

## BENEFICIAL MODIFICATION OF THE HUMAN INTESTINAL MICROFLORA USING ORALLY ADMINISTERED LACTIC ACID BACTERIA

FERENCIK M, EBRINGER L, MIKES Z, JAHNOVA E, CIZNAR I

### PROSPEŠNÁ MODIFIKÁCIA ČREVNEJ MIKROFLÓRY ČLOVEKA PERORÁLNE PODÁVANÝMI BAKTÉRIAMI MLIEČNEHO KYSNUTIA

#### Abstract

**Ferencik M, Ebringer L, Mikes Z, Jahnova E, Ciznar I:** Beneficial modification of the human intestinal microflora using orally administered lactic acid bacteria  
Bratisl Lek Listy 1999; 100 (5): 238–245

Lactic acid bacteria in food can transiently colonize the intestine and exert health beneficial (probiotic) effects. These include: 1. Lactose digestion, improvement of diarrheal disorders (including traveller's diarrhea), prophylaxis of intestinal and urogenital infections — as a result of formation or reconstruction of a balanced indigenous microflora. 2. Inhibition of the mutagenicity of the intestinal contents and reduction of the incidence of intestinal tumours. 3. Immunomodulatory effects resulting in the improved host resistance. 4. Depression of the serum cholesterol level. The most of these effects were observed in a group of adult subjects administered daily by a lyophilized *Enterococcus faecium* M-74 in the form of waffles (Dr. Ebi) during nine weeks of a double blind placebo controlled clinical trial. The bacterium temporarily colonized the host intestine and its secretion in stool persisted for six weeks after the last dose. The mean activities of  $\beta$ -D-glucuronidase in stools of subjects given waffles containing enterococci were reduced comparing to stools of placebo subjects. After six weeks of daily eating the waffles with enterococci, an increased production of superoxide and other reactive oxygen intermediates by peripheral neutrophils was observed. The increase corresponded in time with an elevated formation of IgG by peripheral blood mononuclear cells after polyclonal activation with mitogenes. Higher activities of myeloperoxidase and elastase in peripheral neutrophils were also ascertained during eating of waffles containing of *E. faecium* M-74. Hence, intake of *E. faecium* M-74 in the form of waffles may have an significant immunostimula-

#### Abstrakt

Ferenčík M., Ebringer L., Mikeš Z., Jahnová E., Čiznár I.: Prospešná modifikácia črevnej mikroflóry človeka perorálne podávanými baktériami mliečneho kysnutia  
Bratisl. lek. Listy, 100, 1999, č. 5, s. 238–245

Baktérie mliečneho kysnutia nachádzajúce sa vo funkčných požívatinách môžu prechodne kolonizovať tráviaci trakt a preukazovať zdravotne prospešné (probiotické) účinky. Medzi ne patrí: 1. Schopnosť metabolizovať laktózu, upravovať hnačkovité stavy (vrátane "cestovnej hnačky"), profylaxia črevných a urogenitálnych infekcií — ako výsledok utvorenia alebo rekonštrukcie prospešnej rovnováhy v črevnej mikroflóre. 2. Inhibícia mutagénnych účinkov črevného obsahu a znížený výskyt nádorov tráviaceho traktu. 3. Imunomodulačné účinky vyúsťujúce do zlepšenej rezistencie hostiteľa. 4. Zníženie hladiny sérového cholesterolu. Väčšina z týchto účinkov sa pozorovala v skupine dospelých osôb, ktoré denne dostávali lyofilizovaný *Enterococcus faecium* M-74 formou obľákových rezov (Dr. Ebi) počas 9 týždňov v dvojito zaslepenej klinickej štúdií kontrolovanej placebom. Tento kmeň postupne kolonizoval tráviaci trakt hostiteľa a jeho sekrécia v stolici pokračovala ešte aj 6 týždňov po poslednej dávke. V stolici osôb, ktoré jedli rezy obsahujúce enterokoky, boli priemerné aktivity  $\beta$ -D-glucuronidázy významne nižšie ako v stolici osôb placebovej skupiny. Po 6 týždňoch dennej konzumácie enterokokových rezov sa zistila zvýšená priemerná produkcia superoxidu a iných intermediátov kyslíka periférnymi neutrofilmi. Toto zvýšenie časovo korešpondovalo so zvýšenou tvorbou IgG periférnymi krvnými mononukleárnymi bunkami po ich polyklonovej aktivácii mitogénmi. Osoby konzumujúce obľákové rezy s enterokokmi mali zvýšené priemerné aktivity myeloperoxidázy a elastázy v periférnych neutrofiloch. To dokazuje, že pravidelný prívod *E. faecium* M-74 formou obľákových rezov môže

Institute of Immunology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava and Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Institute of Molecular and Subcellular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, Dpt of Geriatrics, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava, and Institute of Preventive and Clinical Medicine, Bratislava

**Address for correspondence:** M. Ferencik, PhD, DSc, Institute of Immunology, LFUK, Sasinkova 4, SK-811 08 Bratislava, Slovakia.  
Phone: +421.7.365 403, Fax: +421.7.5357 578, Internet: ferencik@fmed.uniba.sk

Imunologický ústav Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Neuroimunologický ústav Slovenskej akadémie vied v Bratislave, Ústav molekulovej a subcelulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave, Geriatrická klinika Lekárskej fakulty Univerzity Komenského v Bratislave a Ústav preventívnej a klinickej medicíny v Bratislave

**Adresa:** Prof. Ing. M. Ferenčík, DrSc., Imunologický ústav LFUK, Sasinkova 4, 811 08 Bratislava.

tory effect on both phagocytosis performed by neutrophils and antibody production. (Tab. 6, Ref. 29.)

**Key words:** probiotics, *Enterococcus faecium* M-74, immunostimulation, INT-reduction, lysosomal enzymes, IgG production.

Črevná mikroflóra môže na hostiteľa pôsobiť prospešne alebo naopak škodlivo. Hlavnými zložkami, ktoré vedú medzi sebou neustály "trialóg", sú črevné baktérie, črevný epitel a miestny imunitný systém — lymfoidné tkanivo združené s črevom — GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). Funkčné poruchy v tomto systéme môžu navodiť patogénne mikroorganizmy, perorálne podávané širokospektrové antibiotiká alebo imunosupresívne preparáty, toxické látky nachádzajúce sa v potrave a v neposlednom rade aj stresové situácie. Dnes sa pokladá za dokázané obojsmerné viacnásobné prepojenie medzi neuroendokrinným a imunitným systémom (Ferenčík a spol., 1998). Psychický stav každého jedinca potom môže ovplyvňovať aj jeho celkové a lokálne imunitné obranné mechanizmy.

V tráviacom ústrojenstve zdravého človeka sa hlavný podiel mikroorganizmov nachádza v hrubom čreve, kým žalúdok a horná časť tenkého čreva je zvyčajne sterilná. Odhaduje sa, že črevo dospelého človeka obsahuje asi jeden kg mikroorganizmov, najmä baktérií, ktoré sú príslušníkmi najmenej 400 rôznych druhov (Savage, 1977; Fuller, 1989; Berg, 1996). Okrem aeróbných druhov je tu mnohonásobne (100—1000-krát) viac anaeróbných druhov.

Druhové zloženie baktérií počas vývinu jedinca sa mení. Závaži od veku, diéty, ekologických a hygienických pomerov, ako aj od stresových situácií. V čreve dojčiat sa ako prvé objavujú baktérie a to najmä *Escherichia coli*, *Clostridium* sp., *Streptococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacteroides*, sp., *Bifidobacterium* sp. a *Enterococcus faecium*.

Veľký význam sa pripisuje najmä baktériám mliečneho kysnutia (Rotimi a Duerden, 1981), ako sú laktobacily, streptokoky, bifidobaktérie a enterokoky, ktoré majú schopnosť skvasovať mliečny cukor (laktózu) a iné cukry na krátkoreťazcové karboxylové kyseliny (mliečnu, octovú, propiónovú, maslovú), produkujú vitamín K a ďalšie vitamíny potrebné pre hostiteľa, sú schopné dehydroxylovať a dekonjugovať žlčové kyseliny. Tým bránia ich premene na fekálne sekundárne žlčové kyseliny, o ktorých je známe, že sa zúčastňujú na patogenéze vzniku rakoviny hrubého čreva. Sú schopné premieňať bilirubín na urobilinogén a cholesterol na koprostanol, čím znižujú možnosť jeho resorpcie z tráviaceho traktu (Marteau a Rambaud, 1993; Falk a spol., 1998). Baktérie mliečneho kysnutia utvárajú v čreve mikroprostredie, ktoré bráni pomnoženiu nielen patogénnych druhov, ale aj rôznych hnilobných a iných menej prospešných baktérií. Obsadením adhezívnych receptorov na epitelových bunkách znemožňujú prichytenie patogénnych mikroorganizmov na povrch sliznice a ich penetráciu do tkaniva. Tieto prospešné baktérie sa však počas ontogenetického vývinu z čreva strácajú a u starších osôb je ich už výrazne málo. Nahrádzajú ich iné pre zdravie jedinca menej výhodné druhy. Na základe toho sa predpokladá, že na procesoch starnutia sa významne zúčastňuje akumulácia chronických infekcií a latentných toxikóz navodených najmä nevhodnou skladbou črevnej mikroflóry.

mať významný imunostimulačný účinok na proces fagocytózy uskutočňovaný neutrofilmi, ako aj na produkciu protilátok. (Tab. 6, lit. 29.)

**Kľúčové slová:** probiotiká, *Enterococcus faecium* M-74, imunostimulácia, INT-redukcia, lyzozómové enzýmy, tvorba IgG.

Baktérie mliečneho kysnutia majú významné imunostimulačné účinky (Goldin a Gorbach, 1992; Marteau a Rambaud, 1993; Ebringer a spol., 1995; Mikeš a spol., 1995). Vyplývajú z existencie GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). Toto lymfoidné tkanivo združené s črevom sa zúčastňuje nielen miestnych, ale aj celkových imunitných reakcií. Zloženie črevnej mikroflóry môže potom ovplyvniť účinnosť imunitných odpovedí, a tým aj celkovú obranyschopnosť organizmu. Dokazuje to skutočnosť, že nevhodná mikroflóra sa môže podieľať na vzniku zápalových chorôb čriev (*inflammatory bowel disease*) (Podolsky, 1991 a,b), Crohrovej choroby a ulceróznej kolitídy (Sartor, 1995) a ďalších chorôb s autoimunitnou patogenézou, vrátane niektorých reumatických chorôb (Krause a spol., 1996). Celkový stimulačný účinok črevnej mikroflóry na imunitný systém dokazuje aj skutočnosť, že v jej neprítomnosti sa nepozoruje vznik reakcie štepu proti hostiteľovi (GVHR) pri alogénných transplantáciách. Preto u príjemcov transplantovanej kostnej drene preventívny účinok pred infekciou a GVHR má mikrobiologická dekontaminácia tráviaceho ústrojenstva (Vossen a spol., 1990).

Z uvedeného vyplýva, že počas ľudského života je výhodné regulovať zloženie črevnej mikroflóry. Dá sa to uskutočniť pomocou **funkčných požívatín**, ako sú tradičné kyslomliečne produkty (jogurt, zakysanka, kefirové mlieko, Maconi a pod.). Pri výrobe kyslomliečnych nápojov, ako aj syrov, sa uplatňujú najmä baktérie mliečneho kysnutia. Treba však zdôrazniť, že typické jogurtové baktérie (*Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*) neprekonajú kyslé prostredie v žalúdku a teda nie sú ani schopné kolonizovať črevo. Túto vlastnosť majú len niektoré probiotické baktérie, ktoré prechádzajú cez žalúdok živé a po prechode do čreva sa v ňom uchytia a rozmnožia. Príkladom takéhoto probiotického mikróba je *Enterococcus faecium* M-74. Zistili sme, že tento enterokok má významné imunostimulačné, antimutagénne a hypocholesterolemické účinky, po perorálnom podaní kapsúl, ktoré ho obsahujú v lyofilizovanej forme (Ebringer a spol., 1995; Mikeš a spol., 1995). Vzhľadom na možnosť jednoduchšej aplikácie a skladovania sme v spolupráci s L.D.C. Holding, a.s., závod Pečivárne, Sereď pripravili obľákové rezy, ktoré vo svojej náplni obsahujú lyofilizovaný *E. faecium* M-74. Výsledky klinickej a experimentálnej štúdie tejto funkčnej požívatiny boli v skrátenej forme prednesené na 13. svetovom kongrese kardiológie (Mikeš a spol., 1998) a podrobne sa uvádzajú v tejto práci.

## Metódy

Obľákové rezy Dr. Ebi mali hmotnosť 28 g a obsahovali priemerné  $5 \cdot 10^9$  lyofilizovaných zárodkov *E. faecium* M-74. Tento kmeň bol pôvodne izolovaný ako monokultúra zo stolice kojenca kojeného materským mliekom. V štúdiu sa použil lyofilizovaný preparát pripravený firmou Medipharm, Hustopeče u Brna.

Na štúdiu sa zúčastnilo celkovo 28 osôb (mužov vo veku 31—74 rokov, priemer 60,4 roka) formou randomizovaného dvojitého

**Tab. 1. The mean INT-reductase activities of peripheral neutrophilic granulocytes (Ne) in subjects daily given waffles containing lyophilized *E. faecium* M-74 (Ef) and subjects given placebo waffles (Pl).**

**Tab. 1. Priemerné hodnoty INT-reduktázovej aktivity periférnych neutrofilných granulocytov (Ne) osôb denne konzumujúcich obľátkové rezy obsahujúce lyofilizovaný *E. faecium* M-74 (Ef) a osôb užívajúcich placebové rezy (Pl).**

Čas (v týždňoch) Time (in weeks)	Ne (K)		Ne + ZO		Ne + PMA		Ne + ZO/K		Ne + PMA/K	
	Ef	Pl	Ef	Pl	Ef	Pl	Ef	Pl	Ef	Pl
0 (pred, before)	5,9	6,8	46	50	47	48	7,9	7,4	8,0	7,0
2 (pred, before)	6,6	7,2	47	51	46	51	7,2	7,0	7,4	7,1
5 (Ef alebo, or Pl)	6,9	6,9	52	50	49	48	7,4	7,3	7,3	7,0
8 (Ef alebo, or Pl)	5,8	7,0	<b>60<sup>a</sup></b>	52	<b>57<sup>a</sup></b>	51	<b>10,6<sup>b</sup></b>	7,5	<b>10,1<sup>b</sup></b>	7,3
11 (Ef alebo, or Pl)	5,5	5,9	<b>71<sup>a</sup></b>	48	<b>59<sup>a</sup></b>	46	<b>13,0<sup>a</sup></b>	<b>7,9 1</b>	<b>0,7<sup>a</sup></b>	7,6
14 (po Ef a Pl) (after Ef and/or Pl)	6,7	6,5	44	45	40	44	6,8	7,1	<b>6,1<sup>b</sup></b>	6,8
17 (po, after Ef)	<b>7,4<sup>b</sup></b>	—	48	—	46	—	<b>6,5<sup>c</sup></b>	—	<b>6,2<sup>b</sup></b>	—
23 (Ef po Pl) (Ef after Pl)	—	<b>7,7<sup>c</sup></b>	—	<b>70<sup>a</sup></b>	—	<b>57<sup>b</sup></b>	—	<b>9,2<sup>b</sup></b>	—	<b>7,5</b>

INT-reductase activity is expressed as fmol formazan formed by a single neutrophil during 30 min incubation at 37°C. The results represent mean values of 14 subjects in each group (Ef and/or Pl). For the clearness, only statistical significance comparing individual values during the study to the starting values before waffle administration (time 0 and 2) are shown.

Statistical significance: <sup>a/</sup> p < 0.0001, <sup>b/</sup> p < 0.001, <sup>c/</sup> p < 0.01.

K — controls — only pure Ne were incubated.

ZO — Ne were incubated in the presence of opsonized zymosan.

PMA — Ne were incubated in the presence of phorbol myristate acetate.

ZO/K — ratio of values obtained after the incubation of Ne in the presence of ZO and pure Ne.

PMA/K — ratio of values obtained after the incubation of Ne in the presence of PMA and pure Ne.

Výsledky sa udávajú vo femtomóloch formazánu utvoreného jedným neutrofilom počas 30 min inkubácie pri 37°C. Sú to priemerné hodnoty získané od 14 osôb v každej skupine (Ef a Pl). Pre prehľadnosť sa uvádza len štatistická významnosť pri porovnaní jednotlivých hodnôt počas štúdie s východiskovými hodnotami pred podávaním obľátkových rezov (čas 0 a 2).

Štatistická významnosť: <sup>a/</sup> p < 0,0001, <sup>b/</sup> p < 0,001, <sup>c/</sup> p < 0,01.

K — kontroly — inkubovali sa len čisté Ne.

ZO — Ne sa inkubovali v prítomnosti opsonizovaného zymozánu.

PMA — Ne sa inkubovali v prítomnosti forbolmyristátacetátu.

ZO/K — pomer hodnôt získaných pri inkubácii Ne so ZO a čistých Ne

PMA/K — pomer hodnôt získaných pri inkubácii Ne s PMA a čistých Ne.

slepého pokusu kontrolovaného placebo. Všetci účastníci štúdie boli poučení o jej metodike a cieľoch a súhlasili s ňou. Súčasne boli vyzvaní dodržiavať diétu zodpovedajúcu ich bežným zvyklostiam. Štúdiu schválila Etická komisia Ústavu preventívnej a klinickej medicíny v Bratislave. Účastníci boli rozdelení do dvoch skupín po 14 osôb.

Osoby v prvej skupine dostávali denne (vždy ráno) jeden obľátkový rez Dr. Ebi počas 9 týždňov. Dvakrát pred podaním prvého rezu (dva týždne a tesne predtým), každé tri týždne počas podávania, ako aj tri a šesť týždňov po skončení podávania sa každému účastníkovi odobrala krv a vzorky stolice na vyšetrenie.

Celá štúdia v prípade prvej skupiny (jej členovia konzumovali obľátkové rezy obsahujúce *E. faecium*) trvala 17 týždňov.

Osoby v druhej — placebovej skupine dostávali v rovnakom čase obľátkové rezy toho istého zloženia a vzhľadu ako osoby v prvej skupine, ale tieto rezy neobsahovali lyofilizované zárodoky *E. faecium* M-74. Placebová skupina sa sledovala v rovnakých časo-

vých intervaloch ako osoby prvej skupiny počas 14 týždňov. 15. týždeň namiesto placebových obľátkových rezov začali dostávať rezy obsahujúce *E. faecium* M-74 a v tom pokračovali ďalších deväť týždňov. Štúdia v druhej skupine trvala celkovo 23 týždňov.

Vo všetkých uvedených časových intervaloch sa z periférnej krvi izolovali polymorfonukleárne leukocyty (obsahovali vždy minimálne 95 % neutrofilov) a v nich sa určovala schopnosť produkovať reaktívne metabolity kyslíka na základe redukcie jódrotetrazólia (INT-test), produkcia superoxidu a aktivita enzýmov: elastázy, myeloperoxidázy (MPO), lyzozýmu a β-D-glukuronidázy (BDG). Všetky tieto ukazovatele sa zisťovali metódami opísanými v našich predchádzajúcich prácach (Ferenčík a spol., 1988; Mikeš a spol., 1995). V súčasne izolovaných periférnych krvných mononukleárných bunkách sa určovala schopnosť produkovať protilátky triedy IgG po polyklonovej aktivácii B-lymfocytov "pokeweed" mitogénom (PWM) alebo stafylokokovým proteínom A (PrA) (Jahnová a spol., 1994).

**Tab. 2. The mean activities of myeloperoxidase (MPO) and lysozyme of peripheral neutrophils in subjects daily given waffles containing *E. faecium* M74 (Ef) and subjects given placebo waffles (Pl).**

**Tab. 2. Priemerné aktivity myeloperoxidázy (MPO) a lysozýmu v periférnych neutrofiloch osôb denne konzumujúcich obľátkové rezy obsahujúce lyofilizovaný *E. faecium* M-74 (Ef) a osôb užívajúcich placebové rezy (Pl).**

Čas (v týždňoch)	MPO		Lysozým	
	Ef	Pl	Ef	Pl
0 (pred, before)	2,1	2,0	0,44	0,43
2 (pred, before)	2,2	2,0	0,48	0,39
5 (Ef alebo, or Pl)	<b>2,6<sup>c</sup></b>	2,0	<b>0,94<sup>a</sup></b>	<b>0,56<sup>b</sup></b>
8 (Ef alebo, or Pl)	<b>3,8<sup>a</sup></b>	2,3	<b>0,84<sup>a</sup></b>	<b>0,56<sup>b</sup></b>
11 (Ef alebo, or Pl)	<b>2,5<sup>c</sup></b>	2,1	0,54	0,41
14 (po Ef a Pl) (after Ef and Pl)	<b>2,7<sup>b</sup></b>	2,3	0,50	0,44
17 (po, after Ef)	2,4	—	0,50	—
23 (Ef po, after Pl)	—	2,1	—	0,40

MPO activities are expressed as ncat/10<sup>6</sup> neutrophils (Ne), lysozyme activities are in µg/10<sup>6</sup> Ne, the remaining data are the same as under tab. 1. Aktivity MPO sa uvádzajú v nkat/10<sup>6</sup> neutrofilov, hodnoty lysozýmu sú v µg/10<sup>6</sup> neutrofilov, ostatné údaje sú rovnaké ako pod tab. 1.

V krvnom sére sa vyšetřovala hladina celkového cholesterolu a jeho frakcií (HDL, LDL, VLDL), triacylglyceroly, močovina, kreatinín, alkalická fosfatáza a jej izoenzýmy, aktivita enzýmov AST, ALT a GMT. Okrem toho sa vždy zisťoval aj krvný obraz.

V stolici sa kvantitatívne určovalo vylučovanie *E. faecium* a aktivita β-D-glukuronidázy (Mikeš a spol., 1995).

Určovanie počtu živých baktérií *E. faecium* v jednotlivých baleniach obľátkových rezov, ako aj počas ich jednorozhodného skladovania, sa robilo v niekoľkotýždňových intervaloch zriedovacou metódou a počítaním kolónií na platniach s kultivačným médiom Slanetz a Bartley od firmy Oxoid.

Všetky výsledky sa spracovali štatisticky metódou dvojcestnej analýzy variácie (ANOVA), Studentovým t-testom vo Welchovej modifikácii a Wilcoxonovým testom.

## Výsledky

V tabulke 1 sú priemerné INT-reduktázové aktivity periférnych neutrofilov izolovaných z krvi osôb prvej skupiny konzumujúcich obľátkové rezy obsahujúce *E. faecium* M-74 (Ef), ako aj druhej skupiny osôb, ktorí jedli rovnaké obľátkové rezy, ale bez baktérií (placebo — Pl). Štatisticky významné zvýšenie INT-reduktázovej aktivity sa pozorovalo len u osôb prvej skupiny po 8 a 11 týždňoch štúdie, a to vtedy, keď sa neutrofilové inkubovali v prítomnosti opsonizovaného zymozánu (ZO — fagocytový stimul) alebo forbolmyristátacetátu (PMA — rozpustný stimul). Osobám placebovej skupiny sa po skončení prvej časti štúdie (14 týždňov) začali podávať rezy s lyofilizovanou kultúrou *E. faecium* M-74 a po ďalších 8 týždňoch sa aj v ich neutrofiloch zistili významne zvýšené hodnoty INT-reduktázovej aktivity.

Okrem redukcie INT sa v neutrofiloch oboch skupín sledovala aj produkcia superoxidu. Dosiahnuté výsledky boli analogické ako pri redukcii INT, preto sa neuvádzajú v osobitnej tabulke.

**Tab. 3. The mean activities of granulocyte elastase and β-D-glucuronidase (BDG) in peripheral neutrophils of subjects daily given waffles containing *E. faecium* M-74 (Ef) and subjects given placebo waffles (Pl).**

**Tab. 3. Priemerné aktivity granulocytovej elastázy a β-D-glukuronidázy (BDG) v periférnych neutrofiloch osôb denne konzumujúcich obľátkové rezy obsahujúce lyofilizovaný *E. faecium* M-74 a osôb užívajúcich placebové rezy (Pl).**

Čas (týždne)	Elastáza		BDG	
	Ef	Pl	Ef	Pl
0 (pred, before)	164	169	6,2	6,5
2 (pred, before)	174	178	6,3	6,3
5 (Ef alebo, or Pl)	<b>190<sup>c</sup></b>	172	5,7	6,3
8 (Ef alebo, or Pl)	<b>221<sup>a</sup></b>	190	6,4	6,8
11 (Ef alebo, or Pl)	<b>205<sup>b</sup></b>	178	6,4	6,2
14 (po Ef a Pl) (after Ef and Pl)	185	187	6,2	6,3
17 (po, after Ef)	184	—	6,0	—
23 (Ef po, after Pl)	—	208 <sup>b</sup>	—	5,9

Activities of elastase and BDG are expressed as pcat/10<sup>6</sup> neutrophils, the remaining data are the same as under tab. 1. Aktivity elastázy aj BDG sa uvádzajú v pcat/10<sup>6</sup> neutrofilov, ostatné údaje sú rovnaké ako pod tab. 1.

Z oboch skupín sa náhodne vybralo 15 osôb, ktorým sa po 2—4 mesiacoch uplynutých od posledného podania obľátkových rezov začali podávať opäť rezy obsahujúce *E. faecium*. Priemerná schopnosť ich periférnych neutrofilov redukovať INT bola tesne pred týmto opakovaným podaním 55,1 fmol/neutrofil po aktivácii opsonizovaným zymozánom (ZO) a 45,0 fmol po aktivácii forbolmyristátacetátom (PMA). Po 6 týždňoch opätovného jedenia obľátkových rezov s lyofilizovaným enterokokom sa tieto hodnoty zvýšili na 76,4 fmol (ZO), resp. 58,8 fmol/neutrofil (PMA), čo je porovnateľné s hodnotami nájdenými po 9 týždňoch jedenia takýchto rezov osobami prvej sledovanej skupiny (tab. 1).

V tabulkách 2 a 3 sú výsledky sledovania zmien aktivít niektorých lysozómových enzýmov v periférnych neutrofiloch oboch skupín osôb zúčastnených na štúdiu. Vyplýva z nich, že myeloperoxidáza (MPO) mala zvýšené aktivity počas celého obdobia, v ktorom účastníci jedli rezy obsahujúce lyofilizovaného enterokoka a ešte aj tri týždne potom. V leukocytoch osôb, ktorým sa podávali placebové obľátkové rezy sa takéto zvýšenie nepozorovalo. Počas podávania rezov s enterokokom sa v leukocytoch zvyšovali aj priemerné aktivity lysozýmu. Tieto aktivity však boli zvýšené, aj keď v menšej miere, aj v leukocytoch osôb, ktoré jedli placebové rezy (tab. 2). Po 3—9 týždňoch podávania rezov s enterokokom sa v neutrofiloch zistili aj zvýšené priemerné hodnoty elastázy, kým aktivity β-D-glukuronidázy sa nemenili (tab. 3).

Periférne krvné mononukleárne bunky (PBMC — *peripheral blood mononuclear cells*) osôb, ktoré jedli obľátkové rezy obsahujúce enterokoka, majú zvýšenú schopnosť tvoriť polyklonové protilátky triedy IgG po mitogénovej stimulácii i bez nej (tab. 4). Táto schopnosť pretrvávala ešte aj tri týždne po skončení podávania týchto rezov. V PBMC probantov, ktorí jedli placebové rezy, žiadna aktivácia tvorby protilátok sa nepozorovala. Ak sa však u týchto osôb placebové obľátkové rezy po 14 týždňoch nahradili rezmi s enterokokom, po ďalších 8 týždňoch aj ich PBMC mali významne zvýšenú schopnosť produkovať polyklonové IgG.

**Tab. 4. Production of IgG antibodies by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in subjects daily given waffles containing lyophilized *E. faecium* M-74 (Ef) and subjects given placebo waffles (Pl).**

**Tab. 4. Produkcia protilátok IgG periférnymi krvnými mononukleárnymi bunkami (PBMC) izolovanými od osôb denne konzumujúcich obľátkové rezy obsahujúce lyofilizovaný *E. faecium* M-74 (Ef) a osôb užívajúcich placebové rezy (Pl).**

Čas (týždne)	PBMC		PBMC + PWM		PBMC + PrA	
Time (weeks)	Ef	Pl	Ef	Pl	Ef	Pl
0 (pred, before)	0,154	0,350	0,211	0,665	1,918	1,563
2 (pred, before)	0,340	0,410	0,500	0,750	2,241	1,680
5 (Ef alebo, or Pl)	<b>1,066<sup>b</sup></b>	0,620	<b>1,326<sup>b</sup></b>	0,487	<b>3,353<sup>b</sup></b>	1,400
8 (Ef alebo, or Pl)	0,316	0,537	0,328	0,689	2,579	1,860
11 (Ef alebo, or Pl)	<b>1,719<sup>a</sup></b>	0,640	<b>2,201<sup>a</sup></b>	0,804	<b>8,446<sup>a</sup></b>	1,760
14 (po Ef a Pl)	<b>0,998<sup>c</sup></b>	0,580	<b>1,180<sup>b</sup></b>	0,395	<b>5,364<sup>a</sup></b>	1,783
(after Ef and Pl)						
17 (po, after Ef)	0,152	—	0,250	—	2,400	—
23 (Ef po, after Pl)	—	<b>1,431<sup>b</sup></b>	—	<b>1,870<sup>b</sup></b>	—	<b>4,621<sup>a</sup></b>

The mean values of IgG are expressed as g/L of incubation medium.

PBMC — incubation of pure PBMC,

PWM — incubation of PBMC in the presence of pokeweed mitogen (5 mg/L),

PrA — incubation of PBMC in the presence of staphylococcal protein A (5 mg/L).

The remaining data are the same as under tab. 1.

Priemerné hodnoty IgG sa vyjadrujú v g/L inkubačného média.

PBMC — inkubácia čistých PBMC,

PWM — inkubácia PBMC v prítomnosti "pokeweed" mitogénu (5 mg/L),

PrA — inkubácia PBMC v prítomnosti stafylokokového proteínu A (5 mg/L).

Ostatné údaje sú rovnaké ako pod tab. 1.

Už po troch týždňoch podávania obľátkových rezov obsahujúcich *E. faecium* M-74 sa výrazne zvýšil počet enterokov vylučovaných stolicou a tento pretrvával ešte aj po šiestich týždňoch od ukončenia podávania (tab. 5). Osoby, ktoré dostávali placebové rezy, mali počet enterokokov v stolici významne menší a relatívne veľmi konštantný, v priebehu štúdie sa nemenil. Priemerné aktivity  $\beta$ -D-glukuronidázy v stolici boli významne znížené počas celého podávania rezov s enterokokom a ešte aj šesť týždňov po jeho skončení. V skupine osôb konzumujúcich placebové rezy boli priemerné aktivity tohto enzýmu v stolici vyššie a počas štúdie sa významnejšie nemenili (tab. 5).

V tabuľke 6 sa uvádza viabilita (prežívanie) lyofilizovaných baktérií *E. faecium* M-74 v rôznych druhoch obľátkových náplní (vanilkovej, kakaovej, kokosovej a dia) počas ich jednoročného skladovania pri chladničkovj (4–6 °C) a laboratórnej teplote (20–24 °C).

Z biochemických ukazovateľov, ktoré sme u všetkých účastníkov štúdie sledovali, sa nezistili žiadne významné zmeny v priemerných hladinách močoviny, kreatinínu, alkalickéj fosfatázy a jej izoenzymov, enzymov AST, ALT a GMT, ani v krvnom obraze. Rovnako sme nenašli štatisticky významne znížené priemerné hladiny sérového cholesterolu a LDL.

## Diskusia

Termínom **probiotiká** sa označujú živé mikroorganizmy, ktoré ako potravinové doplnky prispievajú k udržaniu zdravotne prospešnej mikrobiologickej rovnováhy v tráviacom trakte človeka alebo iného hostiteľa (Fuller, 1989; Havenaar a Spanhaak, 1994; Mikula a spol., 1998). Do tejto kategórie patria aj baktérie mliečného kysnutia, ako *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidop-*

*hilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. casei*, *Streptococcus thermophilus* a rôzne bifidobaktérie). Pravidelná konzumácia mliečnych výrobkov fermentačne opracovaných týmito baktériami sa považuje za jednu z hlavných príčin dlhovekosti niektorých obyvateľov Kaukazu, Bulharska a iných krajín. Aj iné mnohoročné pozorovania poukazujú na ich prospešný vplyv na ľudské zdravie.

Od probiotík sa odlišujú **prebiotiká**. Sú to rôzne nestráviteľné potravinové ingrediencie, ktoré selektívne stimulujú rast alebo

**Tab. 5. Mean number of *E. faecium* and mean activities of  $\beta$ -D-glucuronidase in stools of subjects eating waffles containing enterococci (Ef) and/or placebo waffles (Pl).**

**Tab. 5. Vylučovanie *E. faecium* a priemerné aktivity  $\beta$ -D-glukuronidázy v stolici osôb, ktoré jedli obľátkové rezy s enterokokom (Ef) alebo placebové rezy (Pl).**

Čas (týždne)	<i>E. faecium</i>		$\beta$ -D-glucuronidase	
	Ef	Pl	Ef	Pl
0 (pred, before)	5,55	5,28	0,38	0,31
2 (pred, before)	5,60	5,29	0,35	0,37
5 (Ef alebo, or Pl)	<b>6,78<sup>b</sup></b>	5,37	<b>0,19<sup>b</sup></b>	0,29
8 (Ef alebo, or Pl)	<b>7,82<sup>a</sup></b>	5,29	<b>0,11<sup>a</sup></b>	0,36
11 (Ef alebo, or Pl)	<b>8,04<sup>a</sup></b>	5,26	<b>0,10<sup>a</sup></b>	0,39
14 (po Ef a Pl)	<b>6,66<sup>b</sup></b>	5,27	<b>0,14<sup>a</sup></b>	0,32
(after Ef and Pl)				
17 (po Ef a Pl)	<b>6,28<sup>c</sup></b>	5,31	<b>0,12<sup>a</sup></b>	0,34
(after Ef and Pl)				

The results are expressed as log of viable *E. faecium* organisms per g of wet stool. Activities of  $\beta$ -D-glucuronidase are in  $\mu$ cat/g of wet stool. Výsledky sa udávajú v log počtu živých zárodkov *E. faecium* na gram stolice. Aktivity  $\beta$ -D-glukuronidázy sú v  $\mu$ cat/g stolice.

**Tab. 6. Viability of lyophilized bacteria *E. faecium* M-74 in various kinds of waffle fillings during storage at different temperatures. Tab. 6. Prežívanie lyofilizovaných baktérií *E. faecium* M-74 v rôznych druhoch oblátkových náplní počas ich skladovania pri rôznych teplotách.**

Doba skladovania v týždňoch	Náplň Filling							
	vanilková vanilla		kakaová cocoa		kokosová coconut		DIA DIA	
Storage time in weeks	4-6 °C	20-24 °C	4-6 °C	20-24 °C	4-6 °C	20-24 °C	4-6 °C	20-24 °C
1	29 <sup>x</sup>	27	35	39	32	29	30	29
8	19	23	30	39	38	29	25	20
12	14	19	40	38	38	29	18	36
16	17	25	38	40	19	25	19	16
21	21	42	45	40	39	13	21	40
26	29	49	38	7,3	42	21	32	29
31	40	33	18	6,7	24	9,1	18	12
37	12	24	24	12	18	8,2	14	10
45	10	10	11	1,8	12	1,1	24	18
52	14	12	12	1,2	10	1,0	18	20

<sup>x</sup> - Number of viable organisms multiplied by 10<sup>8</sup>.

Počet životaschopných zárodkov krát 10<sup>8</sup>.

aktivitu zdravotne prospešných baktériových druhov v čreve hostiteľa (Fuller a Gibson, 1997). Medzi najstaršie prebiotiká patrí laktulóza, ktorá zvyšuje počet bifidobaktérií v čreve malých detí na umelej výžive.

V predaji je množstvo probiotických preparátov vo forme tabliet, kapsulí alebo prášku, väčšinou s označením "Acidophilus", ktoré sa odporúčajú na prospešné vybalansovanie črevnej mikroflóry. Životnosť baktérií mliečneho kysnutia je však v týchto prípravkoch obmedzená. Zvyčajne trvá pár mesiacov, ale len keď sa skladujú v chladničke pri 4 °C. Ešte viac obmedzenú životnosť majú probiotické baktérie v jogurtoch — iba niekoľko dní, napríklad často dlhším záručným lehotám uvádzaným výrobcami. Okrem toho tieto prípravky nie sú pod pravidelnou mikrobiologickou kontrolou a nemusia vždy obsahovať deklarované baktériové druhy ani počty zárodkov. Napríklad pri kontrole 13 probiotických preparátov, ktoré sú na trhu vo Veľkej Británii, len v dvoch prípadoch sa našlo to, čo výrobca uvádzal na obale (Hamilton-Miller a spol., 1996). Preto sa hľadajú spôsoby na predĺženie životaschopnosti probiotických baktérií v komerčných požívatinách.

Príkladom takejto funkčnej požívatiny s významne predĺženou životaschopnosťou lyofilizovaných baktérií sú oblátkové rezy Dr. Ebi obsahujúce *E. faecium* M-74. Možno ich skladovať minimálne pol roka pri teplote miestnosti prakticky bez zníženia účinnosti.

Z predloženej štúdie vyplýva, že ľudia počas pravidelnej konzumácie týchto rezov majú štatisticky významne zvýšené hodnoty INT-reduktázovej aktivity a produkcie superoxidu v periférnych neutrofiloch (tab. 1). Tieto zvýšené hodnoty sa dokázali v podmienkach *ex vivo* tak v prítomnosti fagocytovateľného stimulu (opsonizované častice zymošanu), ako aj v prítomnosti rozpustného stimulu (forbolmyristátacetát). Tri týždne po skončení podávania takýchto oblátkových rezov sa zvýšená produkcia superoxidu a schopnosť redukovať INT upravila približne na východiskové hodnoty. Počas rovnako dlhého 9-týždňového podávania placeboých oblátkových rezov (bez enterokokov) sa nepozorovali

žiadne zmeny v schopnosti neutrofilov vyšetrovaných osôb produkovať reaktívne formy kyslíka.

Redukcia INT odráža schopnosť leukocytov aktivovať svoj kyslíkový metabolizmus (respiračné vzplanutie), pri ktorom vzniká superoxid, peroxid vodíka a ďalšie toxické produkty, ktoré sa zásadným spôsobom zúčastňujú usmrcovania a likvidácie patogénnych mikroorganizmov počas fagocytózy (Ferenčík, 1993).

Tieto výsledky dokazujú, že: a) za zvýšenie schopnosti neutrofilov aktivovať svoj kyslíkový metabolizmus jednoznačne zodpovedá prítomný kmeň *E. faecium* a nie iná zložka oblátkových rezov, b) *E. faecium* zvyšuje schopnosť periférnych leukocytov odpovedať obrannou reakciou na rôzne patogénne mikroorganizmy, ktoré sa dostali do tela. Ide tak o stimuláciu jedného z najdôležitejších mechanizmov prirodzenej imunity človeka, lebo sa predpokladá, že neutrofilné granulocyty sú schopné bez vážnejších klinických príznakov zlikvidovať väčšinu infekčných príhod, s ktorými sa človek počas svojho života stretáva (Ferenčík a Kačáni, 1994).

Myeloperoxidáza (MPO) je dôležitou súčasťou myeloperoxidázového systému (skladá sa z MPO, peroxidu vodíka a chloridových alebo jodidových iónov), ktorý je najúčinnjším antimikrobiálnym a cytotoxickým mechanizmom leukocytov človeka a ostatných cicavcov. Zvýšená aktivita MPO, ktorú sme našli v neutrofiloch osôb konzumujúcich oblátkové rezy s lyofilizovaným enterokokom (tab. 2), je logickým dôsledkom už uvedenej aktivácie kyslíkového metabolizmu neutrofilov pretože umožňuje účinnšie využiť vznikajúce toxické radikály kyslíka v obrane proti invadujúcim mikróbov, ale aj v niektorých metabolických reakciách, ako je napríklad metabolizmus cholesterolu (Mikeš a spol., 1995).

Zaujímavé je zvýšenie priemerných aktivít leukocytovej elastázy počas podávania oblátkových rezov obsahujúcich *E. faecium* (tab. 3). Elastáza môže mať na jednej strane antimikrobiálne účinky, ale na druhej strane sa môže zúčastňovať poškodzovania vlastných bunkových štruktúr a glykoproteínov medzibunkovej hmoty pri

niektorých patologických reakciách. To však platí aj pre už spomenutý myeloperoxidázový systém.

Tvorba protilátok sa určovala na základe produkcie imunoglobulínov (IgG) počas inkubácie PBMC *in vitro* v kultivačnom médiu. Podstatne vyššia tvorba IgG sa pozorovala vtedy, keď sa PBMC inkubovali v prítomnosti proteínu A (PrA), ktorý je špecifickým mitogénom B-lymfocytov, ako keď sa PBMC inkubovali samotné, prípadne v prítomnosti PWM, mitogénu T- aj B-lymfocytov (tab. 4). Protilátky syntetizujú plazmatické bunky vznikajúce diferenciaciou B-lymfocytov, ktoré sa nachádzajú v PBMC. Tieto výsledky preto naznačujú, že *E. faecium* aktivuje priamo B-lymfocyty, a tak zvyšuje ich schopnosť tvoriť protilátky po mitogénovom alebo antigénovom stimule.

Jednou z úloh tejto štúdie bola aj potreba zistiť, či *E. faecium* podávaný formou obľákových rezov je schopný účinne kolonizovať črevný trakt človeka. Za tým účelom sa určovalo vylučovanie týchto baktérií v stolici. Výsledky sú v tabuľke 5 a dokazujú, že maximálne množstvo enterokokov v stolici sa vylučuje po 6-týždňovom dennom podávaní jedného rezu. Na udržanie takejto kolonizácie bude potom stačiť udržiavacia dávka pravdepodobne nie viac ako jeden rez každé 3–4 dni.

Pozorované zníženie aktivity  $\beta$ -D-glukuronidázy v stolici osôb pravidelne konzumujúcich obľákové rezy s lyofilizovaným enterokokom (tab. 5) poukazuje na možný ochranný účinok proti pôsobeniu karcinogénov. *E. faecium* nemá na rozdiel od mnohých iných črevných baktérií aktívne azoreduktázy, nitroreduktázy a  $\beta$ -D-glukuronidázu, enzýmy, ktoré sú schopné premieňať prokarcinogény na účinné karcinogény (Goldin a Gorbach, 1984, 1992; Marteau a Rambaud, 1993).

Na rozdiel od našej predchádzajúcej štúdie (Mikeš a spol., 1995), v ktorej sme po viactýždňovej aplikácii lyofilizovaného *E. faecium* M-74 v kapsulách pozorovali významné zníženie priemerných hladín celkového cholesterolu a LDL a zvýšenie hladín HDL v sére sledovaných osôb, v tejto štúdii sme takéto zmeny zistili len u niektorých osôb, ale nie aj na úrovni celého sledovaného súboru.

Z technologického hľadiska dôležité je prežítie zárodok *E. faecium* v hotových výrobkoch — obľákových náplniach pri rôznych teplotách skladovania, lebo len živé zárodoky môžu kolonizovať črevný trakt. Toto sledovanie sme robili vo vanilkovej, kakaovej, kokosovej a dia náplni. Z výsledkov (tab. 6) vidieť, že počty zárodokov, ak sa tieto náplne skladovali pri 4–6 °C, sa počas jedného roka významnejšie nemenili. Ak skladovacia teplota bola 20–24 °C, prakticky sa nemenila ani životnosť zárodokov vo vanilkovej a dia náplni, kým v kakaovej a kokosovej náplni sa po ročnom skladovaní znížila z pôvodných hodnôt  $2,9\text{--}3,9 \cdot 10^9$  na hodnoty približne  $1 \cdot 10^8$  v množstve náplne, ktorá sa používa pre jeden obľákový rez s hmotnosťou 28 g. Po polročnom skladovaní (expiračná doba obľákových tyčínok Dr Ebi) boli však všetky zmeny v počte životaschopných zárodokov nevýznamné.

Z dosiahnutých výsledkov jednoznačne vyplýva, že kolonizácia tráviaceho ústrojenstva kmeňom *E. faecium* M-74 má za následok stimuláciu základného zariadenia prirodzenej imunity — fagocytózy, ako aj polyklonovú stimuláciu B-lymfocytov a následne aj tvorby protilátok, ktoré majú zase kľúčový význam pri vzniku špecifickej (získanej) imunity. Ide o jeden z mála doteraz preukazných dôkazov imunostimulačného pôsobenia baktérií

mliečného kysnutia podávaných formou funkčnej požívatiny získanej priamo v klinickej štúdii.

*E. faecium* a iné baktérie mliečného kysnutia okrem týchto imunostimulačných účinkov môžu aktivovať aj produkciu niektorých cytokínov, najmä interferónu-gama (Fuller, 1989; Havenaar a Spanhaak, 1994). Aj keď väčšina zdravotne prospešných aktivít probiotík sa uplatňuje v prevencii, objavujú sa správy o tom, že *E. faecium* môže pôsobiť aj terapeuticky pri akútnych hnačkách vyvolaných baktériami rezistentnými na antibiotiká (Wunderlich, 1989), pri anaeróbných infekciách tráviaceho ústrojenstva (McFarland a Elmer, 1997), ako aj u pacientov s cirhózou pečene (Loguercio a spol., 1995).

## Literatúra

**Berg R.D.:** The indigenous gastrointestinal microflora. Trends Microbiol., 4, 1996, 430–435.

**Ebringer L., Ferencik M., Lahitová N., Kačáni L., Micháľková D.:** Antimutagenic and immunostimulatory properties of lactic acid bacteria. World J. Microbiol. Biotechnol., 11, 1995, s. 294–298.

**Falk P.G., Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.I.:** Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. Microbiol. Molec. Biol., 62, 1998, 1157–1170.

**Ferencik M.:** Handbook of Immunochemistry. S. 417–443. London—Glasgow—New York—Tokyo—Melbourne — Madras, Chapman and Hall 1993.

**Ferencik M., Kačáni L.:** Neutrofil — kľúčová bunka v obrane ľudského organizmu proti extracelulárne parazitujúcim baktériám a iným patogénom. Bull. Čs. Spol. Mikrobiol., 35, 1994, č. 2, s. 61–76.

**Ferencik M., Kotulová D., Masler L., Šandula J., Pružinec P.:** Imunomodulačný účinok glukánov na profesionálne fagocyty. Bratisl. lek. Listy, 89, 1988, s. 424–432.

**Ferencik M., Novák M., Rovenský J.:** Vzájomné vzťahy a prepojenia medzi imunitným a neuroendokrinným systémom. Bratisl. lek. Listy, 99, 1998, 454–464.

**Fuller R.:** Probiotics in man and animals. J. appl. Bacteriol., 66, 1989, 365–378.

**Fuller R., Gibson G.R.:** Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. Scand. J. Gastroenterol., 32, 1997, Suppl. 222, 28–31.

**Goldin B.R., Gorbach S.L.:** The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. Amer. J. Clin. Nutr., 39, 1984, s. 756–761.

**Goldin B.R., Gorbach S.L.:** Probiotics for humans. S. 355–376. In: Fuller R. (Ed.): Probiotics, the Scientific Basis. London, Chapman and Hall 1992.

**Gorbach S.L., Goldin B.R.:** The intestinal microflora and the colon cancer connection. Rev. Infect. Dis., 12, 1990, Suppl. 2, S252–S261.

**Hamilton-Miller J.M.T., Shah S., Smith C.T.:** “Probiotic” remedies are not what they seem. Brit. Med. J., 312, 1996, 55–56.

**Havenaar R., Spanhaak S.:** Probiotics from an immunological point of view. Curr. Opin. Biotechnol., 5, 1994, 320–325.

**Jahnová E., Ferencik M., Nyulassy Š., Devínsky F., Lacko I.:** Amphiphilic detergents inhibit production of IgG and IgM by human peripheral blood mononuclear cells. Immunol. Lett., 39, 1994, s. 71–75.

- Krause A., Kamradt T., Burmester G.R.:** Potential infectious agents in the induction of arthritides. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 8, 1996, 203—209.
- Loguercio C., Abbiati A., Rinaldi M., Romano A., Del Vecchio Blanco C., Coltorti M.:** Long-term effects of *Enterococcus faecium* SFF68 versus lactulose in the treatment of patients with cirrhosis and grade 1-2 hepatic encephalopathy. *J. Hepatol.*, 23, 1995, 39—46.
- Marteau P., Rambaud J.C.:** Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12, 1993, s. 227—230.
- McFarland L.V., Elmer G.W.:** Pharmaceutical probiotics for the treatment of anaerobic and other infections. *Anaerobe*, 3, 1997, 73—78.
- Mikeš Z., Ferencík M., Jahnová E., Ebringer L., Čížnár I.:** Hypocholesterolemic and immunomodulatory effects of orally applied *Enterococcus faecium* M-74 in man. *Folia Microbiol.*, 40, 1995, s. 639—646.
- Mikeš Z., Ferencík M., Jahnová E., Ebringer L., Čížnár I.:** Hypocholesterolemic and immunostimulatory effects of orally applied *Enterococcus faecium* M-74 in man. XIII World Congress of Cardiology. Rio de Janeiro 1998, Proceedings, s. 1175—1178.
- Mikula L., Sokol A., Tkáčiková L.:** Perspektíva probiotík v praxi. *Bull. Čs. Spol. Mikrobiol.*, 39, 1998, 120—133.
- Podolsky D.K.:** Inflammatory bowel disease (1). *New Engl. J. Med.*, 325, 1991 a, 928—937.
- Podolsky D.K.:** Inflammatory bowel disease (2). *New Engl. J. Med.*, 325, 1991 b, 1008—1916.
- Rotimi V.O., Duerden B.I.:** The development of the bacterial flora in normal neonates. *J. Med. Microbiol.*, 14, 1981, 51—62.
- Sartor R.B.:** Microbial factors in Crohn's disease, ulcerative colitis and experimental intestinal inflammation. S. 96—124. In: Kirstner J.B., Shorter R.G. (Eds.): *Inflammatory Bowel Disease*. Baltimore, Williams and Wilkins Co. 1995.
- Savage D.C.:** Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu. Rev. Microbiol.*, 31, 1977, 107—133.
- Vossen J.M., Heidt P.J., van den Berg H., Gerritse E.J., Hermans J., Dooren L.J.:** Prevention of infection and graft-versus-host disease by suppression of intestinal microflora in children treated with allogeneic bone marrow transplantation. *Europ. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 9, 1990, 14—23.
- Wunderlich P.F., Braun L., Fumagalli I., D'Apuzzo V., Heim F., Karly M.:** Double-blind report on the efficacy of lactic acid-producing enterococcus SF68 in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea and in the treatment of acute diarrhoea. *J. Int. Med. Res.*, 17, 1989, 333—338.

Received Januar 10, 1999.  
Accepted February 26, 1999.

---

#### PREDSTAVUJEME NOVÉ KNIHY

---

**Balint M.: Lékař, jeho pacient a nemoc.** Praha, Grada Publ. 1998, 331 strán.

Kniha je prekladom anglického originálu *The Doctor, his Patient and the Illness* (Churchill Livingstone, Londýn). Táto kniha významného psychoanalytika a učiteľa M. Balinta (pôvodom z Budapešti) vyšla len v Anglicku v rokoch 1955—1998 sedemnásťkrát! V knihe sú zúročené klinické skúsenosti autora, jeho presvedčenie, že ak chce praktický lekár vykonávať svoju činnosť komplexne a kompetentne, musí rozumieť nielen somatickým, ale aj psychickým a psychologickým komponentom chorôb, s ktorými k nemu prichádzajú jeho pacienti. Všimol si, že to, čo pacient v ordinácii lekára predkladá ako chorobu, je len časť celkového obrazu choroby. Podľa autora choroba nevzniká len narušením normálnych fyziologických funkcií človeka, infekciou, poranením, či prejavom genetických alebo vrodených príčin. Formovanie a prepuknutie choroby v pravom slova zmysle súvisí so „životným

štýlom“ pacienta, s jeho „životnými okolnosťami“. Autor považuje viac chorôb za dôsledok „nevyriešených emočných konfliktov“, ktoré sa nemusia prejaviť psychologicky, ale somaticky. Nestačí preto liečiť telesné príznaky chorôb, ale je potrebné liečiť aj príznaky duševné, hoci ich nemožno považovať za duševnú chorobu. Autor je presvedčený, že praktický lekár musí liečiť nielen pacienta, ale aj jeho rodinu, jeho vzťahy s okolím, jeho pracovné podmienky ... Túto požiadavku vzťahuje aj na špecialistov. Autor hovorí, že je potrebné zmeniť situácie v ordináciách a spôsob komunikácie medzi lekárom a pacientom. Tieto názory M. Balinta sú dokumentované množstvom výstižných kazuistík, ktoré sú poučné pre každého lekára, či študenta medicíny alebo psychológie. Sme presvedčení, že kniha osloví každého záujemcu a pre mnohých bude znamenať významný posun pri porozumení pacientom, ich chorobám, ale možno aj lepšie porozumenie smerovania vlastného lekárskeho poslania.

M. Bernadič