

Właściwości immunomodulacyjne i terapeutyczne drobnoustrojów probiotycznych

Immunomodulatory and therapeutic properties of probiotic microorganisms

ANNA KUŚMIERSKA, MAREK FOL

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki

Drobnoustroje probiotyczne (w większości bakterie) są obecnie przedmiotem szerokiego zainteresowania ze względu na ich coraz szerzej opisywane prozdrowotne właściwości. Przypisuje się im dobroczynny wpływ na organizm gospodarza poprzez oddziaływanie na skład i metabolizm naturalnej flory obecnej w przewodzie pokarmowym. W pracy przedstawiono charakterystykę bakterii probiotycznych z uwzględnieniem warunków, jakie musi spełniać szczep bakteryjny, aby uzyskać miano probiotyku. Opisano również rolę, jaką spełniają probiotyki w odniesieniu do organizmu gospodarza oraz korzystne efekty zdrowotne związane z ich spożywaniem. Podkreślono, iż korzystne właściwości są specyficzne względem poszczególnych szczepów, dlatego bardzo ważny jest dobór odpowiedniego preparatu probiotycznego o dokładnie określonym składzie. Omówiono wpływ mikroorganizmów probiotycznych na układ odpornościowy związany z błonami śluzowymi przewodu pokarmowego (GALT). Poruszono kwestię modulacji głównych szlaków sygnałowych związanych z prawidłowym działaniem komórek układu immunologicznego przez probiotyki. Przedstawiono także szerokie spektrum zastosowania preparatów probiotycznych we współczesnej medycynie. Podkreślono możliwość wykorzystania probiotyków zarówno w profilaktyce jak i w leczeniu wielu schorzeń.

Słowa kluczowe: probiotyki, kryteria bezpieczeństwa, właściwości prozdrowotne

Probiotic microorganisms (in most cases bacteria) are currently the subject of interest because of their broadly described pro-health properties. Their beneficial effects on the host organism result from their influencing the composition and metabolic activity of the natural flora of the gastrointestinal tract. This paper presents the characteristics of probiotic bacteria and the features which a bacterial strain must have to be called a probiotic. The article also describes the role of probiotics in the host organism and the beneficial health effects associated with their consumption. As the beneficial properties are specific to individual strains, it is very important to choose a suitable probiotic preparation with a defined composition. The paper presents the effects of the probiotic microorganisms on the immune system associated with the mucous membranes of the gastrointestinal tract (GALT). It discusses the issue of modulation by probiotics of the main signaling pathways associated with normal functioning of the immune system. A wide range of probiotic products application in modern medicine is also presented. The potential use of probiotics in both prophylaxis and treatment of many diseases is also described.

Key words: probiotics, safety criteria, health effects

© Probl Hig Epidemiol 2014, 95(3): 529-540

www.phie.pl

Nadesłano: 14.06.2014

Zakwalifikowano do druku: 10.09.2014

Adres do korespondencji / Address for correspondence

dr Marek Fol

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Uniwersytet Łódzki

ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź

tel. 42 635 44 71, fax 42 665 58 18, e-mail: marekfol@poczta.onet.pl

Wykaz skrótów

GRAS (*Generally Recognized as Safe*) – szczepy ogólnie uznane za bezpieczne

LAB (*Lactic Acid Bacteria*) – bakterie fermentacji mlekowej

GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*) – tkanka limfatyczna związana z jelitami

Wprowadzenie

W ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój dziedzin nauki związanych z żywieniem. Składniki żywności, które mogą potencjalnie korzystnie wpływać na funkcjonowanie organizmu, wzbudzają duże zainteresowanie na całym świecie. Dobrym

przykładem takiego zainteresowania są fermentowane produkty mleczne w postaci biojogurtów, czy kefirów wzbogaconych w bakterie probiotyczne [1]. Pierwsze obserwacje dotyczące korzystnego wpływu mlecznych produktów fermentowanych na kondycję zdrowotną człowieka poczynił Ilja Miecznikow (pionier badań nad wrodzonymi mechanizmami komórkowymi odpowiedzi immunologicznej) już na samym początku XX wieku. Wskazywał na ewentualny związek między zauważalnie zwiększoną średnią długością czasu życia i kondycją zdrowotną chłopów z terenu Bałkan, a spożywaniem przez nich mleka sfermentowanego pod wpływem bakterii *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [2, 3]. Jednakże odkrycie penicyliny

w końcu lat 20. XX wieku, będącej pierwszym tak długo wyczekiwany, wysoce skutecznym czynnikiem przeciwbakteryjnym, oraz opanowanie technologii jej wytwarzania na szeroką skalę w kolejnych latach, na dziesięciolecie zdeterminowało poszukiwania kolejnych antybiotyków, nie zaś pogłębianie wiedzy na temat prozdrowotnych właściwości określonych drobnoustrojów. Dopiero w 1965 r. Lilly i Stillwell [4] wskrzesili poniekąd ideę Miecznikowa donosząc o 50% intensyfikacji wzrostu *Tetrahymena pyriformis* (pierwotniak z grupy orzęsków) w obecności czynnika wytwarzanego przez inny pierwotniak (*Colpidium campylum*) i używając pojęcia probiotyk dla opisu wytwarzanych przez mikroorganizmy czynników ułatwiających wzrost innym mikroorganizmom. Pojęcie to miało jednak inny kontekst od współcześnie rozumianego, podobnie jak definicja probiotyku zaproponowana przez Sperti'ego [5], przez którą rozumiano ekstrakt tkankowy stymulujący wzrost bakteryjny. Rozumienie probiotyku ewoluowało stopniowo upodabniając się do tego obowiązującego współcześnie. W 1974 r. Parker [6] zaproponował definicję probiotyku rozumianego jako „organizmy i substancje wnoszące swój wkład w zachowanie równowagi mikroflory jelitowej”, a w 1989 r. Fuller [7] zdefiniował to pojęcie jako „suplement pokarmowy zawierający żywe drobnoustroje, który w sposób dobroczynny oddziałuje na gospodarza zwierzęcego poprzez poprawienie jego mikrobiologicznej równowagi jelitowej”. W Stanach Zjednoczonych termin probiotyk nie przyjął się w sposób powszechny i Agencja Żywności i Leków (*Food and Drug Administration, FDA*) zaleciła stosowanie terminu: mikroorganizmy bezpośredniej konsumpcji (*direct-fed microbials, DFM*), rozumianego jako źródło żywych, naturalnie występujących drobnoustrojów, w tym bakterii, grzybów i drożdży [8]. Liczne badania potwierdzają korzystny wpływ drobnoustrojów probiotycznych na zdrowie człowieka, co stało się podstawą do wprowadzenia probiotykoterapii, a więc zastosowania probiotyków – zarówno w profilaktyce, jak i w leczeniu wielu schorzeń. Preparaty probiotyczne wykazują wielokierunkowe działanie, a efekty związane z ich stosowaniem są szeroko wykorzystywane we współczesnej medycynie [9]. Głównym siedliskiem docelowym dla mikroorganizmów probiotycznych przyjmowanych wraz z pożywieniem jest środowisko jelit, co sprawia, że drobnoustroje te mogą wpływać na wiele procesów zachodzących w organizmie gospodarza [10]. Bakterie probiotyczne wywierają znaczny wpływ na skład naturalnej mikroflory jelitowej, z czym wiąże się możliwość ich wykorzystania w leczeniu schorzeń wywołanych zaburzeniem jej równowagi. Przywracanie naturalnego, właściwie funkcjonującego układu endogennej mikroflory jelitowej poprzez spożywanie produktów probiotycznych staje się elementem profilaktyki i leczenia wielu chorób związanych

z układem pokarmowym. Poznanie i zrozumienie mechanizmu działania i właściwości tych pożytecznych drobnoustrojów może ułatwić poszukiwania nowych, alternatywnych sposobów ich zastosowania [1].

W artykule zaprezentowano korzystne właściwości bakterii probiotycznych, decydujące o wykorzystaniu tych drobnoustrojów w celach terapeutycznych. Przedstawiono charakterystykę bakterii probiotycznych, z uwzględnieniem ich roli, właściwości, a także warunków, jakie musi spełniać dany szczep bakteryjny by mógł zostać zaliczony do grupy probiotyków. Omówiono także wpływ probiotyków na układ odpornościowy organizmu, z zaznaczeniem mechanizmów modulowania odpowiedzi immunologicznej i korzyści wynikających z tych procesów dla organizmu gospodarza. Praca zawiera również informacje na temat praktycznego zastosowania szczepów probiotycznych w leczeniu i profilaktyce wielu chorób.

Charakterystyka bakterii probiotycznych

Zrozumienie mechanizmów działania drobnoustrojów probiotycznych i istoty stosowania preparatów opartych na probiotykach w celach terapeutycznych, wymaga wcześniejszego scharakteryzowania drobnoustrojów kryjących się pod nazwą „probiotyk”.

Słowo „probiotyk” wywodzi się od greckiego „pro bios”, co w tłumaczeniu na język polski oznacza „dla życia”. Nazwa ta wskazuje zatem na korzystny wpływ probiotyku na zdrowie, a w konsekwencji także na życie organizmu ludzkiego, czy też zwierzęcego [1, 10, 11]. Aktualna definicja probiotyków, przedstawiona przez FAO i WHO w 2002 roku, określa mianem probiotyku żywe mikroorganizmy, które wywierają korzystny wpływ na organizm gospodarza, po podaniu w odpowiedniej dawce [12]. Najczęściej te pożyteczne właściwości wynikają z zapewnienia prawidłowej równowagi naturalnej mikroflory, która zasiedla przewód pokarmowy człowieka. Drobnoustroje probiotyczne mogą być podawane pacjentowi w postaci preparatów farmaceutycznych, przeważnie jako liofilizaty bakterii o gęstości 10^{10} komórek/gram, bądź w postaci żywności wzbogaconej tymi bakteriami, są to głównie fermentowane produkty mleczne takie jak: biojogurty, kefir czy mleko acydofilne. Najczęściej wymagane jest by liczba żywych drobnoustrojów wynosiła 10^8 komórek na 1 gram produktu spożywczego [11].

Działanie probiotyku może być wzmocnione poprzez podawanie go łącznie z prebiotykiem. Prebiotyk jest to składnik pożywienia niepodlegający strawieniu w przewodzie pokarmowym, pobudzający w sposób selektywny wzrost lub aktywność określonych szczepów jelitowych, wpływając w ten sposób na poprawę stanu zdrowia. Prebiotyki mają zdolność

modyfikowania oddziaływań między potencjalnie patogennymi i niechorobotwórczymi drobnoustrojami, dzięki czemu mogą w sposób korzystny wpływać na równowagę mikroflory jelitowej. Do najbardziej znanych związków o charakterze prebiotyków należą: inulina, oligofruktoza, fruktooligosacharydy, pochodne galaktozy i pochodne β -glukanów. Produkt spożywczy, w skład którego wchodzi zarówno probiotyk jak i prebiotyk nosi nazwę synbiotyku [13].

Użycie określonego mikroorganizmu dla potrzeb probiotykoterapii, poprzedza szereg badań potwierdzających, iż spełnia on kryteria stawiane wobec probiotyku [14]. Najważniejsze z nich zostały przedstawione na ryc. 1.

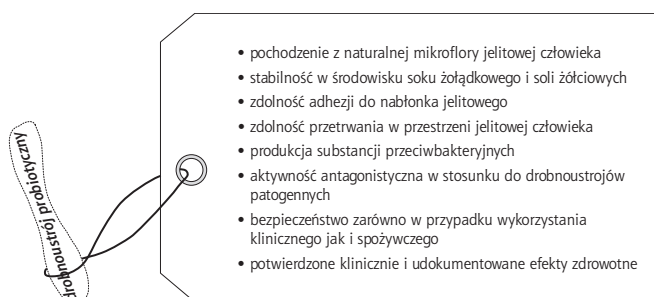
Procedury badań nad mikroorganizmami probiotycznymi zostały dokładnie sprecyzowane przez FAO/WHO. Badania te obejmują trzy etapy: ocenę bezpieczeństwa szczepu, wstępną weryfikację skuteczności podawania szczepu, a także ocenę skuteczności stosowania probiotyków w porównaniu ze standardowym leczeniem. Schemat postępowania w badaniach nad probiotykami zaproponowany przez grupę roboczą FAO/WHO został przedstawiony na ryc. 2. Wykazano, iż korzystne efekty wywołane przez probiotyki są charakterystyczne dla danego szczepu, dlatego uznano za warunek konieczny pełną identyfikację, z określeniem rodzaju i gatunku, każdego mikroorganizmu, który potencjalnie miałby zostać uznany za probiotyczny [12].

Identyfikacja szczepów probiotycznych powinna być przeprowadzana z zastosowaniem metod badawczych powszechnie uznanych na całym świecie. Do metod takich należą: hybrydyzacja DNA-DNA oraz sekwencjonowanie odcinka DNA kodującego 16S rRNA. Wykrycie obecności pozachromosomalnych elementów genetycznych takich, jak plazmidy, może przyczynić się do lepszego poznania i scharakteryzowania danego szczepu. Najczęściej zalecane jest, aby wyniki testów genetycznych zostały także potwierdzone za pomocą metod fenotypowych. Kluczowe wskaźniki fenotypowe, które powinny być zbadane w celu identyfikacji szczepu to: określenie rodzaju fermentowanych cukrów oraz końcowych produktów fermentacji glukozy [15].

Ze względu na kluczowy aspekt, jakim jest bezpieczeństwo stosowania danego produktu, zaleca się, aby drobnoustroje typowane jako probiotyczne, nawet te zaliczane do tzw. grupy Ogólnie Uznawanych za Bezpieczne (GRAS, *Generally Recognized as Safe*), zostały gruntownie przebadane w obszarach takich, jak [12]:

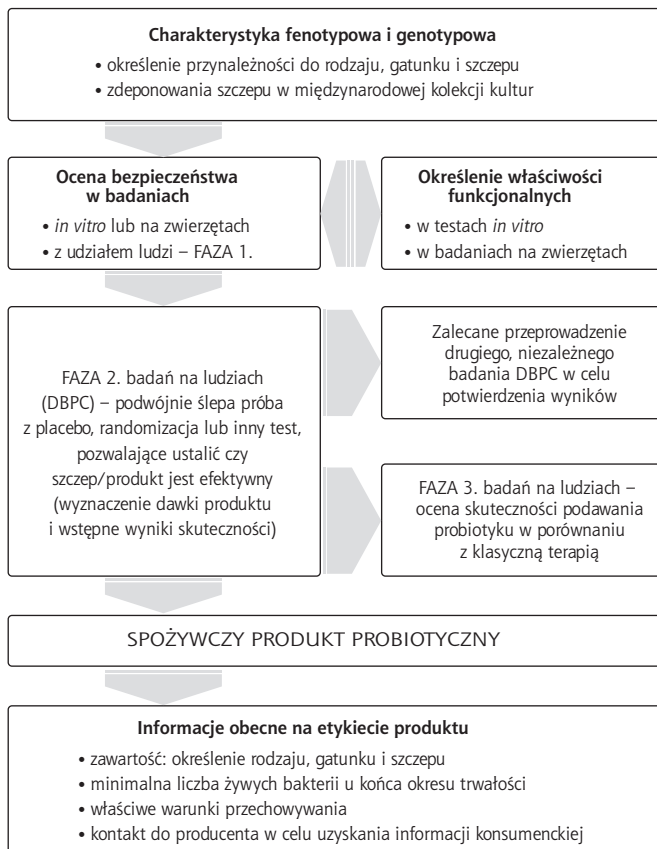
- określenie profilu antybiotykooporności,
- ocena właściwości metabolicznych (między innymi zdolność do syntezy D-mleczanu, dekonjugacji soli żółci),
- określenie skutków ubocznych w badaniach na ludziach,

- nadzór epidemiologiczny nad przypadkami niekorzystnych oddziaływań wśród konsumentów,
- przeprowadzenie badań wykluczających bądź potwierdzających możliwość produkcji toksyn jeśli szczep należy do gatunku wytwarzającego toksyny,
- określenie aktywności hemolitycznej jeżeli szczep należy do gatunku o udowodnionym potencjale hemolitycznym,
- potwierdzenie braku infekcyjności w badaniach przeprowadzanych na zwierzętach immunodefektywnych.



Ryc.1. Cechy charakteryzujące szczep probiotyczny (według [14])

Fig. 1. Characteristic features of probiotic strain [14]



Ryc. 2. Schemat postępowania z probiotykami związany z ustaleniem cech fenotypowych i genotypowych oraz bezpieczeństwa i efektywności ich stosowania (według [11, 12])

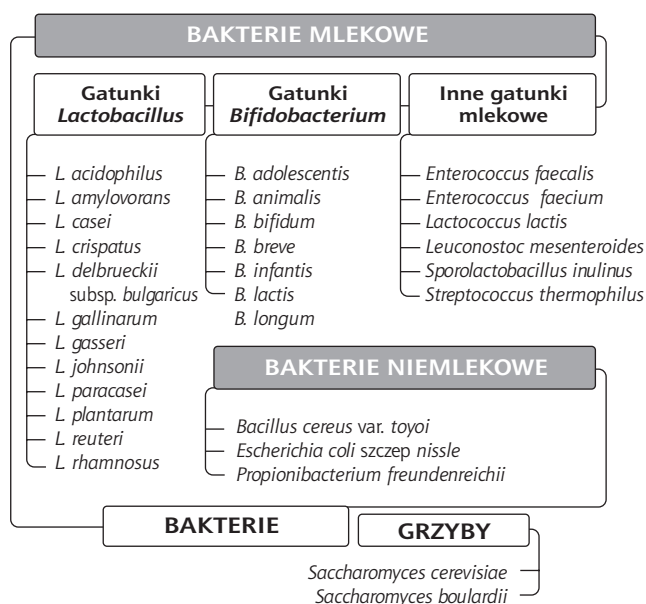
DBPC – *double-blind placebo-controlled*

Fig. 2. Diagram of probiotic use by phenotype and genotype features and safety and efficacy of their use [11,12]

DBPC – *double-blind placebo-controlled*

Uzyskanie wyników wskazujących na brak zdolności infekcyjnych w stosunku do zwierząt z niedoborami odporności jest podstawą do rozpoczęcia badań klinicznych na ludziach. Wykazanie korzystnego wpływu na zdrowie człowieka we wszystkich przeprowadzonych badaniach umożliwia zakwalifikowanie szczepu do grupy mikroorganizmów probiotycznych [11].

Właściwości probiotyczne wykazują głównie bakterie należące do grupy tak zwanych bakterii fermentacji mlekowej (LAB, *Lactic Acid Bacteria*). Jednakże do grupy probiotyków zalicza się również niektóre niepatogenne grzyby drożdżopodobne, takie jak *Saccharomyces cerevisiae*. Spośród bakterii najważniejsze rodzaje to: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* oraz *Streptococcus thermophilus*. Szczepy *Lactobacillus* spp. i *Bifidobacterium* spp. posiadają status GRAS, co oznacza, iż są powszechnie uznane za bezpieczne dla ludzi [16]. Nie wszystkie bakterie mlekowe wywołują jednakowy efekt zdrowotny w organizmie człowieka, gdyż właściwości te są związane z określonym szczepem, a nie z gatunkiem bakterii [11]. Najważniejsze gatunki drobnoustrojów wykorzystywane w preparatach probiotycznych [17] zostały przedstawione na ryc. 3.



Ryc. 3. Drobnoustroje uważane za probiotyczne (według [16, 17])

Fig. 3. Bacteria considered as probiotic [16, 17]

Mikroorganizmy probiotyczne a układ odpornościowy gospodarza

Tkanka limfatyczna związana z błoną śluzową układu pokarmowego (GALT)

Przewód pokarmowy skolonizowany jest przez liczne drobnoustroje komensalne tworzące tzw. mikroflorę, szczególnie obfitą w jelitach. Drobnoustroje te, w większości bakterie, których całkowitą liczbę

szacuje się na 10^{14} komórek, wchodzą w interakcje z błoną śluzową wyścielającą przewód pokarmowy i stanowiącą ważną linię obrony przeciwko patogenom pochodzącym ze środowiska zewnętrznego (bakterie, wirusy, grzyby, pasożyty). Organizm ludzki wykształcił złożony system tkanki limfatycznej związanej ze śluzówką jelita (GALT, *Gut Associated Lymphoid Tissue*), który ma na celu zwalczanie czynników zakaźnych i potencjalnie szkodliwych dostających się do przewodu pokarmowego. Układ ten obejmuje, w kompleksowym ujęciu, zarówno struktury limfatyczne związane bezpośrednio z błoną śluzową jelit, jak również kępki Peyera, grudki chłonne i krezkowe węzły chłonne. Znaczenie układu GALT dla prawidłowego funkcjonowania mechanizmów odpornościowych gospodarza podkreśla fakt, iż na ten właśnie układ przypada ponad 75% komórek limfatycznych całego układu odpornościowego, w tym około 50% limfocytów, a także wytwarzanie w jego obrębie ok. 80% wszystkich immunoglobulin [18], w szczególności przeciwciał klasy IgA, które są wydzielane na powierzchnię błon śluzowych i noszą nazwę wydzielniczych IgA (S-IgA). Przeciwciała te odpowiadają za wychwytywanie antygenów i uniemożliwienie im przejścia przez błony śluzowe do wnętrza organizmu. Odbywająca się w zorganizowanych limfatycznych grudkach chłonnych błony śluzowej jelita związanych z układem GALT, prezentacja antygenów komórkom efektorowym układu odpornościowego kształtuje odpowiedź immunologiczną decydując o wywołaniu reakcji zapalnej bądź tolerancji względem określonego antygeny [18].

Jednymi z najistotniejszych elementów układu GALT są:

- Komórki nabłonkowe, które stanowią naturalną barierę ochronną organizmu przed patogenami i ich antygenami poprzez tworzenie ścisłych połączeń chroniących jelito przed inwazją drobnoustrojów patogennych. Komórki te indukują wytworzenie tolerancyjnego środowiska w przypadku obecności drobnoustrojów komensalnych, natomiast w przypadku reakcji zapalnej skierowanej przeciwko patogenom, pełnią rolę komórek prezentujących antygen aktywujących limfocyty zlokalizowane w blaszce właściwej jelita [13]. Funkcja ochronna enterocytów wzmacniana jest obecnością bakterii probiotycznych skutecznie konkurujących z drobnoustrojami chorobotwórczymi nie tylko o miejsca adhezji do nabłonka jelitowego, ale również o substancje odżywcze [19-21]. Ponadto drobnoustroje probiotyczne wykazują zdolność stymulacji ekspresji i wydzielania mucyny przez komórki kubkowe nabłonka (goblet cells) co dodatkowo wpływa na podniesienie walorów ochronnych komórek nabłonkowych [13].

- Komórki M – występują w kępkach Peyera i nabłonku towarzyszącym grudkom limfatycznym (*follicle-associated epithelium*, FAE) i chociaż stanowią mniej niż 1% wyściółki jelita [22] to przypisuje się im duże znaczenie immunologiczne związane z ich zdolnością do transcytozy mikroorganizmów ze światła jelita do wnętrza organizmu, a także pełnienia roli systemu przetwarzającego i prezentującego oraz zawiadującego dostępnością do innych komórek układu immunologicznego. Transportują makrocząsteczki i mikroorganizmy do komórek efektorowych takich jak: komórki dendrytyczne czy makrofagi obecne w zagłębieniu komórek M [13].
- Kępki Peyera – to wyspecjalizowane limfatyczne grudki chłonne, które są zlokalizowane w ścianie jelita. W obszarze Kępek Peyera znajdują się naiwne limfocyty B, pęcherzykowe komórki dendrytyczne oraz obszary międzygrudkowe z licznymi limfocytami T [18]. W badaniach *in vitro* na modelu mysim wykazano, iż probiotyczny szczep *Lactobacillus casei* wykazuje zdolność regulowania odpowiedzi prozapalnej w kępkach Peyera, chociaż dokładny mechanizm nie jest znany. Stymulacja komórek kępek Peyera skutkowałą nasileniem wytwarzania IL-12 i promowaniem rozwoju limfocytów pomocniczych Th1 [23]. Efekt regulatorowy zależny jest od właściwości konkretnego szczepu probiotycznego bowiem doświadczenia z użyciem *Bifidobacterium breve* wskazują na zdolność tych bakterii do pobudzania rozwoju limfocytów T regulatorowych (Treg) i zmniejszania populacji limfocytów Th17 w kępkach Peyera u myszy z doświadczalnie wywołanym zapaleniem okrężnicy. Szczep ten modulował polaryzację limfocytów T w kierunku Th2 i Treg zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*, łagodząc jednocześnie objawy chorobowe, co prawdopodobnie było następstwem zmian w składzie populacji limfocytów T [24].
- Krezkowe węzły chłonne (MLN, *Mesenteric Lymph Node*) odpowiadają za filtrację limfy, jak również biorą udział w wytwarzaniu przeciwciał, dlatego stanowią ważną linię obrony w zwalczaniu patogenów dostających się do światła jelita [18]. Ponadto węzły te pełnią rolę repozytoriów limfocytów i innych komórek odpornościowych, które zapewniają łączność między komórkami centralnych narządów limfatycznych a światłem jelita. W pewnych schorzeniach dochodzi do rekrutacji limfocytów, w tym limfocytów Treg z krezkowych węzłów chłonnych do nabłonka jelita i błony śluzowej (*lamina propria*). W modelu szczurzym martwiczego zapalenia jelit wykazano, iż szczep *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 oddziałuje na limfocyty Treg, którym przypisuje się szczególną rolę w przebiegu tego schorzenia, gdyż limfocyty

te mogą regulować i osłabiać wszystkie pozostałe subpopulacje limfocytów Th indukując tolerancję na własne antygeny i wyciszając procesy zapalne. Podawanie szczepu probiotycznego noworodkom szczurów skutkowało zwiększeniem odsetka limfocytów Treg CD4⁺Foxp3⁺ krezkowych węzłów chłonnych, przy czym na efekt ten oddziaływał rodzaj diety, i zapobiegało rozwojowi martwiczego zapalenia jelit [25].

Modulacja odpowiedzi immunologicznej w obszarze przewodu pokarmowego i związanego z nim układu GALT odgrywa bardzo ważną rolę, gdyż większość antygenów przedostaje się do wnętrza organizmu ludzkiego przez błonę śluzową przewodu pokarmowego. Sprawne działanie układu immunologicznego na tym poziomie uniemożliwia pokonanie bariery jelitowej i przeniknięcie patogenów do organizmu. Z uwagi na to, iż miejscem docelowym, zasiedlanym przez drobnoustroje probiotyczne w organizmie ludzkim czy też zwierzęcym jest jelito, probiotyki w znaczny sposób stymulują i wspomagają prawidłowe działanie układu GALT. Mikroorganizmy te wpływają zarówno na komórkową jak i humoralną odpowiedź immunologiczną błony śluzowej przewodu pokarmowego. Efekt immunomodulacyjny probiotyków jest specyficzny w zależności od zastosowanego szczepu [26]. Czynniki stymulującymi układ odpornościowy mogą być zarówno całe żywe komórki mikroorganizmów probiotycznych, jak również komponenty wchodzące w skład ich ściany komórkowej, a także niektóre wydzielane przez nie cząsteczki [27].

Modulacja głównych szlaków sygnałowych związanych z prawidłowym działaniem układu odpornościowego przez probiotyki

Probiotyki przyczyniają się do prawidłowego funkcjonowania i różnicowania się podstawowych populacji komórek układu immunologicznego takich, jak: komórki dendrytyczne, makrofagi, limfocyty T, limfocyty B. Drobnoustroje probiotyczne oddziałują wielowymiarowo na procesy zachodzące w obrębie ścieżek sygnałowych w komórkach odpornościowych obecnych w jelitach. Głównymi szlakami sygnałowymi modyfikowanymi przez probiotyki są te, w przebiegu których udział biorą m.in.:

- czynnik transkrypcyjny NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Odgrywa on kluczową rolę w aktywacji odpowiedzi immunologicznej na różnorodne bodźce prowadząc do efektów prozapalnych lub przeciwzapalnych. W przypadku braku bodźców stymulujących, NFκB występuje w postaci nieaktywnej w cytoplazmie, związany z cząsteczką inhibitorową IκB. W skutek działania bodźców prozapalnych aktywowany jest enzym IKK, który fosforyluje

białko IκB, doprowadzając do jego ubiquitynacji i degradacji. W wyniku tego następuje uwolnienie cząsteczki NFκB, która migruje do jądra i wiąże się do specyficznych sekwencji DNA, co skutkuje rozpoczęciem transkrypcji określonych genów. Probiotyki mogą zapobiegać aktywacji NFκB i zmniejszać wydzielanie prozapalnych cytokin poprzez oddziaływanie na różnych etapach szlaku przesyłu sygnału, np. poprzez zahamowanie procesu fosforylacji i ubiquitynacji cząsteczki IκB, modulowanie degradacji IκB przez wytwarzanie reaktywnych form tlenu, które prowadzą do inaktywacji enzymu koniecznego do poliubiquitynacji i degradacji IκB. Niektóre szczepy probiotyczne mogą także stymulować transport podjednostek NFκB do jądra w celu zwiększenia aktywacji transkrypcji określonych genów docelowych [27].

- kinazy MAPK (*mitogen-activated protein kinases*). Zaangażowane są one w regulację odpowiedzi na sygnały docierające do komórki z zewnątrz. Wywierają wpływ na ekspresję genów, podziały, różnicowanie i apoptozę między innymi komórek układu odpornościowego. Jednymi z najważniejszych kinaz należących do grupy kinaz białkowych aktywowanych mitogenami należą: ERK (regulują proliferację i różnicowanie komórek), JNK (kinazy aktywowane stresem, pośredniczące w działaniu czynników stresowych), białka p38 (pośredniczą w działaniu czynników stresowych m.in. cytokin) [27]. Badania przeprowadzone na komórkach nabłonkowych jelit potraktowanych IFN-γ i jednocześnie poddanych działaniu kombinacji szczepów probiotycznych (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*) oraz bakterii komensalnych (*Bacteroides thetaiotaomicron*) wykazały, że kombinacja bakterii probiotycznych i komensalnych wywołuje zmiany w kaskadach sygnałowych szlaku MAPK, w tym trwałą aktywację grupy kinaz ERK i zwiększoną fosforylację białka p38, co zapobiegło zmianom w transporcie jonów indukowanym przez IFN-γ. Niepożądanemu, szkodliwemu oddziaływaniu cytokin prozapalnych (IFN-γ i TNF-α) na komórki nabłonka jelit mogą zapobiegać drobnoustroje probiotyczne, w mniejszym stopniu komensalne, co stwarza perspektywę na ich stosowanie w terapii schorzeń przebiegających z silną reakcją zapalną [28].
- PPAR-γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) – receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów. Jest to jądrowy receptor i czynnik transkrypcyjny, który może regulować procesy zapalne jak również homeostazę w obszarze jelit. Jest miejscem docelowym podlegającym modulacji przez mikroorganizmy probiotyczne. Leczenie za pomocą określonych szczepów probiotycznych lub komensalnych może zwiększyć ekspresję PPAR-γ

oraz pomóc złagodzić stan zapalny związany z wrzodziejącym zapaleniem okrężnicy, co zostało udowodnione w wielu badaniach [27]. Jądrowy czynnik transkrypcyjny PPAR-γ może też ulegać aktywacji na skutek oddziaływania na niego krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFAs, *short chain fatty acids*) powstających w wyniku fermentacji prebiotyków i włókien węglowodanowych prowadzonej przez drobnoustroje mikroflory jelitowej. Można oczekiwać, iż umiejętne oddziaływanie na czynnik PPAR-γ, w oparciu o probiotyki i prebiotyki, zaowocuje efektywnymi metodami oddziaływania profilaktycznego i terapeutycznego na schorzenia jelit związane z nazbyt intensywną reakcją zapalną [29]. Obniżony poziom PPAR-γ obserwowany jest również w przebiegu cukrzycy typu 2. Badania na szczurach pokazały, iż doustne podanie szczepu probiotycznego *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 prowadzi do podwyższenia poziomu tego receptora jądrowego, który jest niezbędnym w metabolizmie glukozy i lipidów. Ponadto receptor ten odgrywa ważną rolę w regulacji wrażliwości na insulinę i homeostazy glukozy. Wykazano też, iż podanie *L. reuteri* GMNL-263 normalizuje poziom ekspresji również innych genów związanych z metabolizmem lipidów (Srebp-1c, FAS, and Elvol6), a także sprzyja obniżeniu stężenia IL-6 i TNF-α w tkance tłuszczowej, których podwyższony poziom ma miejsce przy wzmożonym spożyciu cukrów [30].

Modulacja profilu wydzielanych cytokin

Cytokiny wydzielane przez różne komórki układu odpornościowego, takie jak: granulocyty, makrofagi, komórki dendrytyczne, limfocyty T i B, mogą zarówno wywoływać odpowiedź prozapalną (TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8, IL-15) jak i doprowadzać do wygaszenia stanu zapalnego (IL-10, TGFβ). Cytokiny wpływają na proces różnicowania się limfocytów w kierunku limfocytów Th1 (IL-12), limfocytów Th2 (IL-4), limfocytów Th17 (TGF-β, IL-1β, IL-6, IL-23), a także limfocytów T regulatorowych (IL-10, TGFβ, IL-35). Ponadto cytokiny w sposób kluczowy oddziałują na procesy związane z kształtowaniem się odpowiedzi humoralnej (IL-4, IL-5, IL-13, IL-10) [13].

Liczne badania wykazały, iż drobnoustroje probiotyczne mają zdolność modulacji wytwarzania cytokin. Modyfikacja ekspresji białek cytokinowych w istotny sposób wpływa na funkcjonowanie układu odpornościowego i stwarza szerokie możliwości zastosowania probiotyków w leczeniu i profilaktyce chorób związanych z nieprawidłowym działaniem układu immunologicznego. Wiele szczepów *Lactobacillus* indukuje wydzielanie IFN-γ i IL-12 przez limfocyty Th1, które to cytokiny związane są z odpornością komórkową i ak-

tywnością komórek NK. Niektóre szczepy *Lactobacillus* mogą zarówno pobudzać jak i hamować wydzielanie cytokin związanych z aktywnością limfocytów Th2: IL-4 i IL-5, które pobudzają humoralną odpowiedź immunologiczną [13]. Badania *in vitro* na komórkach dendrytycznych, prowadzone przez Evrard i wsp. [31] wskazały, iż szczep *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 wykazuje zdolność pobudzania produkcji IL-23 i cytokin z rodziny IL-12, związanych z różnicowaniem limfocytów Th17 i odpowiedzią prozapalną. Efekt ten był zależny od zastosowanej dawki szczepu probiotycznego. Szeroki wachlarz bakterii probiotycznych zarówno z rodzaju *Bifidobacterium* jak i *Lactobacillus* indukuje ekspresję przeciwzapalnych, regulatorowych cytokin TGF β i IL-10, związanych z funkcją hamującą limfocytów T regulatorowych (Treg) [13]. Probiotyki odgrywają także ważną rolę w modulacji wrodzonych mechanizmów reakcji zapalnej istotnej dla wczesnej, niespecyficjnej odpowiedzi przeciwko patogenom, jak również w przypadku przewlekłego zapalenia. Wiele gatunków bakterii probiotycznych z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* wpływa na zwiększenie wydzielania TNF- α , IL-1 β oraz IL-6 przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej, komórki dendrytyczne, monocyty, makrofagi i komórki nabłonkowe [13]. Badania prowadzone na szczurach typu Wistar wskazują na skuteczność stosowania bakterii probiotycznych w stanach zapalnych o umiarkowanym nasileniu. Okazało się, iż szczepy *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 i *Bifidobacterium longum* IPLA E44 odznaczają się wysoką zdolnością immunomodulacyjną, czego przejawem jest wzrost poziomu supresorowo-regulatorowej cytokiny TGF- β , szczególnie wyraźny pod wpływem działania pierwszego z testowanych szczepów. Uzupełnianie diety zwierząt o ten szczep prowadziło ponadto do spadku wytwarzania IL-6 wykazującej aktywność prozapalną, a także spadku fosforylacji kinazy Akt w mięśniach, nie oddziałując przy tym na poziom glukozy i insuliny we krwi oraz nie zmieniając wartości indeksu HOMA (*Homeostasis Assessment Model*) liczonego według formuły: $\text{insulina } (\mu\text{U/mL}) \times \text{glukoza } (\text{mg/dL}) / 2.43$, czy poziomu Glut-4 (*insulin-regulated glucose transporter type 4*) [32]. Wyraźne zmiany w profilu produkcji cytokin obserwowano w mysim modelu przewlekłego/nieswoistego zapalenia jelit (IBD, *inflammatory bowel disease*), po zastosowaniu siedmiu szczepów probiotycznych (należących do *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*) wchodzących w skład mieszaniny probiotycznej Duolac 7S (DUO) w połączeniu z ekstraktem z wodorostów *Laminaria japonica*, zwanych popularnie kombu, szeroko używanych w kuchni azjatyckiej. Spośród 7 cytokin uważanych za reprezentatywne w przebiegu zapalenia jelit (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-17) wytwarzanie trzech (tj. IL-6, IL-12 i IL-17) uległo ograniczeniu pod wpływem

samych szczepów probiotycznych, tym samym można stwierdzić, iż wywoływały one efekt przeciwzapalny. W połączeniu z ekstraktem dochodziło do efektu synergistycznego, który oprócz wcześniej wymienionych cytokin dotyczył również ograniczenia produkcji IL-1 β . Nie obserwowano natomiast wpływu na poziom wytwarzania TNF- α , IFN- γ i IL-10 [33].

Efekty związane z aktywnością probiotyków w stosunku do poszczególnych typów komórek układu odpornościowego

Poszczególne gatunki bakterii probiotycznych posiadają różne właściwości immunomodulujące i mogą silnie pobudzać odpowiedź immunologiczną [34]. Właściwości stymulujące bądź hamujące wrodzoną odporność zależą od biologicznych uwarunkowań określonych szczepów probiotycznych. Drobnoustroje probiotyczne przede wszystkim wywierają bezpośredni wpływ na komórki prezentujące antygen, takie jak: komórki dendrytyczne, monocyty, makrofagi, a także na limfocyty B, stymulując te ostatnie do produkcji wydzielniczych przeciwciał klasy IgA [27].

Określone gatunki bakterii probiotycznych stymulują dojrzewanie komórek dendrytycznych na różnym poziomie. Najczęściej bakterie fermentacji mlekowej indukują nie w pełni dojrzałe komórki dendrytyczne, w których ekspresja markerów powierzchniowych CD40, CD80 i CD86 wyrażona jest na niższym poziomie, niż w przypadku komórek dendrytycznych dojrzałych pod wpływem stymulacji bakteriami patogennymi. Indukcja markerów powierzchniowych zachodząca pod wpływem bakterii z rodzaju *Lactobacillus* może znacząco różnić się, w zależności od konkretnego szczepu, natomiast większość bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* wywołuje niski poziom dojrzewania komórek dendrytycznych. Mikroflora śluzówki jelita pobudza aktywność komórek dendrytycznych poprzez wpływ na produkcję cytokin przez te komórki, a pobudzone komórki dendrytyczne, poprzez wytwarzanie cytokin, wpływają na aktywność innych komórek układu odpornościowego [34]. Badania wykazały, iż zarówno komórki dendrytyczne, jak i monocyty stymulowane przez probiotyki, wytwarzają IL-12, która oddziałuje na komórki NK aktywując je do wytwarzania IFN- γ . Pobudzona komórka NK poprzez produkcję IFN- γ aktywuje z kolei odpowiedź ze strony limfocytów Th1. Właściwość ta jest szczególnie silnie zaznaczona w przypadku gatunku *Lactobacillus acidophilus*. Jednakże niektóre gatunki bakterii probiotycznych nie indukują produkcji IL-12, i jeśli komórka dendrytyczna zostanie aktywowana przez taki drobnoustrój probiotyczny, to nie będzie stymulowała komórek NK do produkcji IFN- γ , co nasuwa przypuszczenie, iż te dwa procesy są od siebie zależne. Wiele szczepów bakterii probiotycznych wpływa także na ogólny wzrost liczby komórek NK i ich właściwości cytotoksyczne [34].

Dojrzałe komórki dendrytyczne, w wyniku stymulacji mikroorganizmami probiotycznymi, wpływają na proces różnicowania się naiwnych limfocytów T w kierunku limfocytów Th1, Th2, Th17 lub T regulatorowych. Bakterie probiotyczne oraz bakterie stanowiące naturalną mikroflorę jelit wpływają także na różnicowanie się i utrzymanie równowagi wśród populacji limfocytów T regulatorowych, w tym limfocytów Th3, T_R1, limfocytów T CD4⁺CD25⁺ oraz limfocytów T γ δ . Poprzez wpływ na populację limfocytów T, probiotyki wykazują działanie przeciwzapalne, gdyż przyczyniają się do hamowania nieprawidłowo ukierunkowanej odpowiedzi immunologicznej [27].

Aktywność drobnoustrojów probiotycznych wykazywana jest również w stosunku do limfocytów B, co przejawia się głównie ich stymulacją do produkcji przeciwciał klasy IgA. Przeciwciała należące do tej klasy wytwarzane są w znacznie większej ilości, niż przeciwciała innych klas i obecne są w błonie śluzowej jelita. Głównym miejscem wytwarzania przeciwciał klasy IgA przez limfocyty B są kępki Peyera. Pojawienie się cytokin takich jak: IL-6, IL-10 oraz TGF- β w środowisku jelitowym sprzyja ukierunkowaniu limfocytów B na produkcję przeciwciał IgA. Dimery IgA mogą być dalej transportowane przez komórki nabłonkowe do światła jelita, gdzie są nazywane wydzielniczymi IgA (sIgA). Chociaż w wydzielinach śluzówki jelita znajdują się zarówno przeciwciała klasy IgA jak i IgG, jednak u zdrowych osób przeważają znacznie immunoglobuliny IgA, które są uważane za pierwotny element śluzówkowej odpowiedzi immunologicznej na antygeny drobnoustrojów [35].

Podczas infekcji probiotyki zwiększają zarówno całkowity poziom przeciwciał sIgA, jak również tych przeciwciał, które są skierowane przeciwko określonym patogenom. Natomiast na ogół nie indukują produkcji przeciwciał sIgA specyficznych względem samych mikroorganizmów probiotycznych, co oznacza, iż nie wzbudzają odpowiedzi immunologicznej przeciwko własnym epitopom [35, 36]. Badania prowadzone na myszach, którym podawano szczep *Lactobacillus casei* wykazały znaczący wzrost liczby limfocytów B wytwarzających IgA oraz komórek produkujących IL-6 (stymulującą limfocyty B do produkcji IgA) w obrębie blaszki właściwej jelita cienkiego. Natomiast specyficzne przeciwciała przeciwko *L. casei* nie zostały wyprodukowane, a więc układ GALT nie wywoływał odpowiedzi immunologicznej przeciwko tym probiotycznym mikroorganizmom [36]. Prace prowadzone na szczurach poddanych działaniu bioaktywnego peptydu uwalnianego podczas fermentacji mleka przez szczep *Lactobacillus helveticus* dowiodły, iż peptyd ten powodował zwiększenie liczby limfocytów B produkujących sIgA w blaszce właściwej [37]. Oczyszczenie i identyfikacja tego peptydu, jak

również przyszłe badania dotyczące roli tego peptydu w indukcji limfocytów B do produkcji sIgA, mogą być pomocne w opracowaniu nowych preparatów farmaceutycznych (na bazie tego peptydu), stymulujących odpowiedź immunologiczną w sposób specyficzny względem określonych antygenów [35].

Probiotyki wykazują również zdolność do modulowania różnych ścieżek sygnałowych w makrofagach. Wpływ mikroorganizmów probiotycznych na makrofagi przejawia się między innymi poprzez zmniejszenie wydzielania prozapalnych cytokin oraz wytwarzanie rozpuszczalnych czynników, które hamują szlak sygnałowy NF κ B w makrofagach, co wpływa na zahamowanie stanu zapalnego w organizmie. Właściwość ta została wykazana w badaniach z wykorzystaniem szczepu *Lactobacillus casei* Shiota. Drobnoustroje te wydzielają czynniki hamujące fosforylację oraz będącą jej następstwem degradację cząsteczki I κ B, która jest inhibitorem NF κ B. W konsekwencji dochodzi do zahamowania aktywacji tego szlaku sygnałowego. Supresja szlaku NF κ B makrofagów może być również związana ze zmianami zachodzącymi w receptorach rozpoznających wzorce molekularne (PRRs, *pattern recognition receptors*) oraz w szlaku sygnałowym MAPK [27].

Bakterie probiotyczne posiadają również potencjał oddziaływania na aktywność cytotoksyczną limfocytów T i komórek NK, o czym świadczą prace prowadzone przez Fukui i wsp. Zaobserwowali oni, iż splenocyty pozyskiwane ze śledziony myszy, którym podawano probiotyczny szczep *Lactobacillus brevis* KB290 odznaczały się zintensyfikowaną cytotoksycznością w porównaniu do komórek izolowanych od myszy spożywających pokarm niesuplementowany badanym szczepem. Posługując się techniką mikromacierzy DNA wykazano, iż wzmożonej cytotoksyczności towarzyszyła intensyfikacja ekspresji genów związanych z przetwarzaniem i prezentacją antygenów w komórkach limfocytów T cytotoksycznych CD8⁺ i w komórkach NK [38].

Zastosowania probiotyków w określonych jednostkach chorobowych

Mikroorganizmy probiotyczne dzięki swoim korzystnym właściwościom mogą być wykorzystane zarówno w profilaktyce jak i leczeniu wielu schorzeń. Pożądana modyfikacja naturalnej mikroflory jelit z wykorzystaniem preparatów i produktów probiotycznych może chronić przed wieloma chorobami (między innymi związanymi z układem pokarmowym), a także wpływać na ogólną poprawę stanu zdrowia i odporności pacjentów [39]. Obecnie probiotykoterapia wykazuje bardzo szerokie spektrum zastosowania, co zostało przedstawione w tabeli I [1, 13, 15, 18, 39-41].

Istnieje szereg doniesień naukowych na temat skuteczności stosowania preparatów probiotycznych oraz spożywania fermentowanych produktów mlecznych, zawierających drobnoustroje należące do gatunku *Lactobacillus acidophilus*, w leczeniu stanu zapalnego związanego z rozwojem trądziku [42]. Probiotyki wspomagają leczenie i skracają czas trwania kuracji przeciwtrądzikowej. Konsumpcja fermentowanych napojów mlecznych z udziałem bakterii z rodzaju *Lactobacillus* prowadzi do znacznego zmniejszenia całkowitej liczby zmian chorobowych, co jest związane ze znaczną redukcją produkcji łożu – jednego z czynników odpowiedzialnych za powstawanie trądziku. Doustnie podane drobnoustroje probiotyczne mogą regulować uwalnianie w skórze cytokin prozapalnych, między innymi mogą redukować wydzielanie IL-1 α , co z kolei wywiera korzystny wpływ na proces leczenia zmian trądzikowych. Badania wykazały, iż zastosowanie na skórę kremu zawierającego bakterie mlekowe *Streptococcus thermophilus*, powodowało zwiększenie produkcji ceramidów w skórze. Właściwość ta została wykorzystana do zwalczania trądziku, gdyż sfingolipidy ceramidów wykazują bezpośrednie działanie przeciwzapalne oraz aktywność przeciwbakteryjną w stosunku do bakterii *Propionibacterium acnes*, które są odpowiedzialne za rozwój trądziku [42]. Istnieją również doniesienia o wpływie szczepów probiotycznych *Bifidobacterium longum* i *Lactobacillus paracasei* na złagodzenie stanów zapalnych skóry wywołanych przez substancję P (jeden z głównych neuropeptydów wyzwalających reakcję zapalną skóry), która może być pierwotnym mediatorem zapalenia i produkcji sebum wpływającego na rozwój trądziku pospolitego [43].

Z użyciem probiotyków wiąże się nadzieje na poprawę stanu pacjentów dotkniętych zespołem drażliwego jelita. Jest to schorzenie charakteryzujące się przewlekłym bólem brzucha oraz dyskomfortem związanym ze zmianami w funkcjonowaniu jelit. Czynnikiem wpływającymi na jego rozwój są przewlekłe stany zapalne jelit oraz narażenie na ciągłe działanie stresu. U pacjentów cierpiących na zespół drażliwego jelita stwierdzono zaburzenia w składzie

mikroflory jelitowej. Drobnoustroje probiotyczne poprzez korzystną modyfikację składu mikroflory jelit, czemu towarzyszy modulacja funkcji neuronowych, powodują zmniejszenie nadwrażliwości trzewnej, co wykazano na modelu szczurzym zespole jelita drażliwego. Badania wykonano na osobnikach, które odłączono od matki na wczesnym etapie życia, co było dużym czynnikiem stresogennym, prowadzącym do rozwoju zespołu drażliwego jelita u dorosłych zwierząt. Zmiany zachodzące w układzie nerwowym tych zwierząt powodowały zwiększone odczuwanie bólu. Zmiany te zostały jednak osłabione przez podawanie szczurom preparatu probiotycznego VSL#3 będącego mieszaniną 8 szczepów bakterii probiotycznych. Analiza genetyczna materiału biologicznego pobranego od zwierząt biorących udział w eksperymencie wykazała, że przebyty w młodości silny stres, wpływa na zmiany w ekspresji około jednej trzeciej genów całego genomu, w tym genów odpowiadających za percepcję bólu. Jednakże podawanie preparatów probiotycznych przywraca prawidłową ekspresję tych genów. U zwierząt cierpiących na zespół drażliwego jelita odnotowano podwyższoną ekspresję genów: TPH1, CCL2, CCR2, NOS3, NTRK1, BDKRB1, IL10, TNFRSF1B oraz TRPV4. Wszystkie te geny kodują białka zaangażowane w percepcję bólu. Wdrożenie terapii związanej z podawaniem preparatu VSL#3 powodowało obniżenie ekspresji tych genów i zmniejszenie odczuwania bólu [44].

Drobnoustroje obecne w obrębie jamy ustnej (głównie paciorkowce *Streptococcus mutans*) jak również dieta bogata w węglowodany, które po przekształceniu przez te bakterie do kwasów uszkadzają szkliwo zębów, przyczyniają się do rozwoju próchnicy. W ostatnim czasie wzrosło zainteresowanie wykorzystaniem drobnoustrojów probiotycznych w zapobieganiu rozwojowi chorób jamy ustnej, w tym próchnicy. Probiotyki są podawane w celu utrzymania równowagi lub odtworzenia zniszczonej naturalnej mikroflory jamy ustnej, co odgrywa ważną rolę w ochronie przed inwazją patogenów kluczowych dla rozwoju poważnych chorób jamy ustnej. Wpływ probiotyków na

Tabela I. Przykłady zastosowania drobnoustrojów probiotycznych w profilaktyce i terapii określonych jednostek chorobowych
Table I. Examples of probiotic bacteria use in prophylaxis and treatment of specific diseases

Profilaktyka	Leczenie
Zapobieganie próchnicy	Leczenie zakażeń <i>Helicobacter pylori</i>
Profilaktyka chorób nowotworowych jelita	Alergie pokarmowe
Obniżenie poziomu cholesterol we krwi – profilaktyka chorób układu krążenia	Zespół drażliwego jelita
Zapobieganie infekcjom pooperacyjnym u pacjentów po zabiegach chirurgicznych	Biegunki ostre, rotawirusowe, poantybiotykowe, podróżnych
Obniżanie ciśnienia krwi – zapobieganie schorzeniom związanym z nadciśnieniem	Wspomaganie leczenia trądziku pospolitego
Ogólne zwiększenie odporności organizmu	Atopowe zapalenie skóry
Zapobieganie infekcjom pasożytniczym wywołanym przez <i>Toxoplasma gondii</i>	Nieswoiste zapalenia jelit: wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Leśniowskiego-Crohna
Zapobieganie osteoporozie – zwiększenie metabolizmu wapnia	Zmniejszenie efektu nietolerancji laktozy – produkcja enzymów rozkładających laktozę

próchnicę i czynniki ryzyka sprzyjające jej rozwojowi został oceniony w kilku badaniach eksperymentalnych z zastosowaniem takich szczepów jak: *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. brevis* CD2, *Bifidobacterium* spp. Szczepy te zostały przebadane pod względem ogólnej redukcji występowania próchnicy, zmniejszenia liczby paciorkowców *Streptococcus mutans* w jamie ustnej, kontroli pH płytki nazębnej oraz odwrócenia zmian wywołanych próchnicą w obrębie korzeni zębów. Wyniki opisane przez różne grupy badawcze były obiecujące, nawet jeśli tylko kilka badań wykazało wyraźne rezultaty kliniczne. Możliwą drogą podawania probiotyków w celu zapobiegania próchnicy może być ich dodatek do pasty do zębów, aby zwiększyć skuteczność jej działania [45].

Jedną z głównych przyczyn chorób układu krążenia, między innymi choroby niedokrwiennej serca, jest podwyższone stężenie cholesterolu we krwi. Z problemem tym ma do czynienia coraz większa liczba osób stąd poszukiwania różnych składników żywnościowych, które efektywnie oddziałując na poziomie tego lipidu we krwi, mogłyby stanowić łatwo dostępną alternatywną lub uzupełniającą formę terapii bądź profilaktyki. Badania wykazały, iż wzbogacenie diety w produkty mleczne zawierające bakterie kwasu mlekowego przyczynia się do obniżenia poziomu cholesterolu w surowicy [41, 46]. Szczególnie efektywne okazały się szczepy probiotyczne z rodzaju *Bifidobacterium* spp. oraz *Lactobacillus* spp. Istnieje kilka możliwych mechanizmów usuwania cholesterolu przez probiotyki: asymilacja cholesterolu przez żywe komórki bakteryjne, wiązanie cholesterolu na powierzchni komórek do ściany komórkowej, włączenie cholesterolu we własną błonę komórkową, dekonjugacja kwasów żółciowych w wyniku aktywności enzymu hydrolazy soli żółci, wytrącanie (koprecypitacja) cholesterolu z wolnymi kwasami żółciowymi oraz wytwarzanie substancji, które potencjalnie mogą wpływać na poziom lipidów we krwi np. krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe lub egzopolisacharydy [46]. Obecnie prowadzi się badania nad zastosowaniem technik inżynierii genetycznej w celu zwiększenia korzystnych właściwości probiotyków i zwiększenia ich efektywności w obniżaniu poziomu niekorzystnej dla zdrowia frakcji cholesterolu LDL (*Low Density Lipoproteins*). Potencjał mikroorganizmów probiotycznych, służący opracowaniu alternatywnych terapii hipercholesterolemii, bez niepożądanych efektów ubocznych dla zdrowia pacjenta, wzbudza duże nadzieje [41].

Zastosowanie probiotyków i prebiotyków w regulacji składu mikroflory jelit może stanowić skuteczną formę terapii w przypadku niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby (NAFLD, *nonalcoholic fatty liver disease*), której wzrost częstości występowania

obserwuje się również wśród dzieci. Drobnoustroje składające się na mikroflorę, spośród których najliczniej reprezentowane są u człowieka te należące do typu *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, stanowią liczne źródło ligandów dla receptorów TLR, za pośrednictwem których dochodzi do wytwarzania TNF- α i IL-1 β , cytokin rozwijających reakcję zapalną w odpowiedzi na wnikające do gospodarza drobnoustroje. Niekiedy jednak ta z założenia reakcja obronna ulega nadmiernemu wydłużeniu lub eskalacji prowadząc do niepożądanych efektów względem samego gospodarza. Uważa się, iż w patogenezie NAFLD biorą udział receptory TLR2, TLR4, TLR5 i TLR9. Osoby cierpiące na NAFLD wykazują zwiększony poziom TNF- α i IL-1 β , co może wskazywać te cytokiny na mediatory rozwoju niealkoholowej stłuszczeniowej choroby wątroby. Zaobserwowano, że otyłości i powiązanim z nią schorzeniom u ludzi towarzyszy zaburzenie kompozycji mikroflory jelit przejawiające się wzrostem mikroorganizmów z grupy *Firmicutes* i spadkiem tych należących do *Bacteroidetes*, przy czym nie wiadomo czy w tym przypadku zmiany te są przyczyną czy następstwem [47]. Szczególnie zauważalny jest spadek liczebności probiotycznych szczepów rodzaju *Bifidobacterium*, należących do typu *Actinobacteria*. Uważa się, iż w takim przypadku suplementowanie diety o szczepy należące do *Bifidobacterium* powinno skutkować przywróceniem równowagi w składzie mikroflory jelit i wywierać efekt terapeutyczny. Liczne badania prowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, iż podawaniu tych szczepów towarzyszyła poprawa parametrów metabolicznych związanych z poziomem cholesterolu, otłuszczenia narządów wewnętrznych i opornością na działanie insuliny. Działanie ochronne przed rozwojem NAFLD wykazano również w przypadku innych probiotyków, takich jak: *Lactobacillus casei* szczep Shirota, należący do *Firmicutes*, czy też VSL#3, obejmującego osiem szczepów należących do *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Dodatkowo w przypadku *Bifidobacterium lactis* 420, *Escherichia coli* Nissle 1917 i *Lactobacillus plantarum* wykazano ich wpływ w zapaleniu okrężnicy na zwiększenie ekspresji tzw. białek wchodzących w skład połączeń ścisłych (*tight junction proteins*) [47], uczestniczących w tworzeniu specjalnych kanałów w błonach komórkowych przylegających do siebie komórek, za pośrednictwem których dokonuje się przenoszenie sygnałów elektrycznych, przepływ jonów czy rozpuszczalnych w wodzie małych molekuł, co zapewnia sprawną komunikację międzykomórkową [48]. Ponadto pod wpływem probiotycznych szczepów dochodzi do osłabienia wytwarzania TNF- α , IFN- γ i IL-1, które mogą zakłócać działanie połączeń ścisłych. Okazuje się również, iż probiotyki mogą dostarczać ligandów dla receptorów TLR, przy czym efektem przesłania sygnału nie jest produkcja prozapalnych, lecz przeciwzapalnych cytokin, np. IL-10 [47].

W wielu laboratoriach trwają intensywne poszukiwania nowych rozwiązań mających na celu zapobieganie lub spowalnianie procesów przyczyniających się do rozwoju chorób nowotworowych, w tym nowotworu jelita grubego. Obiektem badań w tej dziedzinie zostały również mikroorganizmy probiotyczne. Obecnie rozważa się różne mechanizmy anty-kancerogennego działania probiotyków. Aktywność przeciwnowotworowa probiotyków może być wykazywana poprzez: modyfikację składu mikroorganizmów jelitowych oraz ich antagonizm w stosunku do drobnoustrojów onkogennych, produkcję substancji antymutagennych i antykancerogennych, zmianę warunków fizyko-chemicznych w jelicie grubym oraz reakcję pośrednią ze związkami potencjalnie rakotwórczymi przedostającymi się do jelita grubego (fenol, p-krezol, indol, oraz heterocykliczne aminy aromatyczne) poprzez ich wiązanie i degradację [39]. Jednakże głównym mechanizmem związanym z działaniem antynowotworowym probiotyków jest indukcja odpowiedzi immunologicznej przeciw komórkom nowotworowym oraz modulacja odpowiedzi zapalnej. W związku z tym, iż mechanizm powstawania nowotworu jest złożony, do jego rozwoju przyczyniają się zarówno procesy prozapalne jak i przeciwzapalne. Dlatego bardzo ważny jest dobór odpowiedniego szczepu probiotycznego, o ukierunkowanym działaniu na określony mechanizm odpornościowy, w zależności od przyczyny wywołującej rozwój nowotworu [13].

Istotne jest, by przy całej staranności i uwadze związanej z selekcjonowaniem, doborem, badaniem spodziewanych efektów i wdrażaniem do szerokiego użycia szczepów probiotycznych, ich zastosowaniu

terapeutycznemu towarzyszyła wnikliwa obserwacja jak pacjent reaguje na podawany produkt. Szczepy probiotyczne odznaczają się nadzwyczaj wysokim bezpieczeństwem stosowania, niemniej jednak istnieją nieliczne doniesienia wiążące poszczególne szczepy (głównie z rodzaju *Lactobacillus*) bądź spożywanie produktów zawierających te szczepy, z rozwojem efektów niepożądanych, zwłaszcza z różnymi rodzajami sepsy (ropień wątroby, infekcyjne zapalenie wsierdza, bakteriemia). Kojarzone z probiotykami przypadki bakteriemii lub fungemii dotyczyły jednakże wyłącznie osób, których organizm był poważnie osłabiony w wyniku dysfunkcji układu immunologicznego czy przewlekłych chorób, a większość przypadków sepsy poddawała się antybiotykoterapii. Należy podkreślić, iż dotychczas nie odnotowano żadnego przypadku sepsy związanego z użyciem probiotyków u osób w dobrej kondycji zdrowotnej [49].

Podsumowanie

Probiotyki przebyły szczególnie długą drogę od czasów Miecznikowa po dzień dzisiejszy. Weszły do szerokiego użycia, zarówno na poziomie konsumenckim jak i w obszarze terapeutycznym. Łączą w sobie doskonały poziom bezpieczeństwa z wieloma prozdrowotnymi właściwościami, co sprawia, iż zapewniły sobie niezwykle sukces komercyjny. Ich spożywanie/przyjmowanie zaleca się nie tylko osobom dorosłym, lecz również dzieciom, przy czym ich zastosowanie w postaci suplementów diety dla niemowląt i dzieci podlega określonym regulacjom prawnym [50], co dodatkowo podnosi poziom zaufania dla tego rodzaju produktów.

Piśmiennictwo / References

1. Heczko PB, Strus M, Jawień M, i wsp. Medyczne zastosowanie probiotyków. *Wiad Lek* 2005, 58(11-12): 640-646.
2. Anukam KC, Reid G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's observation. [in:] *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Méndez-Vilas A (ed). Formatex, Badajoz 2007: 466-474.
3. Fuller R. History and development of probiotics. [in:] *Probiotics – the scientific basis*. Fuller R (ed). Springer-Science+Business Media B.V. Dordrecht 1992: 1-8.
4. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Sci* 1965, 147: 747-748.
5. Sperti GS. *Probiotics*. CT Avi Publishing Co, West Point 1971.
6. Parker RB. Probiotics: the other half of the antibiotic story. *Animal Nutr Health* 1974, 29: 4-8.
7. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989, 66(5): 365-378.
8. Vilà B, Esteve-Garcia E, Brufau J. Probiotic microorganisms: 100 years of innovation and efficacy. Modes of action. *World's Poult Sci J* 2010, 66(3): 369-380.
9. Cichy W, Gałęcka M, Szachta P. Probiotyki jako alternatywne rozwiązanie i wsparcie terapii tradycyjnych. *Zakażenia* 2010, 6: 2-8.
10. Maniecka M. Probiotyki – „dla życia”, dla zdrowia. *Laboratoryjny Serwis Informacyjny* 2012. <http://laboratoria.net/pl/artukul/13077.html>
11. Gawęcki J, Libudzisz Z. *Mikroorganizmy w żywności i żywieniu*. UIP, Poznań 2010.
12. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, April 30 and May 1, 2002. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf (27.06.2014).
13. Hardy H, Harris J, Lyon E, et al. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutr* 2013, 5(6): 1869-1912.
14. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, et al. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 2000, 84(3): 197-215.

15. Reid G, Jass J, Sebulsy MT, et al. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16(4): 658-672.
16. Kamińska E. Skuteczność i bezpieczeństwo stosowania probiotyków na podstawie badań klinicznych przeprowadzonych u dzieci. *Med Wieku Rozw* 2012, 16(3): 240-251.
17. Gajewska J, Błaszczuk MK. Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post Mikrobiol* 2012, 51(1): 55-65.
18. Górska S, Jarzab A, Gamian A. Bakterie probiotyczne w przewodzie pokarmowym człowieka jako czynnik stymulujący układ odpornościowy. *Postepy Hig Med Dosw* 2009, 63: 653-667.
19. Gross G, van der Meulen J, Snel J, et al. Mannose-specific interaction of *Lactobacillus plantarum* with porcine jejunal epithelium. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008, 54(2): 215-223.
20. Wilson KH, Perini F. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infect Immun* 1988, 56(10): 2610-2614.
21. Maltby R, Leatham-Jensen MP, Gibson T, et al. Nutritional basis for colonization resistance by human commensal *Escherichia coli* strains HS and Nissle 1917 against *E. coli* O157:H7 in the mouse intestine. *PLoS One* 2013, 8(1): e53957.
22. Reineke JJ, Cho DY, Dingle YT, et al. Unique insights into the intestinal absorption, transit, and subsequent biodistribution of polymer-derived microspheres. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, 110(34): 13803-13808.
23. Chiba Y, Shida K, Nagata S, et al. Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei*. *Immunol* 2009, 130(3): 352-362.
24. Zheng B, van Bergenhenegouwen J, Overbeek S, et al. *Bifidobacterium breve* attenuates murine dextran sodium sulfate-induced colitis and increases regulatory T cell responses. *PLoS One* 2014, 9(5): e95441.
25. Liu Y, Fatheree NY, Dingle BM, et al. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 changes the frequency of Foxp3+ regulatory T cells in the intestine and mesenteric lymph node in experimental necrotizing enterocolitis. *PLoS One* 2013, 8(2): e56547.
26. Maciorowska E, Ryszczuk E. Rola probiotyków i prebiotyków w procesie immunomodulacji w przewodzie pokarmowym. *Zakażenia* 2012, 1: 33-39.
27. Thomas CM, Versalovic J. Probiotics – host communications. Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 2010, 1(3): 148-163.
28. Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF-alpha- and IFN-gamma-induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterol* 2006, 130(3): 731-746.
29. Viladomiu M, Hontecillas R, Yuan L, et al. Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *J Nutr Biochem* 2013, 24(6): 929-939.
30. Hsieh FC, Lee CL, Chai CY, et al. Oral administration of *Lactobacillus reuteri* GMNL-263 improves insulin resistance and ameliorates hepatic steatosis in high fructose-fed rats. *Nutr Metab (Lond)* 2013, 10(1): 35.
31. Evrard B, Coudeyras S, Dossigilbert A, et al. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS One* 2011, 6(4): e18735.
32. Salazar N, López P, Garrido P, et al. Immune modulating capability of two exopolysaccharide-producing *Bifidobacterium* strains in a wistar rat model. *Biomed Res Int* 2014: 106290.
33. Ko SJ, Bu Y, Bae J, et al. Protective effect of *Laminaria japonica* with probiotics on murine colitis. *Mediators Inflamm* 2014, 2014: 417814.
34. Rizzello V, Bonaccorsi I, Dongarrà ML, et al. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics. *J Biomed Biotechnol* 2011, 2011:473097.
35. Ohland CL, Macnaughton WK. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010, 298(6): G807-G819.
36. Galdeano CM, Perdígón G. The Probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol* 2006, 13(2): 219-226.
37. LeBlanc J, Fliss I, Matar C. Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, 11(6): 1171-1181.
38. Fukui Y, Sasaki E, Fuke N, et al. Sequential gene expression profiling in the mouse spleen during 14 d feeding with *Lactobacillus brevis* KB290. *Br J Nutr* 2014, praca w druku
39. Nowak A, Śliżewska K, Libudzisz Z i wsp. Probiotyki – efekty zdrowotne. *Żywn Nauk Technol Jakość* 2010, 4(71): 20-36.
40. Benson A, Pifer R, Behrendt CL, et al. Gut commensal bacteria direct a protective immune response against the human pathogen *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe* 2009, 6(2): 187-196.
41. Anandharaj M, Sivasankari B, Rani RP. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Hypercholesterolemia: A Review. *Chinese J Biol* 2014: 572754.
42. Bowe WP, Logan AC. *Acne vulgaris*, probiotics and the gut-brain-skin axis – back to the future? *Gut Pathog* 2011, 3(1): 1.
43. Guéniche A, Bastien P, Ovigine JM, et al. *Bifidobacterium longum* lysate, a new ingredient for reactive skin. *Exp Dermatol* 2010, 19(8): e1-8.
44. Distrutti E, Cipriani S, Mencarelli A, et al. Probiotics VSL#3 protect against development of visceral pain in murine model of irritable bowel syndrome. *PLoS One* 2013, 8(5): e63893.
45. Cagetti MG, Mastroberardino S, Milia E, et al. The use of probiotic strains in caries prevention: a systematic review. *Nutr* 2013, 5(7): 2530-2550.
46. Kumar M, Nagpal R, Kumar R, et al. Cholesterol-lowering probiotics as potential biotherapeutics for metabolic diseases. *Exp Diabetes Res* 2012: 902917.
47. Miura K, Ohnishi H. Role of gut microbiota and Toll-like receptors in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014, 20(23): 7381-7391.
48. Rutkowski R, Koszyła-Hojna B, Kańczuga-Koda L i wsp. Struktura i fizjologiczna funkcja białek koneksynowych. *Postepy Hig Med Dosw* 2008, 62: 632-641.
49. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang MLK. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006, 83(6): 1256-1264.
50. Commission of the European Communities. Commission directive on processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children. European Commission, Luxemburg 1996, L49: 17-96.