμα PROPATH, EU-FP5 2001-4) με θέμα «*Molecular analysis and mechanistic elucidation of the functionality of probiotics and prebiotics in the inhibition of pathogenic microorganisms to combat GI disorders and to improve human health*». Στα εν λόγω προγράμματα μελετήθηκε η βιολογική βάση της επίπτωσης των προβιοτικών στην *Επ* λοίμωξη με χρήση (α) *In vitro* συστημάτων πειραματικής λοίμωξης καλλιιεργειών γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων με *Επ* και (β) *In vivo* συστημάτων πειραματικής λοίμωξης με *Επ* σε πειραματόζωα. Ειδικότερα με χρήση *in vitro* συστημάτων, μελετήθηκε η ενδεχόμενη αναστολή της προσκόλλησης του *Επ* στα γαστρικά επιθηλιακά κύτταρα παρουσία προβιοτικών, η πιθανή έκκριση από τα προβιοτικά βακτηριοσινών με αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι του *Επ* και η επίπτωσή τους στο σύστημα ουρεάσης του *Επ* που αποτελεί ζωτικό επιβιωτικό παράγοντα του βακτηρίου για την εγκατάσταση της λοίμωξης. Αντίστοιχα, στα *in vivo* πειράματα με χρήση πειραματόζων, μελετήθηκε η επίπτωση της συνεχούς χορήγησης προβιοτικών στον αποικισμό και τη συνοδό γαστρίτιδα. Στα εν λόγω πειράματα μελετήθηκαν διάφορα προβιοτικά στελέχη οξυγαλακτικών βακτηρίων που χρησιμοποιούνται σε εμπορικά διατροφικά σκευάσματα (επιδόρπια) όπως οι *L. casei* Shirota (Yakult), *L. johnsonii* La1 (LC1), *L. rhamnosus* GG (Gefilus), αλλά και προβιοτικά που απομονώθηκαν από γαλακτοκομικά παραδοσιακά προϊόντα, όπως οι *L. acidophilus* IBB801, *L. amylovorus* DCE471, *L. plantarum* ACA-DC 287 και *S. macedonicus* (ACA-DC198). Συνοπτικά, τα αποτελέσματα των μελετών με *in vitro* συστήματα κατέδειξαν ότι τα εν λόγω προβιοτικά, παρουσίασαν ανασταλτική δράση έναντι του *Επ* χωρίς όμως να διαφαίνεται επίπτωση στην ικανότητα προσκόλλησης του *Επ* στο γαστρικό επιθήλιο, ούτε δράση αντιμικροβιακών βακτηριοσινών. Αντίθετα, παρατηρήθηκε ισχυρή αναστολή του συστήματος ουρεάσης του *Επ* από τη δράση του γαλακτικού οξέος,¹⁶ που αποτελεί το κύριο μεταβολικό προϊόν των οξυγαλακτικών βακτηρίων. Η παρατήρηση αυτή είναι

ιδιαίτερης σημασίας λόγω του γεγονότος ότι η πλειονότητα των κλινικών μελετών που καταδεικνύουν ευεργετική επίπτωση της χορήγησης προβιοτικών στην *Επ* λοίμωξη, έχουν διεξαχθεί με τη χρήση της δοκιμασίας αναπνοής ουρίας και επομένως θέτει υπό αμφιβολία αυτά τα αποτελέσματα.

Πειραματικά συστήματα για τη μελέτη της *Επ* λοίμωξης σε πειραματόζωα έχουν αναπτυχθεί σε ποντίκια, γερβίλλους Μογγολίας, γάτες και πιθήκους. Ιδιαίτερα δημοφιλές μοντέλο αποδείχθηκε αυτό που αναπτύχθηκε σε ποντίκια C57BL6 μετά από επιμόλυσή τους με το στέλεχος *Επ* SS1 (*H. pylori* Sydney Strain 1)¹⁷ και το οποίο χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον για τη μελέτη της επίπτωσης των πειραματικών εμβολίων και τη διαλεύκανση της ανοσολογίας της λοίμωξης. Ειδικότερα, αναφορικά με την επίπτωση των προβιοτικών, αρχικές μελέτες σε ποντίκια επιμολυσμένα με *Επ*, έδειξαν ότι η χορήγηση προβιοτικών μπορεί να αναστείλει τον αποικισμό του *Επ*¹⁸⁻²¹ (Πίνακας 1).

Μειονέκτημα των εν λόγω μελετών ήταν το γεγονός ότι τα ζωικά μοντέλα *Επ* λοίμωξης που χρησιμοποιήθηκαν δεν ήταν αναπαραγωγίμα, αναφορικά με, πρώτον, την ικανότητα των στελεχών *Επ* να εποικίζουν επιτυχώς και για ικανό χρονικό διάστημα το γαστρικό βλεννογόνο των πειραματοζώων και δεύτερον, την ιστοπαθολογική αξιολόγηση της βαρύτητας και της δραστηριότητας της συνοδού γαστρίτιδας. Αντίθετα η χρήση του ζωικού μοντέλου *Επ* λοίμωξης SS1¹⁷ έδωσε τη δυνατότητα για λεπτομερή και επαναλήψιμη αξιολόγηση του βαθμού αποικισμού του *Επ* στο γαστρικό βλεννογόνο και των ιστοπαθολογικών αλλοιώσεων στο χόριο. Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έδειξαν, πέραν αμφιβολίας ότι η χορήγηση προβιοτικών βακτηρίων σε εγκατεστημένη *Επ* λοίμωξη δεν οδηγεί σε εκρίζωση του *Επ*.^{20,22,23} Παρόμοια αποτελέσματα είχαν μελέτες χορήγησης του εμπορικού σκευάσματος Lasidofil (μίγμα γαλακτοβακίλλων *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*) σε γερβίλλους Μογγολίας με ήδη εγκατεστημένη *Επ* λοίμωξη.²⁴ Το σημαντικότερο όμως, αποτέλεσμα όλων των ανωτέρω μελετών, ήταν η σαφής μείωση της βαρύτητας και δραστηριότητας της συνοδού γαστρίτιδας στις ομάδες των πειραματοζώων στις οποίες χορηγήθηκαν προβιοτικά, με ιδιαίτερα αισθητή την απουσία της διήθησης ουδετεροφίλων στο χόριο. Περαιτέρω μελέτη του μηχανισμού της ύφεσης της ουδετεροφιλικής διήθησης έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων MIP-2 και GroA/KC στο γαστρικό βλεννογόνο των πειραματοζώων,²³ παραγόντων που είναι υπεύθυνοι για τη χημειοταξία των ουδετεροφίλων στα ποντίκια, με δράση ανάλογη της Ιντερλευκίνης-8 στον άνθρωπο. Στην ίδια μελέτη, παρόμοια αναστολή της έκκρισης Ιντερλευκίνης-8 παρατηρήθηκε μετά από *in vitro* επιμόλυνση με *Επ* ανθρωπίνων γαστρικών επιθηλιακών κυττάρων, παρουσία υπερκειμένων από καλλιέργειες *L. casei* Shirota (Yakult), *L. johnsonii* La1 (LC1) και *L. amylovorus* DCE471.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι ο μηχανισμός δράσης των συγκεκριμένων προβιοτικών είναι ανοσολογικής φύσεως και ενδεχομένως συναρτάται με τους μηχανισμούς κυτταρικής χημειοταξίας, στρέφοντας την ανοσολογική απόκριση

Πίνακας 1. Μελέτες χορήγησης προβιοτικών σε πειραματόζωα με *Επ* λοίμωξη.

Πειραματόζωο	Στέλεχος <i>Επ</i>	Χορηγθέν Προβιοτικό	Αποτελέσματα	Βιβλιογραφία
BAL/c ποντίκια	<i>H. pylori</i> N112, N135, NCTC 11637	<i>L. salivarius</i>	Αναστολή αποικισμού μόνο στα ποντίκια που χορηγήθηκε <i>L. salivarius</i>	Kabir, 1997
Germ free BALB/c ποντίκια	<i>H. pylori</i> N130	<i>L. salivarius</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. acidophilus</i>	Αναστολή αποικισμού μόνο στα ποντίκια που χορηγήθηκε <i>L. salivarius</i>	Aiba, 1998
Germ free IQ1 ποντίκια	<i>H. pylori</i> TK 1402	<i>Clostridium butyricum</i>	Αναστολή <i>Επ</i> αποικισμού	Takahasi, 2000
BALB/c ποντίκια	<i>H. felis</i>	<i>L. acidophilus</i> LB Sup	Αναστολή αποικισμού <i>H. felis</i> , απουσία ιστολογικών αλλοιώσεων	Coconnier, 2003
Germ free BALB/c ποντίκια	Κλινικά στελέχη	<i>L. gasseri</i>	Μείωση <i>Επ</i> αποικισμού	Ushiyama, 2003
SPF C57BL/6	<i>H. pylori</i> SS1	<i>L. casei</i> strain Shirota	Μείωση <i>Επ</i> αποικισμού και σημαντική ύφεση συνόδου γαστρίτιδας	Sgouras, 2004
SPF C57BL/6	<i>H. pylori</i> SS1	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i>	Μείωση <i>Επ</i> αποικισμού και συνόδου γαστρίτιδας	Johnson – Henry, 2004
SPF C57BL/6	<i>H. pylori</i> SS1	<i>L. johnsonii</i> La1 (LC1), <i>L. acidophilus</i> IBB801, <i>L. amylovorus</i> DCE471	Σημαντική ύφεση συνόδου γαστρίτιδας	Sgouras, 2005
Gerbils	Clinical strain	Lasidofil (<i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i>)	Σημαντική ύφεση <i>Επ</i> αποικισμού και συνόδου γαστρίτιδας	Brzozowski, 2006

του οργανισμού σε Th-2. Επιπλέον, στις μελέτες μας διαπιστώσαμε ότι η συνεχής χορήγηση προβιοτικών είχε σαν αποτέλεσμα την στατιστικά σημαντική μείωση των IgG αντισωμάτων έναντι του *Επ*, ανεξαρτήτως του χορηγηθέντος προβιοτικού,¹⁶ γεγονός που υποδηλώνει ότι τα προβιοτικά ενδεχομένως να επιδρούν και στο επίπεδο της αντιγονικής αναγνώρισης ή/και της χυμικής ανοσοαπόκρισης. Τέλος, στη μελέτη των Brzozowski και συν.²⁴ η χορήγηση Lasidofil είχε σαν αποτέλεσμα την υποστροφή των ιστοπαθολογικών και βιοχημικών εκδηλώσεων της *Επ* λοίμωξης στα πειραματόζωα στα οποία είχε παρατηρηθεί αναγεννητική υπερπλασία των αδενίων, αναστολή των γαστρικών εκκρίσεων, αύξηση των επιπέδων απόπτωσης με υπερέκφραση κυκλοοξυγενάσης-2 και του Bax-2 γονιδίου, και υπερέκκριση γαστρίνης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι και άλλης φύσεως μηχανισμοί που καθορίζουν τα επίπεδα απόπτωσης και πολλαπλασιασμού στο γαστρικό επιθήλιο, μπορούν να επηρεασθούν από την χρόνια κατανάλωση προβιοτικών.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από τη χορήγηση προβιοτικών σκευασμάτων σε πειραματόζωα με εγκατεστημένη την *Επ* λοίμωξη συγκλίνουν στο γεγονός ότι, ενώ δεν συντελούν σημαντικά στην εκρίζωση του *Επ*, μπορούν να μειώσουν δραστικά τα επίπεδα της συνοδού γαστρίτιδας, τόσο όσον αφορά τη βαρύτητα αλλά και τη δραστηριότητα των φαινομένων. Τα δεδομένα αυτά υποστηρίζονται πλέον και από τα αποτελέσματα κλινικών μελετών χορήγησης προβιοτικών παρουσία σχημάτων εκρίζωσης, στις οποίες παρατηρείται μείωση της συνοδού γαστρίτιδας αλλά και των επιπλοκών του θεραπευτικού σχήματος και αύξηση της συμμόρφωσης των ασθενών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Guarner F. Enteric flora in health and disease. *Digestion* 2006;73(Suppl 1):5-12.
2. Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* 2001;73:437S-443S.
3. Reid G, Burton J, Devillard E. The rationale for probiotics in female urogenital healthcare. *MedGenMed* 2004;649.
4. Johnston BC, Supina AL, Ospina M, Vohra S. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD004827.
5. Rufo PA, Bousvaros A. Current therapy of inflammatory bowel disease in children. *Paediatr Drugs* 2006;8:279-302.
6. Mitsuyama K, Sata M. Gut microflora: a new target for therapeutic approaches in inflammatory bowel disease. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:301-312.
7. Pare P, Bridges R, Champion MC, et al. Recommendations on chronic constipation (including constipation associated with irritable bowel syndrome) treatment. *Can J Gastroenterol* 2007;21(Suppl B):3B-22B.

8. Bischoff S, Crowe SE. Food allergy and the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2004;20:156-161.
9. Bischoff SC. Food allergies. *Curr Gastroenterol Rep* 2006;8:374-382.
10. Gill H, Prasad J. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. *Adv Exp Med Biol* 2008;606:423-454.
11. Naruszewicz M, Johansson ML, Zapolska-Downar D, Bukowska H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am J Clin Nutr* 2002;76:1249-1255.
12. Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 2006;40:235-243.
13. de Moreno de LeBlanc, A, Matar C, Perdigon G. The application of probiotics in cancer. *Br J Nutr* 2007;98(Suppl 1):S105-110.
14. Michetti P, Dorta G, Wiesel PH, et al. Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsonii) La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 1999;60:203-209.
15. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain C, et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht 2-2000 Consensus Report. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:167-180.
16. Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, et al. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:518-526.
17. Lee A, O'Rourke J, De Ungria MC, Robertson B, Daskalopoulos G, Dixon MF. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 1997;112:1386-1397.
18. Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 1997;41:49-55.
19. Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, Koga Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998;93:2097-2101.
20. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Kamiya S. Studies of the effect of *Clostridium butyricum* on *Helicobacter pylori* in several test models including gnotobiotic mice. *J Med Microbiol* 2000;49:635-642.
21. Ushiyama A, Tanaka K, Aiba Y, et al. *Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2003;18:986-991.
22. Johnson-Henry KC, Mitchell DJ, Avitzur Y, et al. Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Dig Dis Sci* 2004;49:1095-1102.
23. Sgouras DN, Panayotopoulou EG, Martinez-Gonzalez B, Petraki K, Michopoulos S, Mentis A. *Lactobacillus johnsonii* La1 attenuates *Helicobacter pylori*-associated gastritis and reduces levels of proinflammatory chemokines in C57BL/6 mice. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:1378-1386.
24. Brzozowski T, Konturek PC, Mierzwa M, et al. Effect of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis, and functional gastric mucosal impairment in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Helicobacter* 2006;11:10-20.