

Immunomodulacyjne i przeciwalergiczne działanie probiotyków

W ostatnich kilkunastu latach lawinowo rośnie liczba badań i publikacji na temat probiotyków i prebiotyków. Zdecydowana większość z nich przedstawia korzystne ich działanie w ostrych i przewlekłych stanach zapalnych przewodu pokarmowego, a zwłaszcza biegunkach rotawirusowych (RV) i poantybiotykowych. W ślad za nimi systematycznie na rynku pojawiają się nowe probiotyczne produkty farmaceutyczne i spożywcze zawierające probiotyki. Znacznie mniej badań, szczególnie klinicznych, dotyczy immunomodulacyjnego wpływu probiotyków lub ich roli prewencyjnej i leczniczej w stanach alergicznych lub atopii.

Idealny produkt (preparat) zawierający probiotyk powinien spełniać następujące warunki (kryteria):

- zawierać co najmniej 10^8 żywych bakterii pochodzenia ludzkiego na 1 g preparatu (badania doświadczalne wskazują, że elementy bakterii probiotycznych mogą również być skuteczne),
- wykazywać zdolność adhezyjną do komórek nabłonka jelita i właściwości wzrostowe oraz kolonizować przewód pokarmowy (p.p.) gospodarza,
- wykazywać działanie przeciw drobnoustrojom patogennym,
- musi być bezpieczny i korzystnie oddziaływać na zdrowie człowieka.

Najczęściej stwierdzano pozytywne oddziaływanie następujących drobnoustrojów probiotycznych: *Lactobacilli Bifidobacteriaceae* produkujących kwas mlekowy (Isolauri i wsp., 2001) oraz *Saccharomyces* i niepatogenetycznych szczepów *E. coli*.

Pozytywny wpływ drobnoustrojów probiotycznych zachodzi poprzez (Madaliński i Szajewska, 2004):

- zakwaszanie treści jelita i negatywne oddziaływanie na bakterie chorobotwórcze,
- zapobieganie kolonizacji bakterii chorobotwórczych na drodze konkurencji o receptory komórkowe,
- konkurowanie z innymi drobnoustrojami o substancje odżywcze,
- działanie cytoprotekcyjne, chroniące komórki przewodu pokarmowego (enterocyty, kolonocyty) przed czynnikami agresji,
- modulowanie odporności komórkowej i humoralnej.

Immunologiczne działanie probiotyków wyraża się przede wszystkim wpływem na rozwój i dojrzewanie układu odpornościowego przewodu pokarmowego: GALT (*gut as-*

Marian Krawczyński
em. prof. UM w Poznaniu
b. kierownik I Katedry Pediatrii
i Kliniki Gastroenterologii Dziecięcej
i Chorób Metabolicznych



sociated lymphoid tissue) i MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*). Sterylny u noworodka p.p. początkowo jest kolonizowany przez *E. coli* pochodzenia matczynego, a następnie – *Lactobacilli* (Heavy i Rowland, 1999). U niemowląt karmionych piersią dominuje *Bifidobacterium* (Cukrowska i Czarnowska, 2007). Stopniowo, od 2. roku życia dziecka, kształtuje się złożony ekosystem jelitowy z przewagą bez-tlenowych *Bacteroides*, charakterystyczny dla dorosłych.

Mechanizm korzystnego oddziaływania immunologicznego gatunku *Lactobacilli* polega na modyfikowaniu mikroflory jelitowej przez:

- negatywny wpływ na drobnoustroje patogene,
- ochronę bariery anatomicznej błony śluzowej przez zwiększenie wydzielania śluzu i normalizację przepuszczalności nabłonka jelitowego dla antygenów,
- zwiększenie bariery immunologicznej przez oddziaływanie na komórki dendrytyczne (DC) systemu MALT (Ibnou-Zekri i wsp., 2003, Strus i wsp., 2002). W regulacji cytokin pro- i przeciwzapalnych w wydzielinach błon śluzowych, z ukierunkowaniem na cytokiny Th1 i Th2 (Drakes i wsp., 2004, Christensen i wsp., 2002).

W badaniach doświadczalnych stwierdzono, że komórki dendrytyczne (DC) i komórki nabłonka jelitowego (EC) przy udziale szczepów *Lactobacillus* spp. regulują równowagę komórkową (Th1) i humoralną (Th2) odpowiedzi immunologicznej oraz tolerancję immunologiczną (Th3). *Lactobacilli* znajdujące się w preparatach probiotycznych hamują produkcję cytokin prozapalnych (TNF-alfa, IL-8, IL-12), a pobudzają przeciwzapalnych (IGF-beta, IL-10). Tego rodzaju działanie wykazywały *L. casei* i *L. bulgaricus*, hamujące syntezę TNF-alfa i IL-8 w błonie śluzowej pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna. *L. casei* indukował ponadto syntezę IL-10 (Drakes i wsp., 2004, Hart i wsp., 2004). Spostrzeżenia te potwierdzają możliwość przeciwzapalnego działania probiotyków poprzez modulację immunologiczną.

Zróznicowanie cytokin uwalnianych przez komórki DC stymulowane przez *Lactobacillus* zależy od szczepu probiotyku o właściwościach immunomodulacyjnych. Najprawdopodobniej jest ono uwarunkowane różnicami w budowie ściany komórkowej, zwłaszcza struktur będących ligandami dla receptorów TLR (*toll-like receptor*) (Rakoff-Nahoum i wsp., 2004). Odgrywają one podstawową rolę w aktywacji układu immunologicznego. Istnieją dowody, że *L. casei*

stymuluje syntezę czynnika neutralizującego TNF-alfa poprzez makrofagi, a *L. johnsonii* i *L. acidophilus* – hamują produkcję TNF-alfa, IL-8 i IL-12.

Immunologiczne działanie szczepów *Lactobacillus* jest zmienne. Aktywność immunologiczną *Lactobacilli* spp. wiąże się głównie z wpływem egzopolisacharydów (EPS). Oddziaływanie probiotyków na immunologiczną barierę jelitową zależy nie tylko od rodzaju szczepu bakteryjnego, ale także od dynamiki czynnościowej systemu MALT. Immunoregulacyjne działanie probiotyków zachodzi więc bezpośrednio i pośrednio przez ekosystem jelitowy.

Wpływ bakterii komensalnych (CAMP) i probiotycznych (PAMP) na rozwój układu GALT potwierdzono w badaniach doświadczalnych u zwierząt pozbawionych bakterii jelitowych. Wyrażał się on zwiększoną produkcją przeciwciał sekrecyjnych i krążących w klasie IgA i IgM oraz stymulowaniem nieswoistych mechanizmów odporności, ograniczającym przenikanie antygenów bakteryjnych i pokarmowych przez barierę jelitową (Cukrowska i wsp., 2002). Korzystny wpływ probiotyków *E. coli* Nissle 1917 na aktywność TLR-2 i TLR-4 potwierdzono również na mysim modelu doświadczalnym (Grabig i wsp., 2006).

Badania kliniczne kontrolowane placebo z podwójnie ślepą próbą wykonane przez Viljanena i wsp. (2005) u 230 niemowląt z AZS, w których stosowano *Lactobacil-*

lus GG, w połączeniu z 3 innymi probiotykami, po 1- i 2-miesięcznej obserwacji wykazały korzystne oddziaływanie jedynie w grupie z podwyższonymi IgE. Nie uzyskano tego efektu u dzieci otrzymujących wyłącznie mieszaninę probiotyków. Również w badaniach Rosenfelda i wsp. (2003) warunek podwyższonego poziomu IgE okazał się niezbędny do uzyskania poprawy stanu klinicznego u dzieci z AZS w wieku 1–13 lat otrzymujących dwa probiotyki: *Lactobacillus rhamnosus* 19070-2 i *Lactobacillus reuteri* 122460.

Istnieją także spostrzeżenia o pozytywnych efektach stosowania probiotyków, zwłaszcza *L. rhamnosus* GG i *L. rhamnosus* LC705 w alergii pokarmowej u dzieci, prawdopodobnie w wyniku normalizacji flory jelitowej i przepuszczalności błony śluzowej, co skutkuje zmniejszeniem przenikania antygenów do jelita. W badaniach doświadczalnych wykazano możliwość immunologicznego wpływu nie tylko całej komórki bakterii probiotycznej, ale nawet jej fragmentu lub metabolitu (Kirjavainen i wsp., 2001).

Probiotyki mogą wpływać na komórki immunokompetentne tkanki limfatycznej jelit (działanie bezpośrednie) lub przez zmianę flory jelitowej i degradację antygenów pokarmowych. Zwiększenie produkcji interferonu gamma (IFN-gamma) wskazuje na możliwość mniejszego odczynu zapalnego w atopii. Aktywność IL-12 przez makrofagi może aktywizować komórki Th1.



U dzieci z alergią na mleko krowie z IgE zależnym atopowym zapaleniem skóry (AZS) leczenie probiotycznym szczepem *Lactobacillus* GG przyniosło wzrost IFN-gamma (Pohjavuori i wsp., 2004) i limfocytów Treg oraz zwiększenie sekrecji IL-10, ze współistnieniem hamującego wpływu sekrecyjnego cytokin. *L. casei* aktywował produkcję cytokin przeciwzapalnych IL-12, TNF-alfa, IFN-gamma (Pessi i wsp., 2000) i hamował proalergiczną IL-5. W badaniach doświadczalnych u myszy wykazano, że na potencjalnie szkodliwe alergen, *Lactobacillus casei* Shirota może zwiększać produkcję IgA w kępkach Peyera (Matzuzaki i wsp., 1998).

Podane łącznie *L. casei* i *L. bulgaricus* hamowały nadmierną produkcję prozapalnych TNF-alfa u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna (Borrue i wsp., 2002). Znalezione są również doniesienia (Pena i wsp., 2003), że *Lactobacillus* GG może zmniejszać odczyn zapalny w nieswoistym zapaleniu jelit (*inflammatory bowel disease*, IBD). Mechanizm tego działania polega na stymulacji produkcji cytokin przeciwzapalnych przez komórki prezentujące antygen lub zmniejszaniu produkcji TNF-alfa przez makrofagi.

Korzystny wpływ probiotyków na choroby alergiczne i zapalne wynika z ich wpływu na regulację równowagi pomiędzy cytokinami Th1/Th2.

Działanie profilaktyczne potwierdzono u: *L. rhamnosus* GG, *E. coli* 083.

Działania lecznicze wykazywały:

- w AZS o podłożu atopowym: *L. rhamnosus* 1970-2, *L. reuteri*, *L. fermenticus*, *Bifidobacterium lactis*,
- w zapaleniu nieswoistym jelit: *E. coli* Nissle 1917 (wrzodziejące zapalenie jelita grubego), *Saccharomyces boulardii* (choroba Leśniowskiego-Crohna).

W AZS podstawowe znaczenie ma nieprawidłowa reakcja na antygen zewnętrzny, co wyraża się zaburzeniem mechanizmu regulującego tolerancję (Novak i wsp., 2003). U 3/4 pacjentów obserwowano podwyższenie antygenowości swoistej IgE, rzadziej (1/4 chorych) – pobudzenie prozapalnych limfocytów T oraz zaburzenie regulacyjnej czynności limfocytów Treg. Atopia nasilała procesy immunologiczne na komórkach dendrytycznych.

Bakterie p.p. modulują przede wszystkim rozwój i dojrzewanie układu immunologicznego. Zwiększona początkowo u noworodków aktywność cytokin Th2, uprzednio decydująca o utrzymaniu ciąży, ma zasadnicze znaczenie w patogenezie AZS. Stopniowo następuje ich eliminacja

i regulacja równowagi Th1/Th2 głównie przez bakterie jelitowe i ich składowe, np. lipoproteidy i lipopolisacharydy, które aktywują receptory TLR na enterocytach i komórkach dendrytycznych (DC).

Równowagę cytokinową warunkują limfocyty Treg oraz IL-10 i transformujący czynnik wzrostu TGF-beta.

Ciekawe spostrzeżenia poczynili Björnstein i wsp. (1999) u szwedzkich i estońskich dzieci z AZS przed 2. rokiem życia. Wykazali oni, że w porównaniu z dziećmi zdrowymi ich p.p. był słabiej skolonizowany. Poza tym u niemowląt fińskich, w porównaniu z estońskimi, nastąpił spadek *Bifidobacterium* przy wzroście ilości *Clostridium*. Zmniejszenie liczby *Bifidobacterium* w kale na korzyść *Staphylococcus aureus* u 7-letnich dzieci z objawami alergii zauważyli także Watanabe i wsp. (2003).

Cytowane badania wskazują na **zależność między stanem mikroflory jelitowej a układem odporności**, a tym samym występowaniem chorób alergicznych. Noworodki urodzone z ciąż rozwiązanych cięciem cesarskim wykazywały opóźnioną kolonizację bakteryjną p.p.

W związku z bardziej sterylnymi warunkami wychowania dzieci w krajach rozwiniętych tzw. hipoteza higieniczna tłumaczy również częstsze występowanie chorób alergicznych



nych, w tym astmy – zmniejszoną stymulacją antygenową. Kalliomaki i wsp. (2007) wykazali, że podawanie *Lactobacillus rhamnosus* GG kobietom ciężarnym, pochodzącym z rodzin obciążonych atopią, i ich dzieciom karmionym piersią, zmniejszyło o 50% występowanie AZS i alergicznego zapalenia spojówek. Po 4 latach u dzieci otrzymujących *Lactobacillus* GG częstość występowania AZS była nadal znacznie niższa. Trzeci etap tych długofalowych badań randomizowanych (Kalliomaki i wsp., 2007) kontynuowany u dzieci z rodzin atopowych do siódmego roku życia, z końcowym 73% ich udziałem, wykazał dalsze obniżenie ryzyka występowania AZS (przy dodatnich testach skórnych). Tego efektu nie potwierdzono w alergicznym nieżycie nosa (ANN) i astmie. Podobne korzystne wyniki u dzieci z AZS uzyskali inni autorzy (Taylor i wsp., 2007, Abrahamson i wsp., 2007).

Podobną redukcję ryzyka wystąpienia AZS (wyłącznie) u dzieci do drugiego roku życia z rodzin obciążonych atopią wykazali Kukkonen i wsp. (2007) oraz Moro i wsp. (2006), którzy stosowali probiotyki i galaktooligosacharydy u dzieci w pierwszym półroczu życia. U dzieci z atopowym zapaleniem skóry i cechami atopii podawanie *Lactobacillus rhamnosus* GG w dawce powyżej 10^{10} w innym badaniu (Pessi i wsp., 2000) okazało się również bardzo korzystne, co znalazło wyraz w zwiększonej aktywności IL-10. W badaniach przeprowadzonych u 511 zdrowych dzieci fińskich w wieku 1–6 lat uczęszczających do żłobków i przedszkoli, które otrzymywały *Lactobacillus* GG, zaobserwowano również mniejszą częstość występowania zakażeń górnych dróg oddechowych (Hatakka i wsp., 2001), co sugeruje celowość tego rodzaju profilaktyki.

Ochronne działanie prewencyjne probiotyków w chorobach alergicznych najprawdopodobniej uwarunkowane jest syntezą przeciwciał IgA, stymulowaną przez limfocyty Th1, oraz syntezą transformującego czynnika wzrostu TGF-beta, hamującą produkcję limfocytów Th2.

Mimo wielu badań potwierdzających bezpieczne przeciwwzpalne i immunomodulacyjne działanie probiotyków u człowieka, pojawiają się również sygnały o grupach zwiększonego ryzyka, m.in. wcześniaki i stany zaburzeń odporności (Agostoni i wsp., 2004). Rozwój zakażenia obserwowano na przykład na oddziałach onkologicznych, kardiochirurgicznych i intensywnej terapii (Muszyński i wsp., 2007). Rozwój zakażenia p.p., przy udziale *Lactobacillus rhamnosus* i *Lactobacillus casei* opisali Cannon i wsp. (2005) oraz Salminen i wsp. (2006). W badaniach randomizowanych z podwójnie ślepą próbą kontrolowaną placebo wykazano także wzrost śmiertelności u chorych z ostrym zapaleniem trzustki otrzymujących probiotyki (Besselink i wsp., 2008). Zwraca się również uwagę na możliwość wystąpienia niepożądanych reakcji immunologicznych lub przenoszenia oporności na antybiotyki.

Dotychczasowe spostrzeżenia o pozytywnych efektach działania immunomodulacyjnego i przeciwalergicznego probiotyków wymagają potwierdzenia w kolejnych prawidłowo zaplanowanych badaniach, wykonanych w różnych zespołach badawczych, wyłącznie w odniesieniu do pojedynczego szerepu ze ścisłym określeniem dawkowania.

Podsumowanie i wnioski

Drobnoustroje probiotyczne mają istotny udział w rozwoju i dojrzewaniu układu limfoidalnego jelita (GALT) oraz wykazują pozytywne oddziaływanie w stanach alergii, szczególnie w atopowym zapaleniu skóry (AZS) u dzieci.

Potwierdzonego efektu terapeutycznego lub profilaktycznego jednego szczepu probiotycznego nie można przenosić na inne, dowiedziono bowiem znaczne zróżnicowanie ich oddziaływania immunologicznego. Podobnie, pozytywne wyniki uzyskane u zwierząt nie upoważniają do takiego wnioskowania u ludzi.

