



# Probiotika

**Aplikovaná farmakologie 2012**

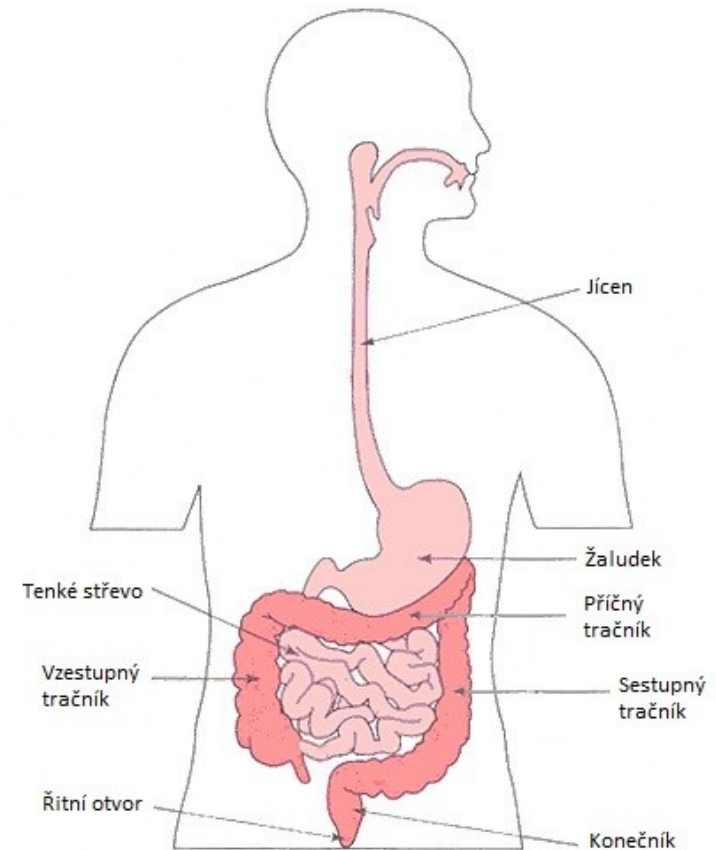
**Ing. Ivana Imrichová**

[i.imrichova@gmail.com](mailto:i.imrichova@gmail.com)

Výživová poradna Viviente


# Funkce trávicího traktu

- Trávení a vstřebávání
- Obrana hostitele:
  - Mikroflóra
  - Bariéra střevní sliznice
  - Místní imunitní systém (GALT – gut associated lymphoid tissue)



# Mikroflóra GIT

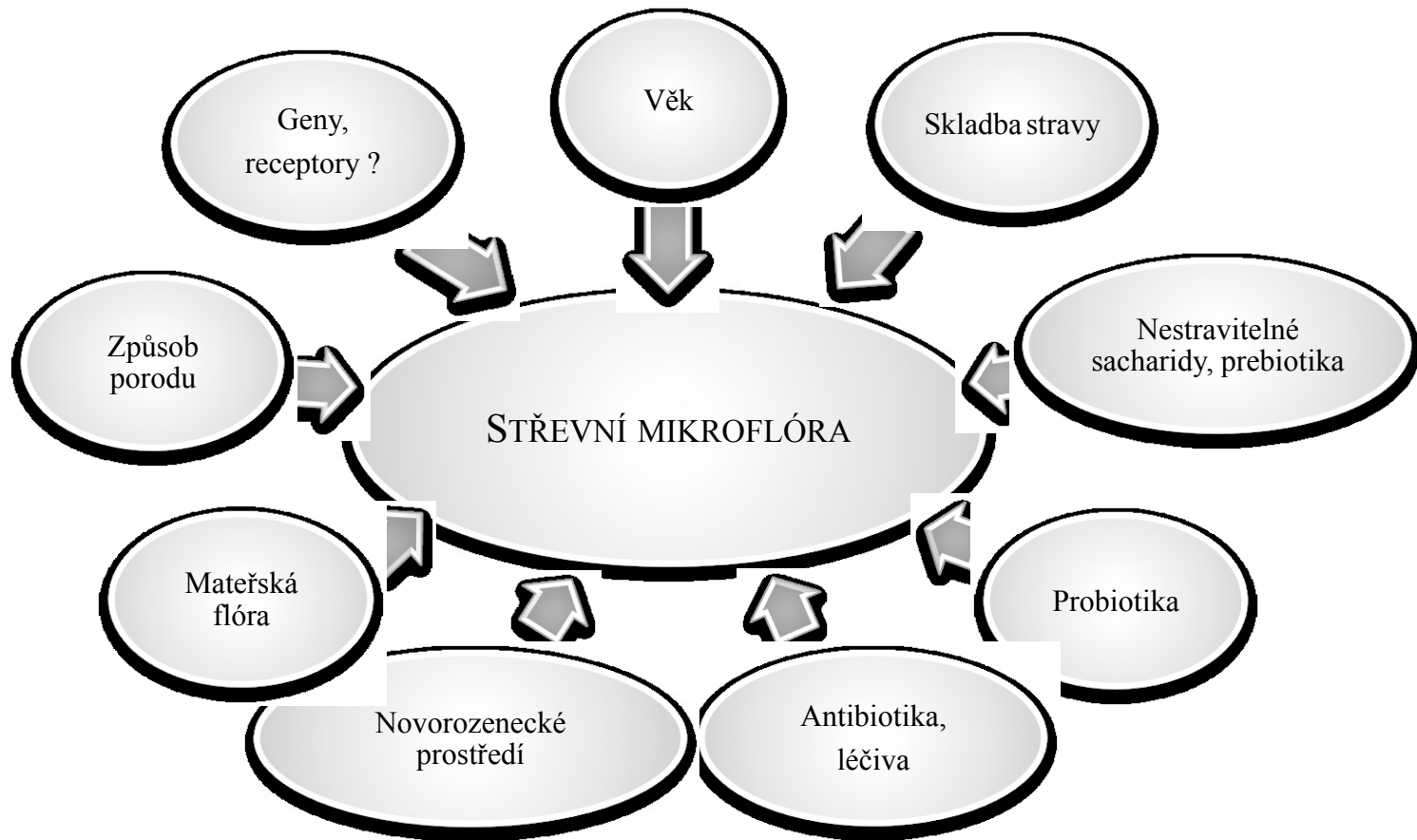
- Soubor MO, které jsou přítomny v trávicím traktu zdravého člověka a jsou v určité kvalitativní a kvantitativní rovnováze
- GIT pravděpodobně obsahuje u dospělého člověka  **$10^{14}$  životaschopných buněk**(= 10x více než eukaryotických buněk ve všech tkáních lidského těla)
- Střevní trakt obsahuje **1-2 kg mikroorganismů** = 60% hmoty stolice
- Doba průchodu bakterií GIT u zdravých osob: 55 až 72h
  - z toho 4-6h od úst ke slepému střevu
  - 54-56h v tlustém střevě

- 
- **Střevní mikroflóra** → vliv na funkci střev  
→ možný **vliv na fyzické a duševní zdraví hostitele**
  - Změna životního stylu, změna stravování, zvýšený stres, antibiotika - způsobují porušení rovnováhy střevní mikroflóry
  - Snaha změnit složení mikroflóry, aby bylo potenciálně prospěšné

- **Normobióza** – stav, kdy převládají bakterie příznivé pro zdraví nad bakteriemi patogenními
- **Dysbióza** – pokud převládá nefyziologická mikroflóra a tím vytváří podmínky pro rozvoj nemocí



# Faktory ovlivňující kolonizaci střev a složení mikroflóry GIT



# Probiotika


- Z řeckého „pro bios“ = „pro život“
- Probiotika jsou živým doplňkem stravy, který příznivě ovlivňuje zdraví hostitele zlepšením rovnováhy jeho střevní mikroflóry (Fuller, 1989)
- Probiotika jsou živé mikroorganismy, které mají při konzumaci v dostatečném množství prospěšné účinky na zdraví konzumenta (FAO/WHO 2002)

# Historie

- První zmínka o blahodárném působení KMV – stará více než 2 tis. let
- **Ilja Mečnikov** (1845 – 1916)
  - Autor teorie antibiózy – tj. potlačování růstu a jiných životních projevů jednoho MO jiným MO
  - Věřil, že konzumace kysaných výrobků (lactobacily) obnovuje prospěšnou skladbu střevní mikroflóry a zlepšuje trávení
- **Albert Siegmund Gustav Döderlain** (1860 – 1941)
  - Navrhl použít vaginální bakterie produkující kyselinu mléčnou k inhibici růstu patogenních bakterií.
  - Tento typ „přátelských bakterií“ dostal později název probiotika



- **Formy probiotických výrobků**
  - Zakysané mléčné výrobky (jogurty, jogurtová mléka, zákysy, kefíry)
  - Dětská výživa
  - Některé fermentované masné nebo cereální výrobky, nakládaná zelenina
  - Funkční potraviny
  - Volně prodejné preparáty obsahující lyofilizované bakterie (doplňky stravy a léčiva)
- Mohou být jednosložkové nebo vícesložkové

- 
- Jako probiotika jsou používány především bakterie rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* a kvasinky, ale také další druhy

# Účinná probiotika by měla:

- Působit blahodárně na hostitele.
- Být nepatogenní a netoxická.
- Být schopna přežití a metabolizace v trávicím traktu – rezistentní vůči nízkému pH, organickým kyselinám a trávicím enzymům.
- Být přilnavá k epitelovým buňkám.

# Účinná probiotika by měla:

- Být schopna se rychle množit a trvale nebo dočasně kolonizovat trávicí trakt.
- Obsahovat velké množství životaschopných buněk.
- Zachovat si životaschopnost během skladování a používání.
- Mít dobré senzorycké vlastnosti.
- Být izolována ze stejného druhu jako jejich plánovaný hostitel.

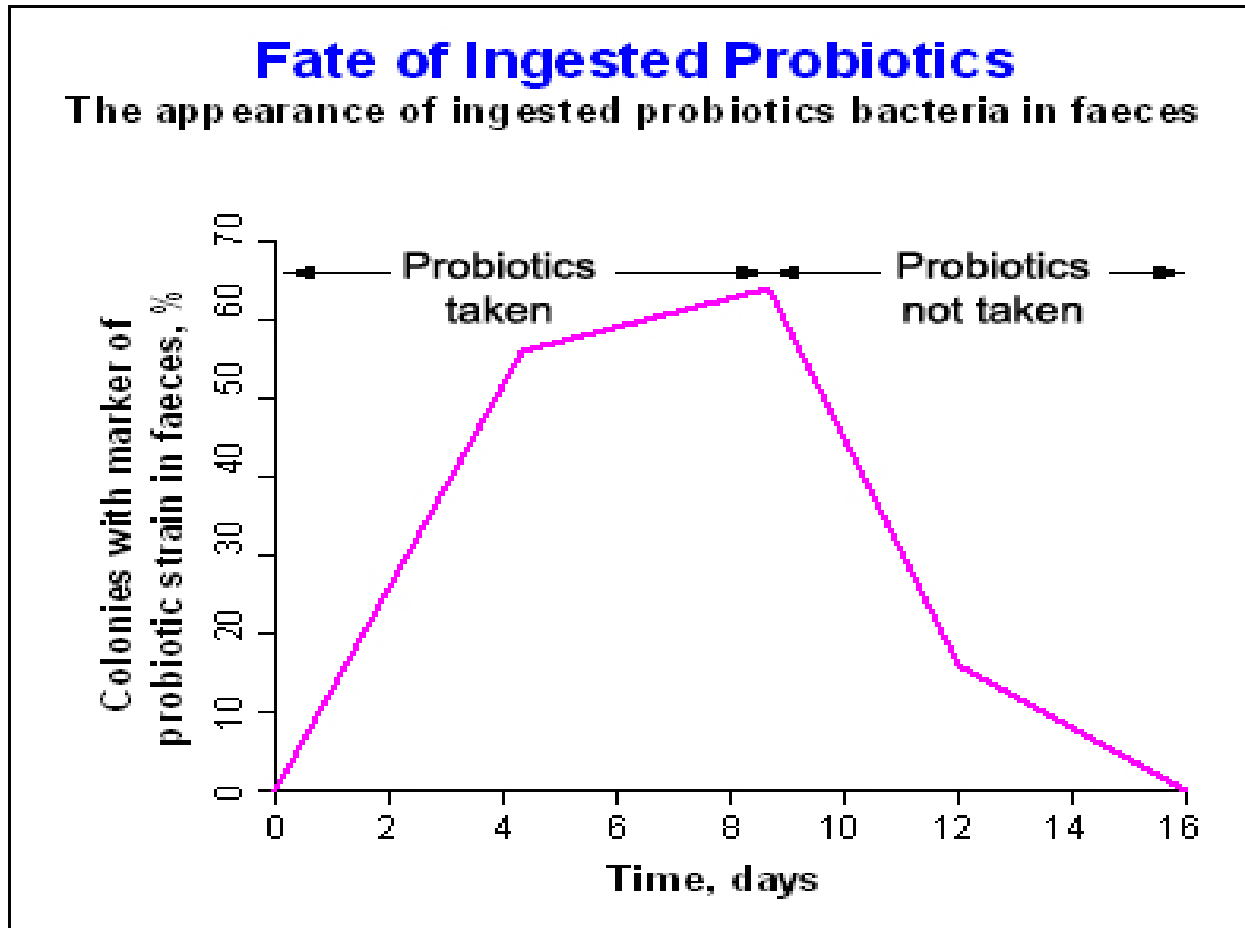
# Kolonizace a působení probiotik

- Probiotika zůstávají v GIT po různě dlouhou dobu
- Nejvhodnější podmínky pro růst a kolonizaci: **terminální část kyčelníku a tlusté střevo**
- Probiotický efekt se projeví, pokud zůstanou bakterie živé **dostatečně dlouhou dobu** a v **dostatečně velkém množství** ( $10^6 - 10^8$  KTJ/g intestinálního obsahu)
- Nutná **pravidelná konzumace** (denní dávka  $10^9 - 10^{11}$  KTJ)
- Množství se snižuje s věkem
- K udržení vysokých hodnot existují 2 strategie

## 2 strategie udržení vysokých hodnot probiotik

- 1) kontinuální konzumace preparátů nebo potravin obsahující probiotické bakterie
- 2) konzumace potravin nebo přípravků, které podporují růst probiotických bakterií ve střevě (bifidogenní substráty nebo prebiotika)

# Kolonizace probiotiky



# Mechanismus působení probiotik

- 1) Modulací obrany hostitele (vrozené i získané imunity)
  - Probiotika chrání střevo kompeticí s patogeny o navázání na sliznici střeva, posílením těsného spojení erytrocytů a zlepšením slizniční imunitní odezvy vůči patogenům
- 2) Přímým působením na jiné mikroorganismy, komenzální nebo patogenní
  - Produkci SCFA, bakteriocinů
- 3) Inaktivace toxinů, detoxikace hostitele

Pravděpodobně neexistuje probiotický organismus, který by působil všemi 3 mechanismy dohromady



# Mikroorganismy, které jsou označeny jako probiotika:

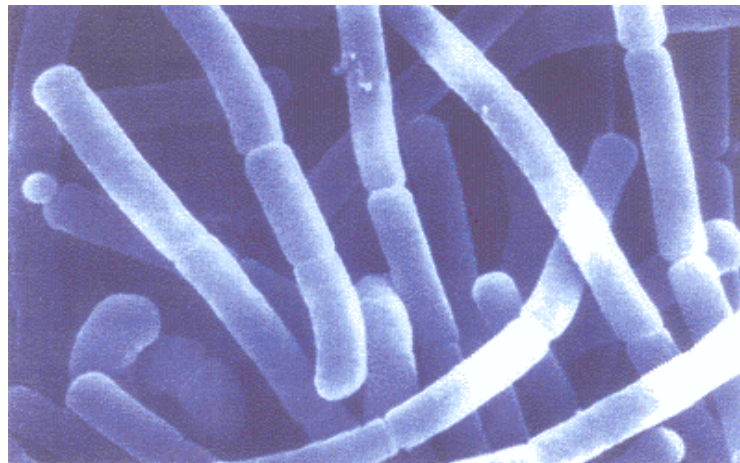
Rod	Druh	Rod	Druh
Lactobacilli	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Bifidobacteria	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		<i>Bifidobacterium longum</i>
	<i>Lactobacillus reuteri</i>		<i>Bifidobacterium breve</i>
	<i>Lactobacillus casei</i>		<i>Bifidobacterium adolescentis</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>		<i>Bifidobacterium infantis</i>
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Enterococci	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>		<i>Enterococcus faecium</i>
Lactococci	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Kvasinky	<i>Saccharomyces boulardii</i>

# Bifidobakterie

- Osídľujú trávicí trubici
- Gram-pozitivní, nepohyblivé, nesporulující tyčinky rozmanitého tvaru
- Většina z nich je striktně anaerobní
- Produkují převážně kyselinu octovou a mléčnou → snížení pH → antimikrobiální efekt
- Produkce vitaminů skupiny B
- Optima pro růst: 25–45 °C (bifidobakterie lidského původu 36-38 °C); pH 6,5-7,0

# *Lactobacillus acidophilus*

- I ve volné přírodě, často součástí potravy
- Gram-pozitivní, nepohyblivé, nesporující tyčinky se zaoblenými konci
- Fakultativně anaerobní
- Produkce kyseliny mléčné
- Optimální růst: 30-40 °C; pH 5,5-6,2



# Příznivé účinky probiotik na zdraví střev

Prokázané účinky	Částečně prokázané účinky	Potenciální účinky
Idiopatický střevní zánět	Pouchitida <sup>4</sup>	Crohnova choroba <sup>2,4</sup>
Chronická pouchitida <sup>1</sup>	Cestovní průjem <sup>2,3</sup>	Ulcerózní kolitida <sup>2</sup>
Ulcerózní kolitida <sup>1</sup>	Epizodické průjmy <sup>3</sup>	Pouchitida <sup>2</sup>
Střevní infekce		
Akutní průjem <sup>2</sup>		
Klostridiová kolitida <sup>3</sup>		
Průjem způsobený antibiotiky <sup>3</sup>		

<sup>1</sup> Prevence recidivy

<sup>2</sup> Léčba

<sup>3</sup> Prevence

<sup>4</sup> Pooperační prevence

*Hutkins, 2006*


# Účinky probiotik na zdraví

Prokázané účinky	Potenciální účinky
Zmírnění symptomů laktózové intolerance	Zmírnění symptomů IBD
Léčba průjmu rotavirového původu	Zmírnění symptomů IBS
Léčba kojeneckých enteritid	Zlepšení zácpy
Léčba průjmu způsobeného antibiotiky	Antimutagenní/antikarcinogenní činnost
Zmírnění symptomů atopické dermatitidy u dětí	Léčba kandidových a bakteriálních vaginóz
Snižování biomarkerů (škodlivé fekální enzymy)	Snižování cholesterolu a krevního tlaku
Modulace střevní mikroflóry	Eradikace multirezistentních mikrobů
Modulace imunity	Kontrola infekce
Pozitivní efekt na rakovinu žlučníku a děložního hrdla	Prevence přenosu AIDS a sexuálně přenosných nemocí

*Fondén, a kol., 2003*

# Vedlejší účinky probiotik

- Infekce
  - Bakteriémie (*Lactobacillus*): 12 případů
  - Fungémie (*Saccharomyces boulardii*): 24 případů
- Zdraví škodlivé metabolické aktivity
- Přehnaná stimulace imunitního systému
- Transfer genů



(Bakterie střevní mikroflóry produkují vitamíny řady B (B1, B2, B6, B12, niacin, kyselina listová a panthotenová) a vitamin K. Proto je třeba opatrnosti hlavně u pacientů užívajících perorální **antikoagulancia** (Warfarin), u kterých je **nutný stabilní přívod vlákniny a opatrnost při antibiotické léčbě.**)

# Potraviny s probiotickým efektem musí splňovat směrnice vytvořené WHO

- 1) Identifikace a charakterizace kmene
    - Poté uložen do mezinárodní sbírky MO
  - 2) Testování *in vitro* a na zvířatech
    - Rezistence vůči kyselinám, žluči, adherence
  - 3) Prokázání bezpečnosti kultury
    - *In vitro*, na zvířatech, dobrovolníci
    - Dvojitě zaslepené randomizované placebem kontrolované studie, nejlépe 2 opakování
  - 4) Výroba probiotické potraviny
    - Skladování, doba trvanlivosti, koncentrace živých buněk
- Probiotické kmeny musí přežívat až do konce spotřební doby!!



# Kysané mléčné výrobky (KMV)

- Výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmásolí nebo jejich směsi za použití MO mléčného kysání, ***tepelně neošetřený po kysacím procesu (Vyhláška č. 77/2003 Sb)***
- ***Laktóza*** se díky beta-galaktosidáze (produkt BMK) za anaerobních podmínek přeměňuje na ***kyselinu mléčnou***

# KMV – historie a původ

- *Skladováním mléka v různých oblastech*
- Mírné pásmo:
  - **zakysané mléko** (mezofilní BMK)
- Subtropy:
  - **klasický jogurt** (termofilní BMK)
- Východní Evropa, centrální Asie, Zakavkazsko:
  - **kefíry, kumys** (BMK + kvasinky)

# Druhy živých mikroorganismů v KMV dle vyhlášky č.77/2003 Sb.

Název kysaného výrobku	Použitá kultura	Mléčná mikroflóra výrobku v 1 g
Acidofilní mléko	Lactobacillus acidophilus a další mezofilní, příp. termofilní kultury bakterií mléčného kvašení	10 <sup>6</sup> Lactobacillus acidophilus
Jogurty	Protosymbiotická směs Streptococcus salivarius subsp. thermophilus a Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus	10 <sup>7</sup>
Kysané mléko vč. smetanového zákysu, podmáslí a kysané smetany	Monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kvašení	10 <sup>6</sup>
Kefír	Zákys připravený z kefírových zrn, jehož mikroflóra se skládá z kvasinek zkvašujících laktózu Sacharomyces unisporus, Sacharomyces cerevisiae, Sacharomyces exiguus a dále Leuconostoc, Lactococcus a Aerobacter, rostoucí ve vzájemném společenství	BMK 10 <sup>6</sup> a kvasinky 10 <sup>4</sup>
Kefírové mléko	Zákys skládající se z kvasinkových kultur rodu Kluyveromyces, Torullopsis nebo Candida valida a mezofilních a termofilních kultur bakterií mléčného kvašení v symbióze	BMK 10 <sup>6</sup> a kvasinky 10 <sup>2</sup>
Kysaný mléčný výrobek s bifido-kulturou	Bifidobacterium sp. v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného kvašení	10 <sup>6</sup> bifidobakterie

# Jogurty

- Jogurt je kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmásolí nebo jejich směsi pomocí mikroorganismů uvedených v předchozí tabulce



# Výroba jogurtů

- Úprava tučnosti mléka
- Homogenizace
- Pasterace (85 – 95 °C, 5 minut)
- Rychlé ochlazení na teplotu fermentace ( 30 – 40 °C)
- Přídavek jogurtových kultur
- Zrání (fermentace)

# Jogurty – výroba klasická

- Zrání ve spotřebním obalu
- Teplota 40 – 45 °C, 2 – 4 hodiny
- Ochlazení (zastavení fermentace)
- Expedice
  
- Právý jogurt:
  - Bílá barva, hladký povrch, jemná konzistence
  - Při obrácení kelímku nevyteče
  - Po vložení lžice si zachovává jemnou konzistenci

# Výroba jogurtu - tanková

- Zrání ve zracím tanku
- Teplota 30 °C, 16 – 18 hodin
- Poté se koagulát rozmíchá, vychladí a plní se do obalů



# Lékové formy probiotik

- Perorální: Sirupy, roztoky, tobolky, prášky, kapky, cucavé tablety
- Pro lokální aplikaci: vaginální čípky a tablety





# Probiotika z potravin vs. probiotika z lékárny

- Registrovaná probiotika:
  - Např. **Enterol** – ve 250 mg *Saccharomyces boulardii* = nejméně  $1 \times 10^9$  CFU/v tabletě nebo sáčku
- Doplnky stravy:
  - Většinou 1 až  $10 \times 10^9$  CFU
  - **Apo-Lactobacillus 10+** obsahuje  $12 \times 10^9$  CFU/ tableta
  - **Lepicol**  $2 \times 10^9$  CFU/dávka
- Kysané mléčné výrobky:
  - **Actimel**  $1 \times 10^{10}$  CFU/1 lahvička (100 ml) (*Lb. casei*)
  - **Activia**  $4,25 \times 10^9$  CFU/1 kelímek (120 g) (*B. animalis*)
  - **Hollandia**  $2 \times 10^{10}$  CFU/1 kelímek (200g) (*Bifidobacterium*, *Lb. acidophilus*)

# Hodnocení EFSA

- EFSA nepotvrdil tvrzení o pozitivním účinku probiotických mikroorganismů na trávicí trakt.
- Většina tvrzení se týká potlačování potenciálně patogenních střevních mikroorganismů, zlepšování průchodu střevy, posilování imunitního systému, popřípadě jiných funkcí.
- Tvrzení byla zamítnuta převážně **z důvodů nezřetelné identifikace příslušné látky a nedostatku informací o látce**, proto panel NDA nemohl prověřit zda se vědecký důkaz poskytnutý EFSA týká stejné látky, pro kterou se uvádí zdravotní prospěch.

# Probiotika při léčbě antibiotiky

- Léčba širokospektrálními antibiotiky → vznik dysmikrobie → průjem u 5 – 25 % nemocných
- Probiotika prokazatelně snižují výskyt průjmů, které jsou vyvolány antibiotickou léčbou
- Především u pacientů, kteří v minulosti prodělali průjem způsobený konzumací antibiotik, ale i u pacientů, kteří problémy neměli
- Probiotika by se neměla podávat pacientům, kteří mají závažnou imunodeficienci
- Dlouhodobé užívání ATB - *Saccharomyces boulardii* - rezistentní na běžná ATB

# Kdy užívat probiotika při antibiotické léčbě

- Probiotika by se měla užívat během léčby antibiotiky a týden po ukončení léčby
- Největší přínos probiotik: pokud bylo zahájeno užívání do 72 hodin od započatí léčby ATB
- Vhodná aplikace ve 2/3 doby mezi aplikacemi jednotlivých dávek ATB
- V množství nejméně 50 bilionu CFU

# Prebiotika

- = nestravitelné složky potravy, které příznivě ovlivňují hostitele selektivní stimulací růstu a/nebo aktivity jedné bakterie nebo omezeného počtu střevních bakterií, a tím zlepšují stav hostitele
- Fruktooligosacharidy – inulin, oligofruktóza
- Oligosacharidy mateřského mléka
- Laktulóza, galaktooligosacharidy, isomaltooligosacharidy, xylooligosacharidy

# Kritéria pro prebiotika:

- Nesmí být hydrolyzovatelné ani absorbovatelné v horní části zažívacího ústrojí.
- Musí být selektivním substrátem pro jeden nebo omezený počet druhů střevu prospěšných komenzálních bakterií, které jsou stimulovány k růstu anebo k metabolické aktivitě.
- Musí být schopné upravit střevní flóru ve prospěch zdravějšího složení.
- Musí vyvolat luminální nebo systematické efekty, které jsou příznivé pro zdraví hostitele

# Inulin

- V banánech, ječmeni, čekance, česneku, Jeruzalémském artyčoku, pórků, cibuli a ovsu.
- Extrahován bývá z kořene čekanky, Jeruzalémského artyčoku, jiřinek a pampelišek

# Obsah inulinu a OF v surovinách

Zdroj	Jedlá část	Inulin (g/100 g)	Oligofruktóza (g/100 g)
Čekanka	Kořen	35,7 – 47,6	19,6 – 26,2
Česnek	Cibulová hlíza	9,0 – 16,0	3,6 – 6,4
Pór	Cibulová hlíza	3,0 – 10,0	2,4 – 8,0
Cibule	Cibulová hlíza	1,1 – 7,5	1,1 – 7,5
Chřest	Listy	2,0 – 3,0	2,0 – 3,0
Pšenice	Zrno	1,0 – 4,0	1,0 – 4,0



# Prebiotika na trhu



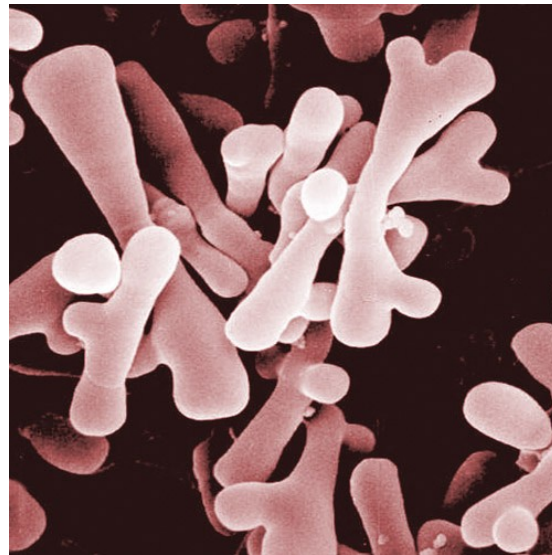
# Synbiotika

- Produkt, který obsahuje současně probiotika i prebiotika
- U produktů, kde prebiotické látky selektivně podporují probiotické komponenty
- Např. jogurt s obsahem probiotických bakterií společně s prebiotickou oligofruktózou

# Synbiotika na trhu



# Vliv konzumace probiotických jogurtů a prebiotik na počet bakterií rodu *Bifidobacterium* ve střevě



# Experimentální část

- Jogurt bílý selský s probiotickou kulturou BIFI, 200g/den (*Bifidobacterium*, *Lb. acidophilus*)
  - mléko, mléčná bílkovina, živá jogurtová kultura, probiotická kultura *Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus*, obsah tuku nejméně 3,5 %.
  - Obsahuje nejméně 100 milionů živých mikroorganismů v 1 g.
- Výrobce udává, že pravidelná konzumace jogurtů s přidavkem probiotických kultur příznivě ovlivňuje složení střevní mikroflóry.



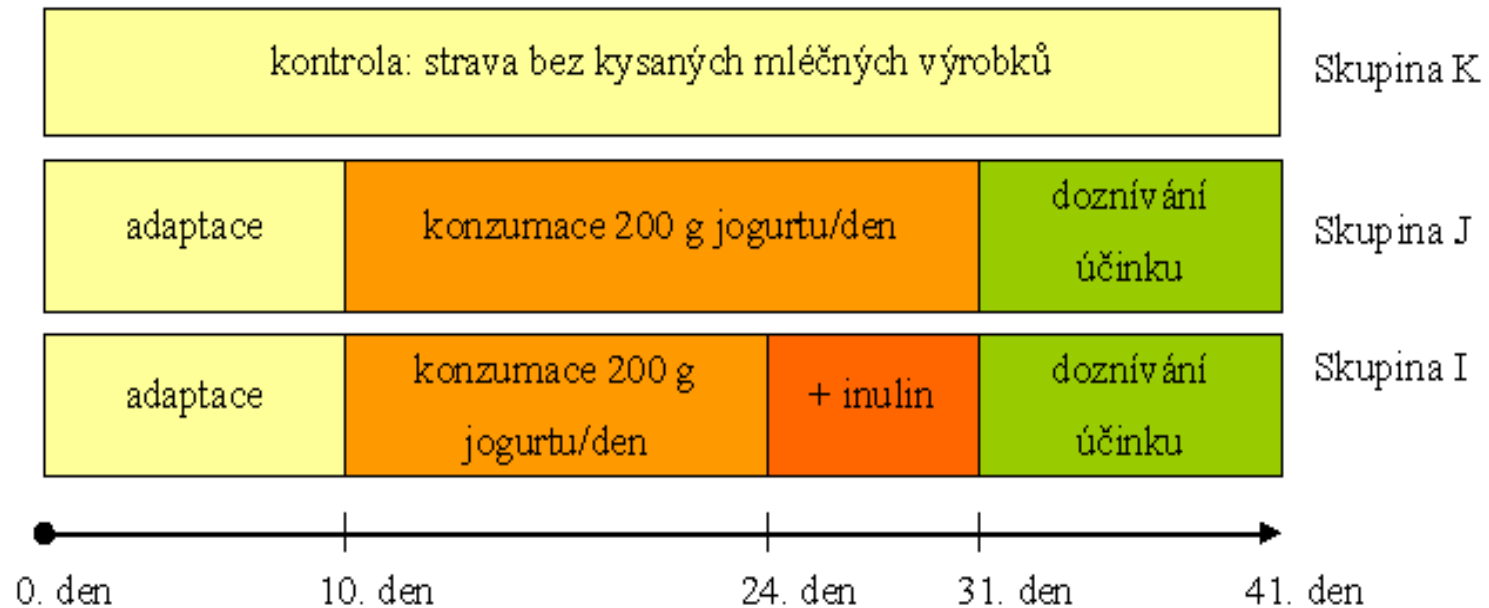
- Inulin 5g/den (90% inulin, 10% oligosacharidy)
- Použití: do kávy, čaje, džusu, nealkoholických nápojů, jogurtů, pudinků a polévek
- Výrobce graficky znázorňuje změnu střevní mikroflóry před užitím a po užití:
  - Před užitím: 30 % bifidobakterie, 70 % patogenní bakterie
  - Po užití: 70 % bifidobakterie, 30 % patogenní bakterie



- Vzorek lidských exkrementů dodaný ve sterilním plastovém kontejneru s lopatkou pro odběr stolice, řádně označený.
- 24 zdravých dobrovolníků
  - Ženy, 22 až 45 let
  - Bez zažívacích obtíží, nemocí střev, průjmů, laktózové intolerance, atd.
  - Bez užívání antibiotik v průběhu a měsíc před experimentem
  - Běžná výživa
  - Neužívat projímadla, nadměrné množství alkoholu
  - Bez velkých změn fyzické aktivity

Poučení, souhlas

# Časový harmonogram experimentu

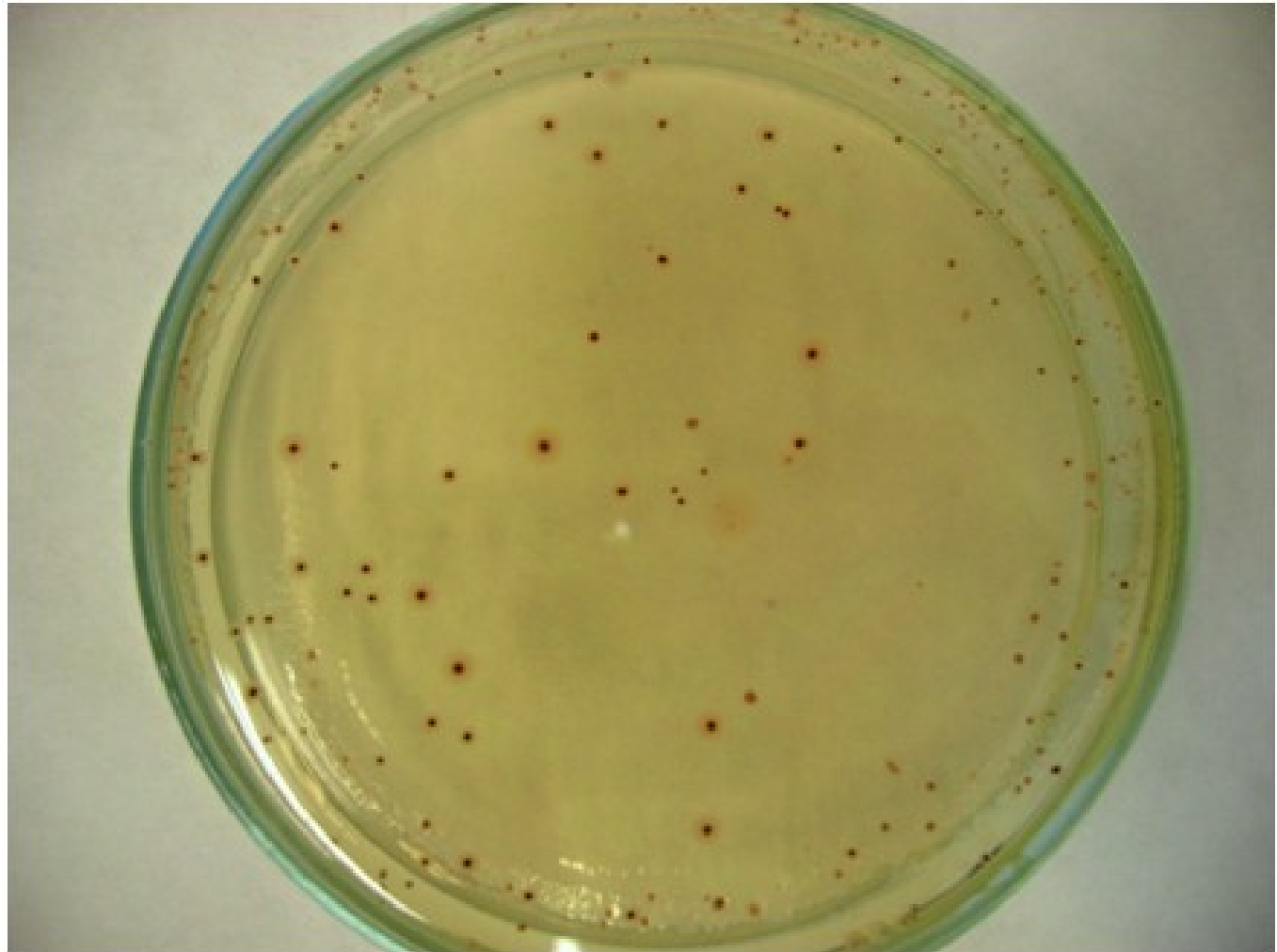




# Zpracování vzorků

- 1 g vzorku + 99 ml sterilovaného fyziologického roztoku
  - homogenizace (90 vteřin)
  - ředění
  - zalití inokula (1 ml) živnou půdou *BSM se supplementem*
  - ztuhnutí půdy
  - kultivace v anaerostatu  $37^{\circ}\text{C}$ , *125 hodin*
  - odečítání kolonií
  - vyhodnocení výsledků
- 
- ANOVA – testování shodnosti středních hodnot jednotlivých výběrů (nárůstů v rámci skupiny)

# Kolonie bifidobakterií po kultivaci

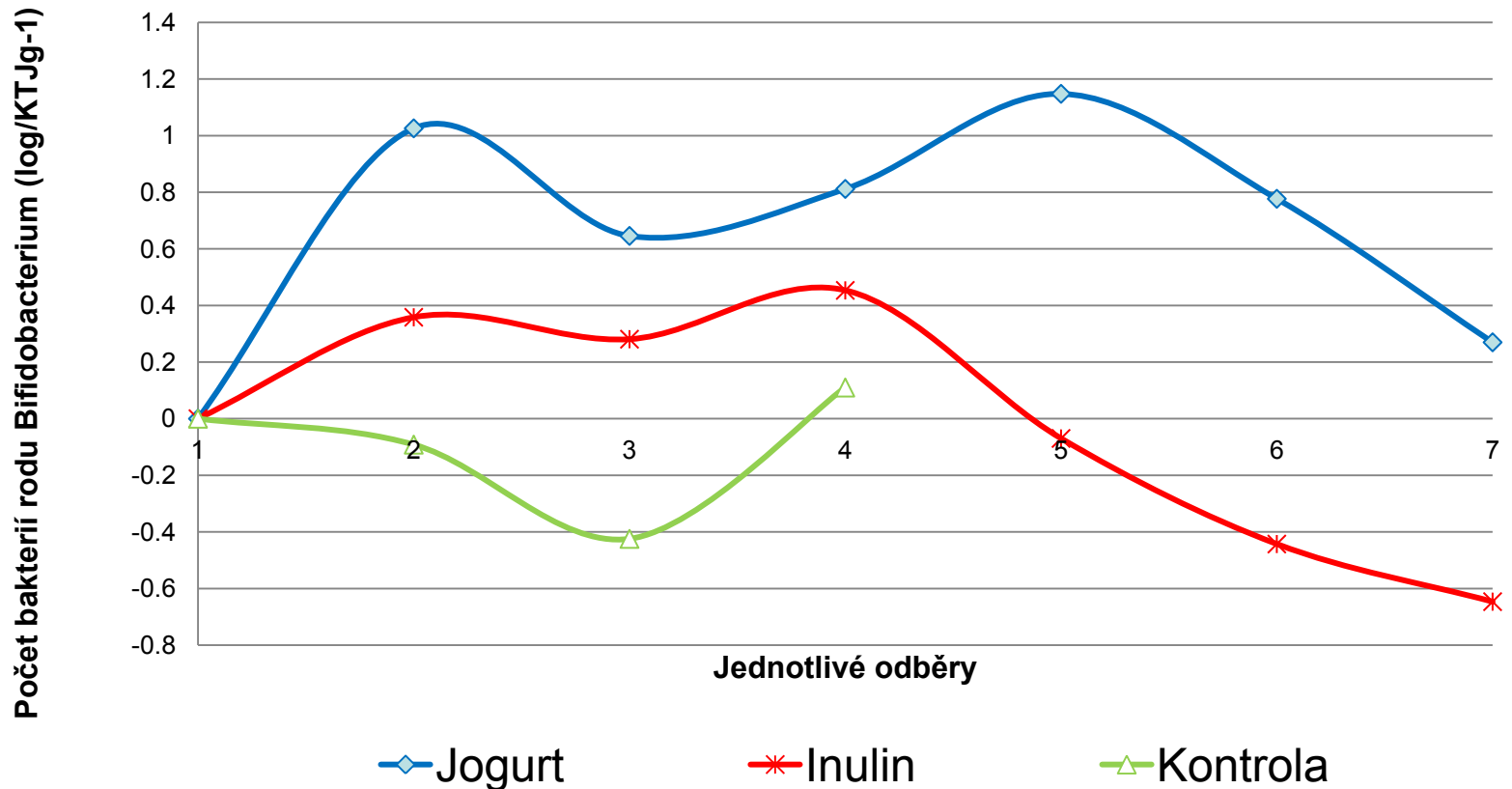


# Na základě existujících studií bylo očekáváno:

- Během konzumace probiotických jogurtů, obsahujících rod *Bifidobacterium*, dojde ke zvýšení obsahu těchto bakterií ve vzorcích stolice
- Po ukončení konzumace dojde k opětovnému poklesu
- Po přidavku inulinového prášku v množství 5 gramů denně by měl inulin selektivně podpořit růst bifidobakterií v tlustém střevě → zvýšení počtu bifidobakterií ve stolici

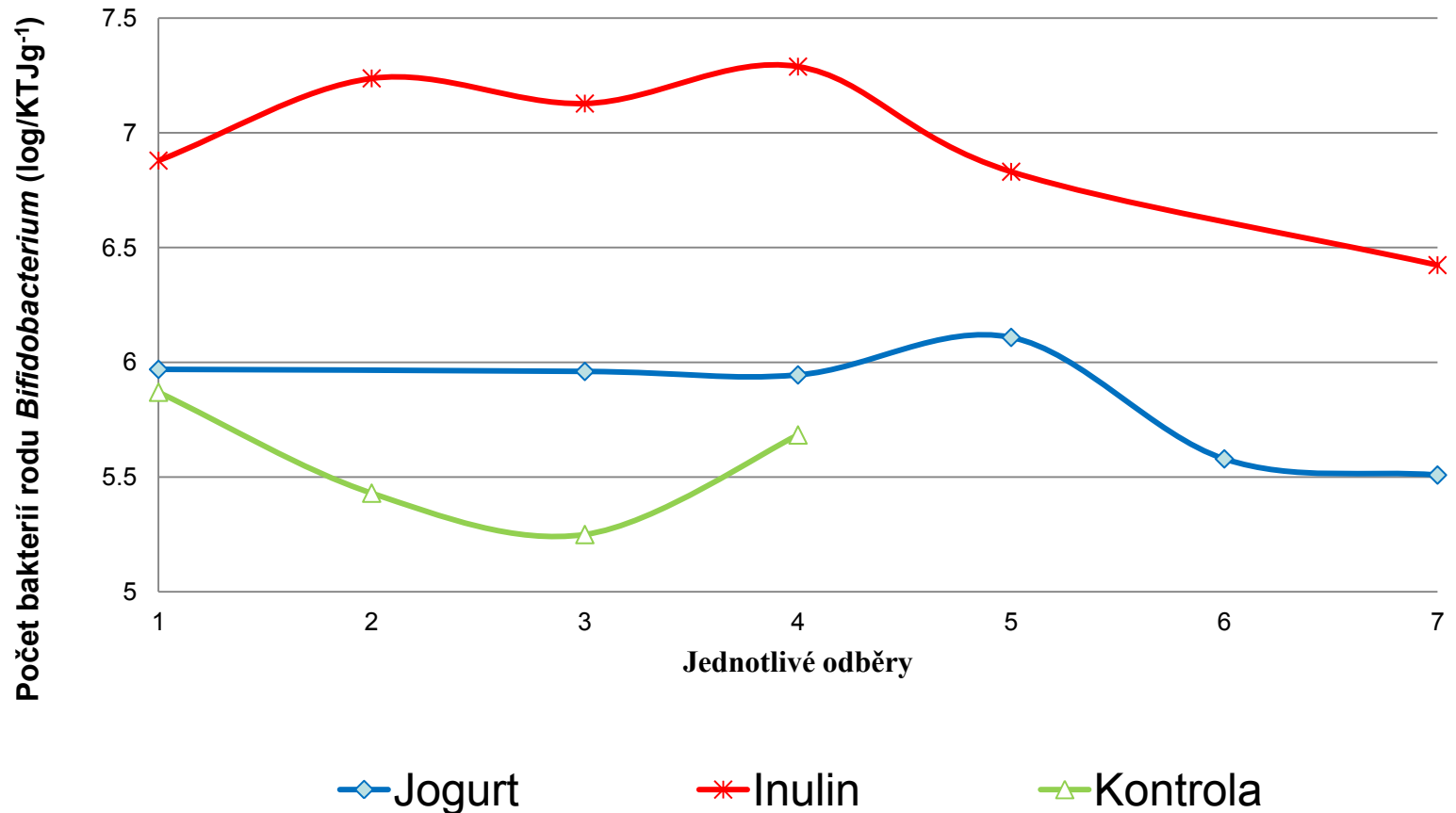
# Nárůsty a poklesy obsahu bifidobakterií od počáteční nulové hodnoty prvního měření dle výsledků z ANOVY

Rozdíly počtu bifidobakterií mezi jednotlivými odběry



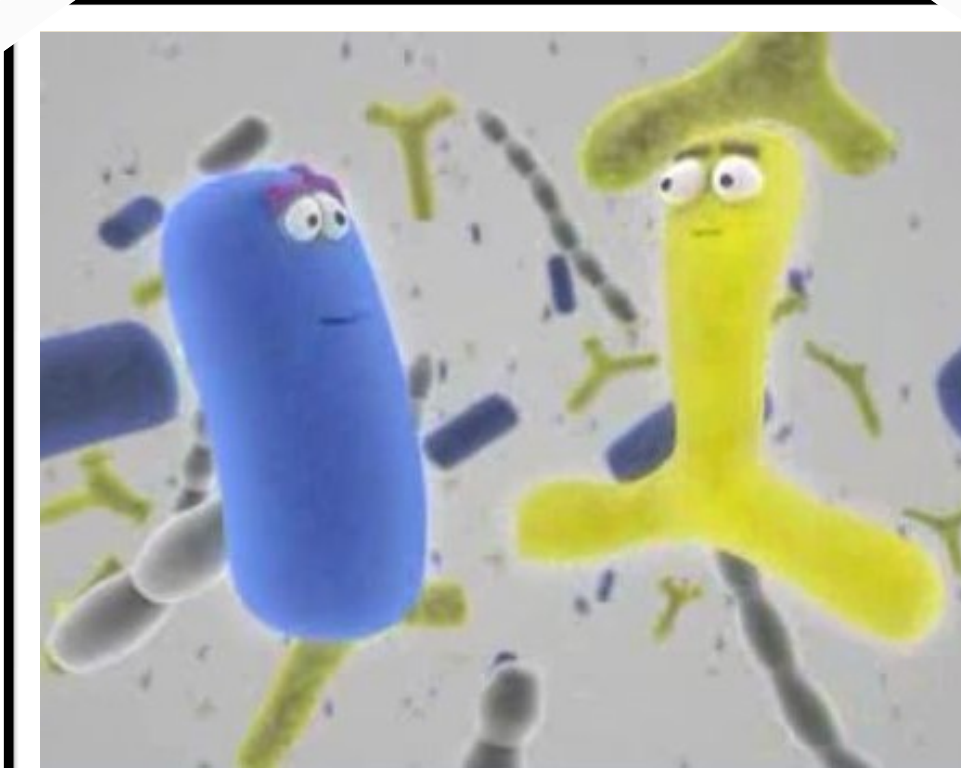
# Průměr absolutních hodnot ve skupinách při jednotlivých měřeních

Absolutní množství bifidobakterií (průměry v rámci skupin)



# Závěr

- Po konzumaci probiotických jogurtů došlo k mírnému nárůstu počtu bifidobakterií, tento nárůst však nebyl dostatečný na to, aby mohl být pokládán za průkazný.
- Po ukončení konzumace jogurtů došlo k poklesu množství bifidobakterií.
- Nepatrné zvýšení bifidobakterií po přidavku inulinu, které není statisticky průkazné.
- Po ukončení konzumace jogurtů s přidavkem inulinu došlo k poklesu bifidobakterií.
- Z této práce nevyplývá, že by měla konzumace jogurtů nebo inulinu prokazatelně pozitivní vliv na nárůst množství bifidobakterií ve střevě.



**Děkuji za pozornost**