

# ČREVESNA MIKROBIOTA IN PROBIOTIKI

prof. dr. Irena Rogelj, univ. dipl. inž. živil. tehnologije

## MIKROBI – NAŠI NEPOGREŠLJIVI SOPOTNIKI

Bakterije, ki s kvasovkami in plesnimi oblikujejo skupino mikroorganizmov, poseljujejo vse kotičke našega planeta, vključno z vsemi živimi bitji. Več kot milijardo let so bile edina živa bitja na našem planetu in najstarejši odkriti fosili, ki so po ocenah stari okoli 3500 milijonov let, so mikrofosili bakterij. Zaradi njihove majhnosti jih zlahka spregledamo, saj jih ne vidimo. Zelo dobro pa občutimo njihovo aktivnost, še posebej tedaj, kadar zaradi njih zbolimo. Prav zaradi dejstva, da nekatere povzročajo bolezni, se premalo zavedamo, da je takšnih, ki nam škodujejo, zelo malo in armada tistih, ki nam pomagajo živeti in preživeti. Spomnimo se vsaj nekaterih pozitivnih učinkov mikroorganizmov: so nepogrešljiv člen pri kroženju hranil v naravi, "izdelujejo" nam živila (kruh, pivo, vino, jogurt in siri so rezultat mikrobne fermentacije), čistijo odpadne vode, razgrajujejo odpadke, proizvajajo nam antibiotike, vitamine in nenazadnje naše življenje in zdravje sta odvisna od mikrobne populacije, ki prebiva v našem telesu in jo imenujemo tudi mikrobiota.

Mikrobioto prebavil, ki jo sestavlja okoli  $10^{14}$  (sto tisoč milijard ali sto bilijonov) bakterij, vse pogosteje imenujemo kar notranji organ, saj opravlja življenjsko pomembne funkcije: pomaga

pri razgradnji hrane in s tem pridobivanju hranil, potrebnih za izgradnjo in delovanje našega telesa, ščiti pred škodljivimi bakterijami in toksičnimi snovmi, uči in usmerja imunski sistem. Lahko rečemo, da je mikrobiota pomemben dejavnik splošnega zdravstvenega stanja in odpornosti organizma, saj se lahko bakterije s pomočjo različnih snovi in molekul, ki jih izločajo, sporazumevajo med seboj, pa tudi z našimi celicami. Tako lahko prišepnejo celicam imunskega sistema, kako naj se v različnih situacijah odzovejo, ali pa "požgečkajo" črevesne celice, da naredijo več sluzi in se tako ponovno zaščitijo pred škodljivci in škodljivimi snovmi.

## **VLOGA ČREVESNE MIKROBIOTE ZA RAZVOJ IN OHRANJANJE OBRAMBNE SPOSOBNOSTI ORGANIZMA**

Prebavni trakt deluje v simbiozi s številnimi bakterijami, ki izdatno prispevajo k normalni prebavi. Novejše študije dokazujejo, da ima črevesna mikrobiota precej večji vpliv na razvoj številnih bolezni, kot smo mislili doslej. Prebavila so zaščitna pregrada med notranjostjo in okoljem, iz katerega neprestano prihajajo v organizem antigeni, bodisi kot sestavine hrane ali bakterijske celice. Metabolično je debelo črevo najbolj aktiven telesni organ, mikrobiota pa prispeva k razgradnji in absorpciji hrane, s komunikacijo z gostiteljevimi celicami pa vzpodbuja specifične odzive, ki sodelujejo v različnih pomembnih fizioloških funkcijah – vpliva na obrambne sposobnosti, izgradnjo črevesne stene (mikrovili, ekspresija

mucina), razvoj in delovanje imunskega sistema. Ugotovljeno je, da črevesna mikrobiota aktivno vpliva na črevesni mukozni imunski odziv in da istočasno ima ključno vlogo v interakcijah med patogenimi mikroorganizmi in gostiteljem ter v razvoju tolerance do hrane.

Črevesna sluz in epitel sta pomembna zaščita pred antigeni iz hrane in mikroorganizmi, ki pridejo v organizem iz okolja. To je prva obramba gostitelja in je usmerjena predvsem v izločanje antigenov in v regulacijo antigensko specifičnih imunskih odzivov. Pri zorenju črevesne obrambne sposobnosti ima pomembno vlogo naselitev črevesa novorojenca z mikroorganizmi, saj normalna mikrobiota krepi črevesno pregrado, vzpodbuja zorenje črevesnega limfoidnega tkiva (GALT) in vzdržuje v ravnotežju nastajanje pro- in protivnetnih citokinov. Celo takrat, kadar dejavniki, ki povzročajo vnetja, niso prisotni, je zdravo črevo v provnetnem stanju, ki ga imenujemo tudi kontrolirano vnetje.

Poselitev prebavil z mikrobi se začne ob rojstvu, ko je novorojenec po bivanju v sterilnem okolju izpostavljen okolju, bogato poseljenem z mikroorganizmi. Vemo, da velja dojenje za zlati standard prehranjevanja novorojenca, saj mu zagotavlja vsa potrebna hranila in snovi za rast in razvoj ter ga ščiti pred okužbami. Manj znano pa je morda, da je materino mleko pomemben dejavnik pri vzpostavljanju, razvoju in oblikovanju črevesne mikrobiote dojenčka. Dolgo je veljalo, da sodi med najpomembnejše vire okužbe pri normalno rojenih otrocih

materina vagina, medtem ko šele v najnovejših študijah opisujejo tudi velik pomen materinega mleka kot izvora mikrobne okužbe dojenčkovih prebavil. V nedavnih študijah je bila opisana presenetljiva pestrost mikrobiote humanega mleka, ki je včasih veljalo za sterilno. Literaturni podatki navajajo, da dojenček z 800 ml mleka zaužije od  $10^5$  do  $10^7$  bakterij, kar pomeni, da ga mleko neprekinjeno oskrbuje z mikroorganizmi. Celo več, dokazali so, da sestava črevesne mikrobiote dojenčka odraža sestavo mikrobiote materinega mleka. Po zadnjih podatkih naj bi bili v 90 % črevesne mikrobiote dojenčkov bifidobakterije in laktobacili, medtem ko naj bi črevesna mikrobiota zalivančkov vsebovala le 40–60 % teh bakterij, preostanek pa naj bi sestavljali predstavniki iz skupin *Enterobacteriaceae* in *Bacteroides*. Poleg koristnih bakterij pa vsebuje humano mleko tudi prebiotične snovi, ki selektivno vzpodbujajo rast koristnih bifidobakterij v dojenčkovih prebavilih. Po prvem življenjskem obdobju in prehodu na mešano prehrano, se približno do drugega leta starosti črevesna mikrobiota dokončno izoblikuje in postane stabilna.

Mikrobiota prebavil je verjetno eden izmed najbolj kompleksnih mikrobnih ekosistemov, ki jih poznamo, saj jo po današnjih predvidevanjih sestavlja med 500 do 1000 različnih vrst bakterij, ki pripadajo najmanj 50. rodovom. Tako na sestavo kot velikost mikrobne populacije vpliva veliko dejavnikov, notranjih glede na različna področja prebavil in zunanjih, kot so prehrana, zdravila, okužbe, stres. Majhna

vrednost pH v želodcu je uničujoča za večino mikrobov, zato je tam mikrobna populacija najmanjša in redko doseže velikost  $10^3$  v gramu, prevladujejo pa laktobacili, streptokoki in nekatere kvasovke. Zaradi agresivne črevesne tekočine (žolč, pankreatični sok) in kratkega tranzitnega časa tudi duodenum ne pomeni nekega prijaznega okolja in vsebuje relativno majhno število pretežno tranzitnih mikrobov. Nato se število mikrobov hitro povečuje in mikrobna populacija doseže največjo velikost v debelem črevesu ( $10^{12}$ /g vsebine). Mikrobno združbo sestavlja več sto različnih vrst, med katerimi številčno prevladujejo vrste rodov *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Fusobacterium* in različni po Gramu pozitivni koki. V manjšem številu so prisotne vrste *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, metanogene in sulfat-reducirajoče bakterije. V debelem črevesu so prisotne tudi kvasovke, vključno z oportunistično patogeno vrsto *Candida albicans*, vendar njihovo število običajno ne preseže  $10^4$ /g vsebine.

Značilnost naravne mikrobiote je, da je dobro prilagojena in navadno izjemno stabilna, kar so ugotovili v številnih novejših raziskavah, ki jih omogočajo molekularno genetske metode. Kljub temu, da se mikrobna populacija med posamezniki in starostnimi skupinami ljudi zelo razlikuje, pa je za posameznika stabilna in ima velik vpliv na njegovo fiziologijo. Vsaka sprememba v mikrobem ravnotežju pa lahko povzroči preobrat iz koristnega v škodljivo delovanje.

## **PROBIOTIKI NEKOČ IN DANES**

Začetki probiotikov segajo daleč v zgodovino, saj so fermentiranemu mleku pripisovali zdravju koristne učinke že pred tisočletji. Razmeroma nova pa so spoznanja, da so z ugodnimi učinki na zdravje povezane bakterije, saj segajo v začetek dvajsetega stoletja. Te bakterije (in nekatere kvasovke) danes imenujemo probiotiki.

Uporaba probiotikov je bila sprva omejena na živalsko prehrano. Probiotiki naj bi kot dodatki krmi uravnavali črevesno mikrobioto, s tem pa prispevali k boljši konverziji krme, preprečevanju okužb živali na velikih farmah in posredno k boljšemu prirastu živali. Osnovna ideja je bila uporaba probiotikov kot zamenjave za antibiotike. Leta 1991 so definicijo razširili tudi na uporabo v človeški prehrani in danes velja, da so probiotiki živi mikroorganizmi, ki dodani hrani ali krmi vplivajo na fiziologijo gostitelja tako, da okrepijo črevesni in sistemski imunski odziv ter izboljšajo prehransko in mikrobno ravnovesje v prebavilih. Lahko rečemo, da velja osnovni koncept probiotikov, ki se je začel oblikovati v začetku 20. stoletja, še danes. Razlika je v tem, da je nekoč slonel na predvidevanjih, danes pa na znanstveno potrjenih dejstvih in dokazanih fizioloških učinkih.

Najpogostejše probiotične bakterije so predvsem predstavniki laktobacilov in bifidobakterij, saj so naravni člani zdrave mikrobiote prebavil, poleg tega pa veljajo za varne bakterije, saj pripadajo mlečno-kislinskim bakterijam, ki jih človek že

tisočletja uživa skupaj s fermentirano hrano. To pa ne pomeni, da so vse mlečnokislinske bakterije, ali pa vsi laktobacili in bifidobakterije probiotiki. Probiotične bakterije morajo imeti posebne lastnosti, da lahko v prebavilih tekmujejo z zdravju škodljivimi bakterijami, razgrajujejo sestavine hrane, vzpodbujajo delovanje prebavil in imunskega sistema. Da lahko žive prispejo do črevesa, morajo biti odporne proti želodčni kislini in žolču. V črevesu pa lahko nadaljujejo svoje delo samo v primeru, da se v njem začasno ustavijo ali celo naselijo. To so torej natančno izbrane in proučene bakterije s posebnimi, samo zanje značilnimi lastnostmi. Zmotno je mišljenje, da ima ena probiotična bakterija vse zgoraj naštetih ugodnih učinkov. Probiotične bakterije se med seboj razlikujejo. Ene so uspešnejše pri borbi proti škodljivim bakterijam, druge pri vzpodbujanju delovanja prebavil, tretje zopet pri vzpodbujanju imunskega sistema. Lahko bi rekli, da so naredile ene šolo preventive, druge pa so izurjeni terapevti. Vse boljše poznavanje mehanizmov njihovega delovanja in vse več kliničnih raziskav, opravljenih v zadnjih letih, nakazuje možnost uspešne uporabe probiotičnih bakterij tako v preventivi, kot tudi podpori pri zdravljenju različnih lažjih, pa tudi težjih bolezni, vključno z nekaterimi oblikami raka.

## **PROBIOTIKI – ZAKAJ SO POTREBNI?**

V razvitih deželah kar dva okoljska dejavnika negativno vplivata na črevesno mikrobioto in imunski status: higiena in prehrana. Izboljšanje higienskih pogojev, cepljenja in antibiotiki so

zmanjšali pogostnost okužb. Poleg tega pa se je zelo spremenil tudi način priprave hrane. V preteklosti sta bila glavna načina konzerviranja hrane naravna fermentacija in sušenje, danes pa je večina hrane obdelane z visokimi temperaturami ali drugimi tehnološkimi postopki (baktofugiranje, mikrofiltracije, konzervansi...), ki zagotavljajo popolno ali vsaj večinsko uničenje mikrobne populacije. Lahko rečemo, da je vsebovala hrana včasih mnogo več bakterij, kot jih vsebuje danes. Nedolžne žrtve naše vojne proti patogenim bakterijam in tehnološkim škodljivcem pa so tudi tiste bakterije, ki so za ohranjanje stabilnosti mikrobiote prebavil in s tem gostiteljeve obrambe, nujno potrebne.

Stabilno mikrobioto pa lahko porušijo tudi drugi neugodni dejavniki, kot so okužbe, različne bolezni, uživanje zdravil (predvsem antibiotikov), kemoterapije, radioaktivna obsevanja in pooperativna stanja, pri katerih je moteno ali oteženo normalno prehranjevanje, pa tudi stresne situacije, povezane z nezdravim življenjskim slogom ter nerednim in neuravnoteženim prehranjevanjem.

Glavni namen uživanja probiotikov je torej ohranjanje, obnavljanje in bogatenje črevesne mikrobiote s koristnimi bakterijami.

## **UČINKOVITOST IN VARNOST PROBIOTIKOV**

Med selekcijskimi merili za probiotične bakterije sta poglobitna dokazana učinkovitost in varnost.

Skoraj neverjetno je pričakovati, da bi lahko imelo uživanje probiotičnih bakterij velik učinek na tako kompleksen in specifičen mikrobni sistem, kot je črevesna mikrobiota. Takšno razmišljanje je marsikdaj vneslo v koncept probiotikov nemalo dvoma.

Razmah tržišča za probiotike na eni strani in pomanjkanje znanstveno potrjenih rezultatov o učinkovitosti probiotikov na drugi je vzpodbudil sistematične raziskave, ki so prispevale k oblikovanju enotnih selekcijskih kriterijev za probiotične seve in postopkov ugotavljanja varnosti novih sevov. Z dokazanimi kliničnimi učinki nekaterih proučevanih probiotičnih sevov so potrdili hipotezo, da lahko zaužiti probiotiki preživijo prehod do črevesa, ga vsaj začasno naselijo, učinkujejo na črevesno mikrobioto in s tem na metabolizem ter modulirajo gostiteljev imunski sistem. Čeprav so učinki probiotikov na stabilno mikrobioto majhni, pa so zadostni, da pri nekaterih patoloških situacijah ugodno spremenijo potek bolezni. Pozitivni zdravstveni učinki so bili izmerjeni v kliničnih raziskavah, v katere so bili vključeni zdravi ljudje in ljudje z različnimi zdravstvenimi težavami.

Kriteriji za izbiro probiotičnih sevov, ki se še vedno dopolnjujejo, so strogi ter vključujejo varnostni, funkcionalni in tehnološki

vidik. Ne glede na to, ali se uporabljajo probiotiki kot dodatki živilom, prehranska dopolnila ali OTC zdravila, morajo izpolnjevati osnovna selekcijska merila. Sev, ki ga uporabljamo kot probiotik, mora biti natančno taksonomsko opisan (imeti mora ime), poznane morajo biti vse njegove lastnosti. Pri ugotavljanju varnosti seva je treba upoštevati več vidikov: proučevanje značilnosti seva, farmakokinetike in odkrivanje interakcij med probiotičnim sevom in gostiteljem.

Poznavanje preživetja v prebavilih, translokacija in kolonizacijske lastnosti ter narava in aktivnost metabolitov so pomembni pri ugotavljanju pozitivnih in možnih negativnih učinkov. Z vidika varnosti je pomembno, da probiotični sevi ne povzročajo sistemskih okužb in prebavnih težav, da ne izločajo encimov s škodljivim delovanjem, kot je na primer razgradnja glikopeptidov črevesne sluzi ali dekonjugacija žolčnih soli, ter da ne vsebujejo prenosljivih genov za odpornost proti antibiotikom. Obenem pa mora probiotični sev zadostiti tudi merilom funkcionalnosti, kot so: odpornost proti kislini, želodčnemu soku in žolču, sposobnost vezave na črevesne epitelne celice in ohranjanje aktivnosti v človeških prebavilih.

Probiotični sev mora torej ostati presnovno aktiven v prebavilih, na ciljnem mestu. Med želene lastnosti spada zato sposobnost probiotične bakterije, da se veže na črevesno površino. To je pogoj, da bakterija vsaj začasno kolonizira črevo. Vezava je pomembna tudi pri spodbujanju imunskega sistema, saj omogoča probiotični bakteriji kontakt z limfoidnim tkivom

debelega črevesa, ki je posrednik lokalnih in sistemskih imunskih odzivov. Do nedavna je veljalo, da samo adhezivne bakterije učinkovito inducirajo imunski odziv in stabilizirajo črevesno zaščito, vendar nove raziskave, ki proučujejo komunikacije (crosstalk) med bakterijami in črevesnim epitelom, kažejo na to, da adhezija ni vedno nujna. Adhezija pa vsekakor zagotavlja tekmovalnost in odstranjevanje/izločanje patogenih bakterij iz črevesne površine.

## **UPORABA PROBIOTIKOV**

Uporaba probiotikov kot prehranskih dopolnil je dobila v zadnjih letih izjemne razsežnosti. Ker spadajo probiotiki v novo generacijo izdelkov, ki brišejo meje med živili, prehranskimi dopolnili in zdravili, je zakonodaja še v fazi oblikovanja. Lahko rečemo, da se na policah trgovin vsakodnevno pojavljajo novi probiotični izdelki kljub temu, da so le redke probiotične bakterije dovolj znanstveno proučene v smislu njihovega vpliva na zdravje. Ker so največkrat to bakterije s statusom GRAS (generally regarded as safe – na splošno veljajo kot varne) in že dolgo v uporabi, morajo izdelki zadostiti samo kriterijem, ki veljajo za vso hrano ali prehranska dopolnila. Regulativa večine držav zato še ne dovoli, da bi bili na takšnih izdelkih napisi, ki bi kakorkoli namigovali na “zdravljenje”. Namenjeni so predvsem preventivi, to je vzdrževanju ravnotežja črevesne mikrobiote in vzpodbujanju imunskega sistema v smislu utrjevanja odpornosti organizma. Sem spadajo preprečevanje

črevesnih okužb, potovalnih drisk, drisk pri zdravljenju z antibiotiki, zmanjševanje škodljive fekalne encimske aktivnosti in preprečevanje simptomov sekundarne laktozne intolerance.

V znanstvenih revijah pa je v zadnjem času vse več objav rezultatov, ki potrjujejo možno uporabo probiotikov pri zdravljenju zaprtja in sindroma razdražljivega črevesa, gastroenteritisa, rotavirusne driske, pri preprečevanju širjenja rotavirusnih okužb med otroci v bolnišnici, preprečevanju ponavljajočih okužb s *Clostridium difficile*, preprečevanju in zdravljenju drisk, povezanih s terapijami z antibiotiki (AAD), zdravljenju Chronove bolezni in ulceroznega kolitisa, okužb s *Helicobacter pylori*, zmanjševanju alergijskih simptomov, kot so atopični rinitis, atopični ekcemi, nazalne alergije in alergije na hrano. Obetavno področje pa je tudi podporno zdravljenje raka debelega črevesa in lajšanje spremljevalnih pojavov obsevanj pri bolnikih z rakom. Seveda pa morajo probiotiki pri klinični uporabi prestati vse teste in postopke za registracijo, kot je to zahtevano za zdravila.

Ker so probiotične bakterije, ki jih uživamo z živili ali kot prehranska dopolnila, običajno predstavniki naravne črevesne mikrobiote, jih lahko uživamo brez strahu, da bi postali od njih odvisni ali pa, da bi jih zaužili preveč. Koristno črevesno mikrobioto le dopolnjujejo, nadomestijo pa samo takrat, kadar lastna mikrobiota zaradi okoljskih vplivov opeša. Brez strahu jih lahko ponudimo tudi otrokom. Seveda velja to samo takrat, kadar je probiotično prehransko dopolnilo kakovostno in preverjeno glede sestave, funkcionalnosti in varnosti.

## TRENTNO STANJE NA TRGU

Promocija novega probiotičnega izdelka na trgu združuje sklop postopkov, ki ob pravilnem izvajanju zagotavljajo pravilno deklariran, funkcionalen in varen proizvod. Pogosto pa se zgodi, da se proizvajalci zanašajo le na uveljavljeni status laktobacilov in bifidobakterij kot varnih bakterij (GRAS), pri tem pa zanemarijo pomembne lastnosti probiotičnih izdelkov, kot so taksonomska razvrstitev probiotičnih bakterij, prisotno število in viabilnost, odpornost proti antibiotikom in virulentnost. Mikrobiološke analize probiotičnih izdelkov in pripravkov tako nemalokrat razkrijejo neskladje med številom in vrsto dejansko izoliranih sevov iz izdelka ter informacijo na deklaraciji.

Probiotični izdelki, pa naj gre za živila ali prehranska dopolnila, morajo izpolnjevati naslednje zahteve:

1. Izdelki morajo biti varni,
2. Če so navedeni učinki na zdravje, morajo biti ti ustrezno dokazani (v kliničnih raziskavah na ljudeh).
3. Izdelki morajo biti jasno in natančno označeni, tako da je potrošnik ob nakupu nedvoumno seznanjen z vsebino izdelka. Kupcu prijazna deklaracija bi morala vsebovati naslednje informacije:
  - zaznamek, ali so prisotne žive bakterije,
  - natančen opis bakterij,
  - velikost populacije posameznega bakterijskega seva, zapisane v enotah, razumljivih porabniku in strokovno pravih,

- minimalno količino izdelka/bakterij, ki še ima zdravju koristne učinke,
- natančno vsebnost bakterij za obdobje, ko je izdelek na trgu, torej do konca roka obstojnosti in ne samo podatek o številu bakterij v svežem izdelku,
- navedba ciljne populacije, ki ji je izdelek namenjen, navedba, kdo naj se posvetuje z zdravnikom pred uporabo izdelka.