

IMMUNOSTIMULATORY AND OTHER BENEFICIAL HEALTH EFFECTS OF LACTIC ACID BACTERIA

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

IMUNOSTIMULAČNÉ A INÉ ZDRAVOTNE PROSPEŠNÉ ÚČINKY BAKTÉRIÍ MLIEČNEHO KYSNUTIA

Summary

Lactic acid bacteria in functional foods can transiently colonize the intestine of man and exert beneficial probiotic effects. These 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 results showed significant immunostimulatory effect on both phagocytosis by neutrophils and antibody production.

Key words: probiotics, *Enterococcus faecium* M-74, neutrophils, IgG production.

Súhrn

Baktérie mliečného kysnutia nachádzajúce sa vo funkčných požívatinách môžu prechodne kolonizovať tráviaci trakt človeka a preukazovať prospešné probiotické účinky. Tieto účinky sa pozorovali v skupine dospelých osôb, ktoré denne dostávali lyofilizovaný kmeň *Enterococcus faecium* M-74 formou obľákových rezov (Dr. Ebi) počas 9 týždňov v dvojito zaslepenej klinickej štúdiu kontrolovanej placebom. Výsledky preukázali významný imunostimulačný účinok na fagocytózu neutrofilov a na tvorbu protilátok.

Kľúčové slová: probiotiká, *Enterococcus faecium* M-74, neutrofily, produkcia IgG.

Spomedzi niekoľkých desiatok tisíc doteraz známych druhov mikroorganizmov len nepatrná časť sa vyznačuje negatívnymi vlastnosťami — je patogénna alebo podmienene patogénna pre človeka, prípadne iných živočíchov alebo rastliny. Väčšina známych druhov baktérií je pre život na Zemi potrebná, užitočná a nenahraditeľná. Medzi užitočné mikroby patria aj baktérie mliečného kysnutia, ktoré sú v prírode veľmi rozšírené. Hojne sa vyskytujú na rastlinách a v tráviacom ústrojenstve všetkých živočíchov. Od nepamäti sa využívajú pri silážovaní, skvasovaní zeleniny a pri výrobe rôznych kyslomliečnych výrobkov.

V tráviacom ústrojenstve človeka sa nachádza asi jeden kilogram mikroorganizmov (najmä v hrubom čreve), ktoré sú príslušníkmi niekoľkých stoviek rôznych druhov. Ich druhové zloženie sa počas vývinu jedinca mení. Závisí od veku, diéty, ekologických a hygienických pomerov, ale aj od stresových situácií.

Veľký význam sa pripisuje najmä baktériám mliečného kysnutia (3, 8), ako sú laktobacily, streptokoky, bifidobaktérie a en-

terokoky, ktoré utvárajú v čreve mikroprostredie brániace pomnoženiu nielen patogénnych druhov, ale aj rôznych hníobných a iných menej prospešných baktérií. Tieto prospešné baktérie sa však počas ontogenetického vývinu z čreva strácajú a u starších osôb je ich už veľmi málo. Nahrádzajú ich pre zdravie jedinca menej výhodné druhy.

Klinické a experimentálne poznatky nasvedčujú, že črevná mikroflóra môže ovplyvňovať miestnu aj celkovú imunitnú kapacitu hostiteľa. Umožňuje to existencia črevného epitelu a osobitne lokálneho sliznicového imunitného systému — lymfoidného tkaniva združeného s črevom — *GALT* (*gut-associated lymphoid tissue*). Lymfocyty a ďalšie bunky imunitného systému lokalizované v *GALT* majú na svojom povrchu osobitný typ „mýtnych“ receptorov (*Toll receptors*), ktoré rozpoznávajú baktériové a potravinové antigény.

Tieto receptory môžu byť aj na epitelových bunkách a dokážu rozpoznať antigény patogénov, proti ktorým treba navodiť imunitnú odpoveď, od tolerogénnych potravinových antigénov. Ide o klasickú antigénovo prezentačnú funkciu, ktorú však v epitelových bunkách navodzujú *probiotiká*. Ako mediátor sa pritom uplatňuje najmä oxid dusnatý — NO (1).

Z uvedeného vyplýva, že sliznicové povrchy gastrointestinálneho traktu majú dve protikladné funkcie — navodenie *tolerantnosti* na environmentálne antigény (potravinové antigény a probiotiká) a navodenie *imunitnej odpovede* na patogénne mikroorganizmy.

Probiotiká sa charakterizujú ako *živé* mikroorganizmy, ktoré prospešne ovplyvňujú zdravie hostiteľa zlepšením skladby jeho

Institute of Immunology, Faculty of Medicine, Comenius University, Sarsinkova 4, 811 08 Bratislava, and Institute of Neuroimmunology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava; Department of Geriatrics, Faculty of Medicine, Comenius University; Institute of Molecular and Subcellular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava, and Institute of Preventive and Clinical Medicine, Bratislava
Correspondence to: M. Ferencik, PhD, DSc (e-mail: ferencik@fmed.uniba.sk)

Práca bola prezentovaná na Odbornej pracovnej konferencii pri príležitosti 80. výročia Lekárskej fakulty UK 12.-13.11.1999 v Bratislave.

črevnej mikroflóry (5). Ich najvýznamnejšími predstaviteľmi sú baktérie mliečného kysnutia. Podľa súčasných poznatkov predpokladané účinky probiotík na zdravie človeka sa prehľadne uvádzajú v tabuľke 1.

Črevná mikroflóra a hostiteľ tvoria jeden ekosystém, ktorý môže byť v pozitívnej alebo negatívnej rovnováhe. Nezastupiteľné miesto pri tvorbe pozitívnej a vyváženej rovnováhy majú baktérie mliečného kysnutia. V prípade ich nedostatku je potrebné túto rovnováhu obnoviť a regulovať. To je možné uskutočniť pomocou *funkčných požívatin*, ktoré tieto baktérie obsahujú v takej forme, že môžu kolonizovať gastrointestinálny trakt a normalizovať tak vzťah medzi črevnou mikroflórou a hostiteľom.

Na trhu aj u nás sa objavili rôzne probiotické preparáty, ktoré formou tabliet, kapsulí alebo prášku obsahujú lyofilizované baktérie mliečného kysnutia. Životnosť baktérií je však v týchto prípravkoch značne obmedzená. Zvyčajne trvá pár mesiacov, ale len keď sa skladujú v chladničke. Ešte viac obmedzenú životnosť majú probiotické baktérie v jogurtoch — iba niekoľko dní, napriek často dlhším záručným lehotám uvádzaným výrobcami. Preto sa hľadajú spôsoby na predĺženie životaschopnosti probiotických baktérií v komerčných požívatinách.

V našej predchádzajúcej štúdií (2) sme dokázali, že viaceré druhy baktérií mliečného kysnutia majú *in vitro* významné imunostimulačné a antimutagénne vlastnosti. Z nich sme vybrali na ďalšie testovanie kmeň *Enterococcus faecium* M-74 (SK patent č. 278 205, CZ patent č. 281 433), ktorý v lyofilizovanej forme pre humánne a veterinárne použitie dodáva firma Medipharm, Hustopeče u Brna. V otvorenej pilotnej štúdií s 12 dobrovoľníkmi sme potom zistili, že perorálne podávanie $5 \cdot 10^9$ týchto baktérií v jednej uzavretej želatínovej kapsuli denne počas šiesti týždňov vyvolalo časovo závislú stimuláciu niektorých imunitných mechanizmov a zníženie celkového cholesterolu a cholesterolu viazaného v LDL, ako aj zvýšenie hladín HDL v ich sérach (7). Imunostimulačný účinok sa prejavil formou metabolickej aktivácie periférnych neutrofilov a stimuláciou tvorby protilátok triedy IgG po polyklonovej aktivácii krvných mononukleárných buniek mitogénmi.

Na základe týchto výsledkov sme sa pokúsili predĺžiť životaschopnosť lyofilizovaných baktérií. Zistili sme, že bunky *E. faecium* M-74 v prítomnosti sacharózy a rastlinného tuku prežívajú pri laboratórnej teplote podstatne dlhšie ako v čistom stave. Využili sme preto túto skúsenosť a pripravili čokoládové a vanilkové náplne obsahujúce lyofilizované enterokoky (PÚV — SK č. 1313, CZ č. 6727). Tieto sa naplnili do obličiek, čím vznikli obličkové rezy (tyčinky) Dr. Ebi (výrobca Pečivárne, Sereď) s hmotnosťou 28 g a obsahom $5 \cdot 10^9$ lyofilizovaných zárodokov *E. faecium* M-74. Ich životaschopnosť v obličkových rezoch sa po polročnom skladovaní pri teplote 20–24 °C významnejšie nemenila (4).

Predpokladané imunostimulačné aktivity týchto obličkových rezov sme overili formou randomizovanej dvojito zaslepenej a placebo kontrolovanej štúdie (4, 7). Zúčastnilo sa na nej 28 osôb, ktoré sa rozdelili na dve skupiny po 14 osôb. Osoby v prvej skupine dostávali denne (vždy ráno) jeden obličkový rez Dr. Ebi počas 9 týždňov. Dvakrát pred podaním prvého rezu, každé tri týždne počas podávania, ako aj tri a šesť týždňov po skončení podávania sa každému účastníkovi odobrala krv a vzorky stolice na vyšetrenie. Osoby v druhej — placebovej skupine mali rovnaký režim a spôsob odberov materiálov na vyšetrenie ako osoby v prvej sku-

Tab. 1. Predpokladané zdravotne prospešné účinky probiotík (upravené podľa Dugasa a spol., 1999).

1. Zvýšená nutričná hodnota (lepšia stravitelnosť, zvýšená resorpcia minerálov a vitamínov)
2. Uľahčenie strávenia črevnej laktózy
3. Pozitívny účinok na črevnú mikroflóru (poškodenú antibiotikami alebo pri kolitíde indukovanej rádiáciou)
4. Prevencia infekcií tráviaceho ústrojenstva (vyvolaných baktériami alebo vírusmi, kandidová enteritída, vred s účasťou *Helicobacter pylori*).
5. Regulácia črevnej motility (zápcha, dráždivý zápalový syndróm čreva)
6. Stimulácia imunitného systému
7. Udržovanie rovnováhy medzi jednotlivými subpopuláciami pomocných T-lymfocytov
8. Prevencia alebo zníženie klinických prejavov u detí s kožnou alergiou alebo alergiou na kravské mlieko
9. Prevencia rakoviny, osobitne koolorektálneho karcinómu
10. Zníženie katabolických produktov vylučovaných obličkami a pečeuou
11. Prevencia aterosklerózy (zníženie sérového cholesterolu)
12. Prevencia osteoporózy
13. Lepší vývin (rast)
14. Zlepšený životný status

pine, len rezy Dr. Ebi, ktoré dostávali, neobsahovali lyofilizované zárodoky *E. faecium*.

Ukázalo sa, že kmeň *E. faecium* M-74 nachádzajúci sa v obličkových rezoch už po dvoch týždňoch kolonizoval tráviaci trakt osôb v prvej skupine a jeho sekrecia v stolici pokračovala ešte 6 týždňov po poslednej dávke. V stolici osôb, ktoré jedli rezy obsahujúce enterokoky, boli významne nižšie aktivity beta-D-glukuronidázy, ako v stolici osôb placebovej skupiny. Tento enzým sa považuje za indikátor schopnosti črevnej mikroflóry premieňať prokarcinogény z potraviny na funkčné karcinogény. Po šiestich týždňoch dennej konzumácie enterokokových rezov sa zistila zvýšená produkcia superoxidu a iných intermediátov kyslíka periférnymi neutrofilmi, kým v neutrofiloch osôb placebovej skupiny sa takéto zvýšenie nepozorovalo. Tvorba superoxidu je znakom primovania neutrofilov, čiže ich zvýšenej pohotovosti pre fagocytovú obranu organizmu. Toto zvýšenie časovo korešpondovalo so zvýšenou tvorbou IgG po polyklonovej aktivácii periférnych mononukleárných buniek. Osoby konzumujúce rezy Dr. Ebi s enterokokmi mali aj zvýšené aktivity myeloperoxidázy a elastázy v periférnych neutrofiloch.

Dosiahnuté výsledky sú dôkazom, že kolonizácia tráviaceho traktu kmeňom *E. coli* M-74 formou obličkových rezov Dr. Ebi má za následok stimuláciu základného zariadenia prirodzenej imunity — fagocytózy, ako aj polyklonovú aktiváciu B-lymfocytov a následne aj tvorby protilátok, ktoré sú kľúčovými výkonnými molekulami získanej (špecifickej) imunity. Ide o jeden z mála doteraz preukazných dôkazov imunostimulačného pôsobenia baktérií mliečného kysnutia podávaných formou funkčnej požívatiny získanej priamo v klinickej štúdií.

1. Dugas B., Mercenier A., Lenoir-Wijnkoop I., Arnaud C., Dugas N., Postaire E.: Immunity and probiotics. *Immunol. Today*, 20, 1999, s. 387–390.

2. Ebringer L., Ferenčík M., Lahitová N., Kačáni L., Micháľková D.: Antimutagenic and immunostimulatory properties of lactic acid bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 1995, s. 294—298.
3. Falk P.G., Hooper L.V., Midtvedt T., Gordon J.J.: Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we known and need to know from gnotobiology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 62, 1998, s. 1157—1170.
4. Ferenčík M., Ebringer L., Mikeš Z., Jahnová E., Čížnár I.: Prospešná modifikácia črevnej mikroflóry človeka perorálne podávanými baktériami mliečneho kysnutia. *Bratisl. lek. Listy*, 100, 1999, s. 238—245.
5. Fuller R.: Probiotics in man and animals. *J. appl. Bacteriol.*, 66, 1989, s. 365—378.
6. Mikeš Z., Ferenčík 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.
7. Mikeš Z., Ferenčík 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.
8. Rotimi V.O., Duerden B.J.: The development of the bacterial flora in normal neonates. *J. Med. Microbiol.*, 14, 1981, s. 51—62.

Received November 15, 1999.

Accepted December 17, 1999.

BOOK REVIEW

Říhová M.: Dvorní lékař posledních Lucemburků. Albík z Uničova, lékař králů Václava IV. a Zikmunda, profesor pražské univerzity a krátký čas i arcibiskup pražský. Praha, UK Karolinum 1999, 203 strán.

Milada Říhová, vedúca pražského Ústavu dejín medicíny na UK, ktorá sa už roky zaoberá dejinami stredovekej medicíny, vydala v nakladateľstve Univerzity Karlovej monografiu o známom stredovekom lekárovi Albíkovi z Uničova (1360—1426), o ktorom vieme, že kratší čas pobudol aj v Budíne a podľa jedného (hoci ojedinelého) názoru zomrel v Bratislave. Práca je výsledkom dlhoročného výskumu a je, ako to autorka aj uvádza, spojením jej viacerých publikovaných štúdií.

Okrem úvodu, doslovu a príloh má kniha tri hlavné časti. V prvej sa zoberá životom Albíka, v druhej jeho pôsobením na univerzite, kde bol profesorom lekárskej fakulty, a na kráľovskom dvore, kde bol dvorným lekárom dvoch českých kráľov. V tretej časti sa rozoberajú tzv. regimína, t.j. typický literárny útvar stredovekej medicíny, v ktorom sa dávajú zdravotné rady čitateľom. Konkrétne hovorí o Albíkových regimínoch pre českých kráľov Václava IV. a Žigmunda Luxemburského, analyzuje rukopisy a navrhuje svoje riešenie vzťahov medzi nimi. V tej súvislosti podáva autorka zdravotné potreby oboch posledných Luxemburgovcov. V prílohách má čitateľ možnosť prečítať si ukážky z Albíkových textov, nachádza sa tam zoznam rukopisov a zoznam literatúry.

Keď sa čitateľ pozrie na ukážku rukopisu Albíkovho spisu na s. 140 a na zoznam ťažko prístupných rukopisov roztrúsených po celej Európe a uvedomí si, že to nie sú ani knihy, ktoré možno ľahko nájsť v katalógu knižnice, ľahšie pochopí autorkine slová o diele od nás oddelenom „tuhou neproniknuteľnou hradbou šesti set let“ (s. 40). Vtedy musíme pociťovať aj vďačnosť autorky, ktorá za nás búra túto hradbu svojou vytrvalosťou, znalosťami a zhoršovaním zraku.

Kniha sa síce venuje Albíkovi, ale na pozadí sa čitateľ zoznauje s celou stredovekou medicínou. Rúca sa ňou aj predstava o pasívnej a knižnej, učenej, stredovekej medicíne. Albík je pokračovateľom hippokratovskej tradície, navštevuje osobne pacien-

tov, snaží sa získať poznatky o individualite pacienta, a podľa toho predpisuje lieky (farmaceutiká) a životosprávu v širokom zmysle (dietetiká), zdôrazňuje prevenciu, vplyv prostredia. Jeho lekárska spisba je nielen komentovanie osvedčených autorít, ale prináša aj vlastné skúsenosti.

Z knihy sa dozvedáme aj niektoré kuriozity, napr. Albík radí lekárovi, že si má vydržiavať skupinu starších žien, ktoré by o ňom rozhlasovali, že je dobrým lekárom (s. 49), alebo niektoré priam aforistické vyjadrenia, ako: *Ecce maledictum reuma, quantum malum operatur in homine* („Proklaté reuma, kolik zla spôsobuje v človeku!“ (s. 110—111)).

Autorka viackrát spomína vplyv antických lekárov, napriek tomu sa mi zdá, že antickej medicíne by bolo treba venovať ešte viac pozornosti. Na s. 70 sa uvádzajú aj antickí autori, ktorých diela sa používali pri výučbe na lekárskej fakulte, ale ich spisy majú len stredoveké mená, čitateľ nemôže vedieť, napr. ktoré je Galenovo dielo *Tegni*. Autorka nerobí rozdiel medzi pravými a nepravými dielami, na s. 70 sa uvádza Aristoteles ako autor diela *Problemata*, v poznámkach na s. 59 Galenos ako autor diela *De signis mortis et vitae*. V časti o liečení chudobných sa autorka odvoláva na Albíkovo tvrdenie, že slovo chudobný (*pauper*) sa vyskytuje v tretej knihe Hippokratovho diela *Pronosticonum* (*Prognosticon?*) (s. 45). Odhliadnuc od toho, že toto dielo má len jednu knihu, ja som slovo chudobný v tomto spise nenašiel. Nemohlo by ísť o Galenov komentár k tomuto dielu, ktorý má tri knihy? Na s. 38—40 sa menujú knihy, ktoré Albík pravdepodobne mal, ale všetky sú len od stredovekých autorov, je možné, že by nemal aj diela antických autorov, alebo sa to považovalo za samozrejmé?

Veľmi praktické je, že sa v knihe nachádzajú aj ukážky priamo z diel, pretože vtedy si čitateľ môže urobiť najlepšiu predstavu, škoda, že nie všetky sú preložené (nedorozumením?); preklad chýba napr. na s. 112—116, 119—122.

Táto práca si zaslúži pozornosť nielen historikov medicíny, ale všetkých, ktorí sa zaujímajú o vývoj medicíny a ktorí potom niekedy s úžasom zistia, že *nil novi sub sole*.

Šimon F.