

Modulace lidské respirační imunity imunobiotiky

Cílená kombinace prospěšné bakterie *Lacticaseibacillus rhamnsosus* CRL1505, beta-glukanů a vitamínu D



Cílená kombinace prospěšné bakterie *Lacticaseibacillus rhamnsosus* CRL1505, beta-glukanů a vitamínu D

Kombinace bakterie mléčného kvašení *Lacticaseibacillus rhamnosus* CRL1505 (Lr1505) a beta-glukanů byla vybrána na základě jejich vědecky a klinicky prokázané schopnosti regulace imunitní odezvy mimo gastrointestinálního traktu, včetně sliznice dýchacích cest.



IN VIVO STUDIE

Několik současných studií demonstrovalo značný dosah střevní mikrobioty na vrozené antivirové mechanismy imunity respiračního systému přes její vliv na **a)** respirační epitelové buňky, **b)** respirační dendritické buňky (DC) a **c)** plicní makrofágy. Vliv střevní mikrobioty na vrozenou imunitu také modifikuje humorální adaptivní imunitní reakce (Obr. 1) (1).

Za účelem studování mechanismů zapojených do posílení respirační antivirové imunity zprostředkované Lr1505, byly provedeny studie na zvířecích modelech s použitím dvou respiračních virů: respirační synciciální virus (RSV) a virus chřipky (z angl. *Influenza virus* - IFV).

Za účelem studování mechanismů zapojených do posílení střevní i respirační antibakteriální imunity zprostředkované Lr1505, byly provedeny studie na zvířecích modelech s použitím bakterií: *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* a *Streptococcus pneumoniae* (4).

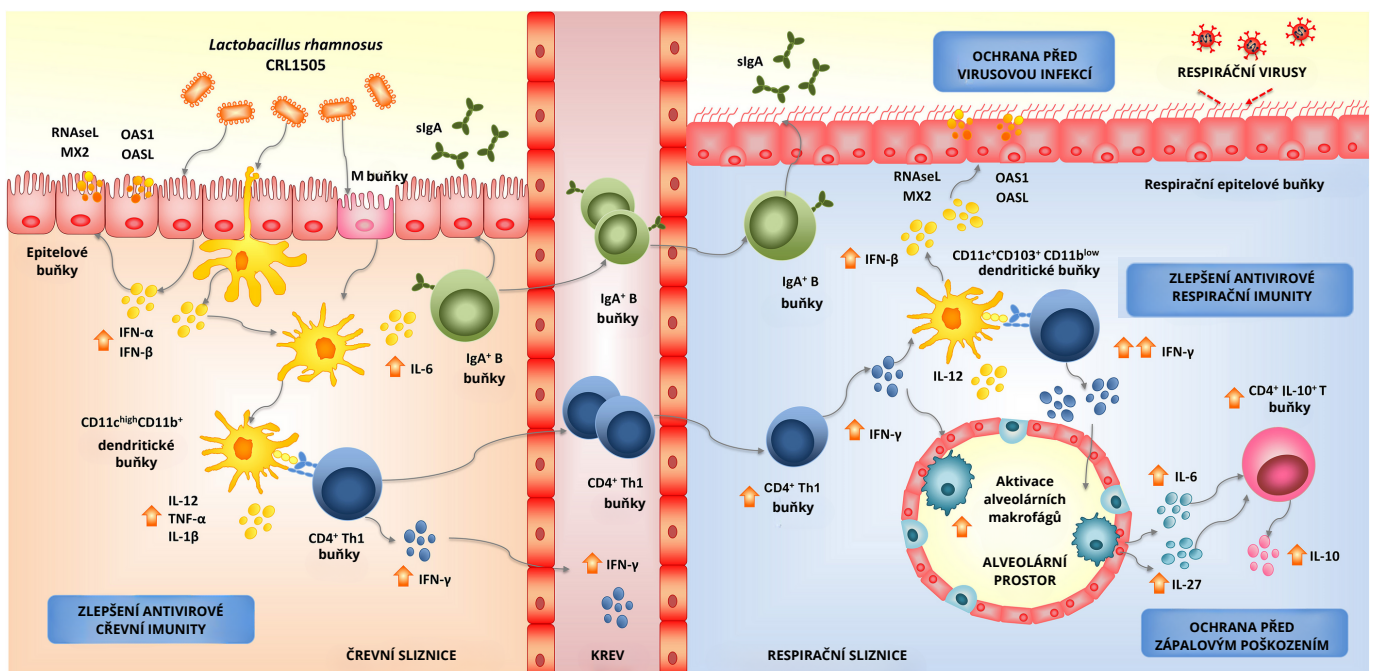
1) Respirační vrozená antivirová imunitní odpověď a *L. rhamnosus* CRL1505

Výsledky studie ukázaly, že orálně podávaný kmen Lr1505 byl schopen významně snížit virové titry v plicích, snížit poškození plic a zvýšit přežití myši v reakci na infekce RSV (2) nebo IFV (3). Ochranný účinek vyvolaný Lr1505 byl spojen s jeho schopností zvýšit hladiny IFN typu I v respiračním traktu (1,2,3).

Prokázala se také zlepšená prezentace antigenu zprostředkovaná Lr1505, což by mohlo mít příznivý účinek na respirační humorální imunitní odpověď (1).

3) Intestinální antivirová imunitní odpověď a *L. rhamnosus* CRL1505

Další studie provedené na střevních epitelových buňkách ukázaly, že Lr1505 je schopen zvýšit



Obr. 1. Modulační respirační antivirové imunity pomocí *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. Navrhovaný mechanismus pro distální imunomodulaci indukovanou imunobiotickým kmenem *L. rhamnosus* CRL1505 a zvýšení odolnosti proti virovým infekcím prostřednictvím zlepšení respiračních vrozených a adaptivních antivirových imunitních odpovědí. (upraveno podle Villena a Kitazawa, 2020).

Probiotický kmen Lr1505 vyvolal mobilizaci CD4(+)IFN-γ(+) T buněk ze střeva do dýchacího traktu, čímž se zvýšila lokální produkce IFN-γ, klíčového aktivátoru vrozeného a adaptivního imunitního systému, a stimulovaly se buňky prezentující antigen (2, 5) (Obr. 1).

2) Respirační adaptivní antivirová imunitní odpověď a *L. rhamnosus* CRL1505

Hodnocení populace plicních dendritických buněk (DC) u myši po perorálním podání Lr1505 ukázalo zvýšené hladiny CD11c(+)CD103(+) a CD11c(+)CD11b(high) DC.

produkcí IFN typu 1 (6), zlepšit expresi IFN-α a IFN-β jakož i různých antivirových faktorů (Nplr3, Oas1, aj.) potřebných pro efektivní obranu vůči virům (7).

4) Antibakteriální imunitní odpověď a *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505

Perorální suplementace Lr1505 se osvědčila i v případě enteropatogenních bakterií a prokázala se i stimulace imunitního systému respirační sliznice. Zvýšením hladin IFN-γ v důsledku užívání Lr1505 v séru a ve střevní tekutině se podařilo aktivovat peritoneální makrofágy, což vedlo ke zvýšené eliminaci enteropatogenů *S. typhimurium* (8).

Podávání Lr1505 významně zvýšilo i hladiny antipneumokokových respiračních a sérových IgA a IgG protilátek, což poukazuje na příznivý účinek na protilátkovou odpověď v případě infekce *Streptococcus pneumoniae* (4).

KLINICKÉ STUDIE

- 6-měsíční (červenec-prosinec), na souboru 298 dětí s Lr1505
- způsob účinku imunomodulace prokázán i v *in vivo* a klinické 8-týdenní studii, na souboru 60 jedinců s teplem usmrceným Lr1505 (HkLr1505)
- randomizované
- dvojitě zaslepené
- placebem kontrolováno

Výsledky první studie, provedené na skupině dětí ve věku 2-5 let naznačují výrazné zmírnění závažnosti a snížení incidence gastrointestinálních a respiračních infekcí zejména u malých dětí a to přímým antimikrobiálním účinkem a posílením funkce slizniční bariéry v důsledku účinků bakterie Lr1505 na vrozenou i adaptivní.

Výsledky studie mechanismu účinku, realizované na dospělé populaci 60 zdravých jedinců poukázaly i na schopnost teplem-usmrcené bakterie Lr1505 udržet optimální stav imunitního systému jakož i fyzickou kondici působením na a aktivaci pDC buněk, které působí na celou imunitní funkci, což potvrdilo imunomodulační potenciál živého kmene Lr1505.

Úvod

Infekční onemocnění jako akutní zánět středního ucha, faryngitida a tonzilitida, infekce horních cest dýchacích, zápal plic, bronchitida, průjem jsou i nadále jednou z hlavních příčin úmrtí dětí předškolního věku (9-11).

Nárůst rezistence na antibiotika a potřeba nových a zlepšených strategií pro řešení infekčních chorob vedly k přezkoumání **terapeutického potenciálu indukované modulace slizniční imunitní odpovědi pomocí probiotik**.

V důsledku toho bylo zjištěno, že některé probiotické bakterie mléčného kvašení (LAB) mají ochranné účinky proti bakteriálním a virovým infekcím v gastrointestinálním traktu (12)

Značná pozornost se soustředila na roli probiotik při ochraně střeva před patogeny. Stále však přibývá více důkazů, že perorálně podávaná probiotika jsou schopna regulovat imunitní reakce mimo gastrointestinální trakt, včetně sliznice dýchacích cest (13).

První klinická studie odhalila, že probiotikum Lr1505 přidávané do jogurtu **posílilo a zlepšilo slizniční imunitu a snížilo výskyt a závažnost střevních a respiračních infekcí u dětí (14)**.

V roce 2023 byly ukončeny klinické studie na bázi výživového doplňku na dětské a dospělé populaci a výsledky korespondují se závěry studie s probiotickým jogurtem. To znamená, že nosič pro bakterie není klíčový a jejich efekt je přenosný. Studie budou publikovány v průběhu roku 2024.

Metodika

Do studie byly zařazeny zdravé děti navštěvující centra denní péče pět dní v týdnu. Probiotický kmen Lr1505 byl přidán do oslazeného jogurtu s obsahem nejméně 1×10^8 jednotek tvořících kolonie (CFU)/100 g (14).

Placebo skupině byl podáván tentýž jogurt bez obsahu Lr1505.

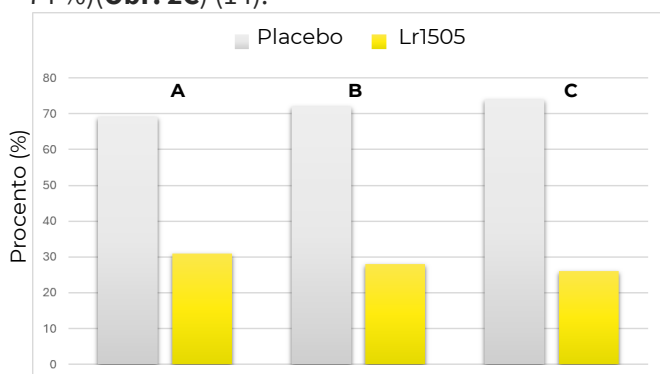
Obě skupiny byly po celou dobu studie (6 měsíců) sledovány odborníky na výživu, pediatry a imunology.

Na začátku a na konci studie byly odebrány vzorky stolice, aby se určil počet bakterií mléčného kvašení. Kromě toho byly stanoveny hladiny IgA ve slinách (14).

Výsledky

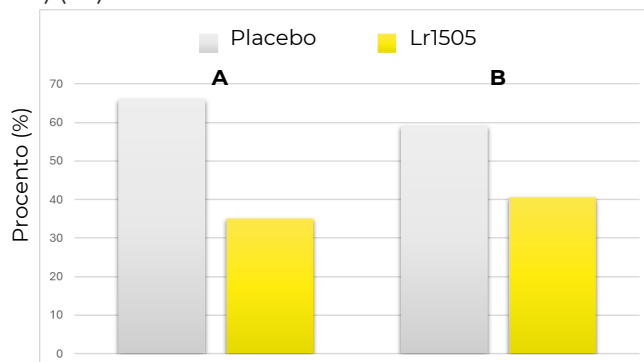
1) Výskyt infekcí

Z celkového počtu 298 dětí, které se zúčastnily studie, 132 (45 %) z nich mělo během studie infekční onemocnění. Nejčastějšími infekčními onemocněními byly **infekce horních cest dýchacích, dále faryngitida a tonzilitida a průjem**. Ve skupině dětí, které dostávaly jogurt s probiotickým kmenem *L. rhamnosus* CRL1505 (Lr1505), byl pozorován významný **pokles infekčních onemocnění** ve srovnání se skupinou s placebem (34 % oproti 66 %). Analýza následně odhalila významné rozdíly mezi placebo skupinou a skupinou s Lr1505 v případě výskytu infekčních onemocnění a to: infekce horních cest dýchacích (31 % oproti 69 %)(**Obr. 2A**), faryngitida a tonzilitida (28 % oproti 72 %)(**Obr 2B**) a akutní průjem (26 % oproti 74 %)(**Obr. 2C**) (14).



Obr. 2: Porovnání výskytu infekčních onemocnění u testovaných skupin, **A:** infekce horních cest dýchacích, **B:** tonzilitida a faryngitida, **C:** průjem (upraveno podle Villena a kol., 2012)

Byly rovněž hodnoceny klinické účinky suplementace probiotik na výskyt horečky a potřebu antibiotické léčby. Zjistilo se, že subjekty ve skupině s probiotikem Lr1505 v jogurtu měly výrazně nižší výskyt horečky (**Obr. 3A**). Kromě toho **potřeba antibiotické léčby** u dětí konzumujících probiotika byla výrazně nižší než ve skupině s placebem (**Obr. 3B**) (14).



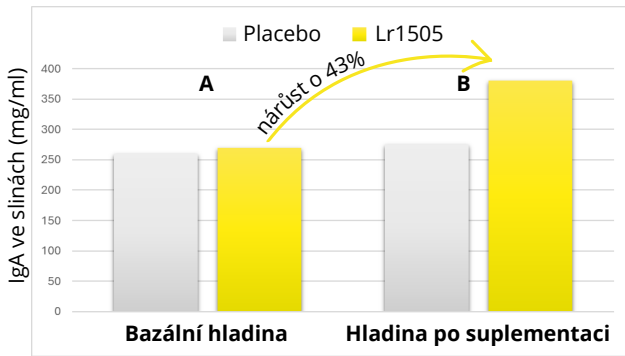
Obr. 3: Procentuální srovnání **A)** přítomnosti horečka a **B)** nutnosti antibiotické terapie u testovaných skupin (upraveno podle Villena a kol., 2012)

2) Hladiny imunoglobulinu A (IgA) ve slinách

Bylo provedeno i stanovení IgA ve slinách za účelem stanovení **míry slizniční imunity**. Vzorky byly odebrány den před začátkem intervence (bazální hladiny) a na konci podávání probiotik nebo placebo (hladiny po suplementaci). Při srovnání probiotického jogurtu a placebo nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v bazálních hladinách IgA.

Naopak bylo pozorováno **významné zvýšení hladin IgA u dětí, které dostávaly probiotický jogurt**, zatímco hladiny IgA po suplementaci ve skupině s placebem byly podobné těm, které byly naměřeny na začátku studie. Konzumace probiotik s obsahem kmene Lr1505 je proto schopna zlepšit slizniční imunitu, o čemž svědčí i hladina IgA ve slinách (Obr. 4) (14).

Výsledky studie naznačují, že probiotikum Lr1505 napomáhá snížit výskyt infekcí horních cest dýchacích a gastrointestinálního traktu, podporuje imunitní systém a snižuje potřebu konzumace antibiotik.



Obr. 4. Hladiny IgA ve slinách ve skupinách s Lr1505 a placebem. (upraveno podle Villena a kol., 2012)

MECHANISMUS ÚČINKU

Imunitní systém člověka představuje účinný obranný mechanismus před všudypřítomnými bakteriemi a viry, kterým jsme vystaveni každý den a jeho vitalitu je třeba udržet a podpořit.

Předpokládá se, že **plazmocytoïdní dendritické buňky (pDC)** jsou důležité při aktivaci a regulaci imunitních funkcí. Aktivace pDC aktivuje různé imunitní buňky zodpovědné za vrozenou a získanou imunitu zvýšením IFN- α , HLA-DR a jiných důležitých imunitních molekul, což vede k normálnímu udržení celkové imunitní funkce (16).

Tato klinická studie odhalila také potenciál **teplem usmrcené bakterie Lr1505 (HkLr1505)** podpořit **udržení normální imunitní funkce aktivací pDC** buněk jakož i redukovat symptomy onemocnění v době infekce (15), což umocňuje zjištění z předešlé klinické studie (14).

Metodika

Klinická studie byla realizována na zdravých jedincích obou pohlaví ve věku 20-64 let po dobu 8 týdnů, kteří nebyli léčeni a neměli vážné či chronické onemocnění, neměli nikdy střevní onemocnění ovlivňující trávení či absorpci a za období posledních 2 let, neměli infekční onemocnění dýchacích cest. Účastníkům studie byla podávána pilulka s **a)** obsahem HkLr1505 nebo **b)** bez obsahu HkLr1505 (placebo skupina) (15).

pDC aktivita byla vyhodnocena měřením exprese hladin HLA-DR a CD86. Celkový zdravotní stav byl hodnocen sérií zdravotních dotazníků a sledován lékařem (15).

Výsledky

1) Hladiny HLA-DR

Při hodnocení imunitní funkce se HLA-DR snížila v obou skupinách po 8 týdnech konzumace, ale zůstala významně vyšší ve skupině s HkLr1505 než ve skupině s placebem (15).

2) Celková fyzická kondice

Při hodnocení fyzického stavu byly kumulativní počty dní dílčích symptomů (jako je ucpaný nos, nepříjemné pocity v krku, tíha v hrudníku, chrapot, bolesti hlavy, nevolnost, bolesti kloubů a svalů, bolesti žaludku během období příjmu) výrazně redukovány ve skupině s HkLr150 srovnání se skupinou s placebem (15).

3) PG05 - Klíčový aspekt imunomodulační aktivity bakterie Lr1505

Jedním z klíčových prvků identifikovaných v interakci Lr1505 a HkLr1505 s hostitelem je jeho **kmenově specifický peptidoglykan (PG05)**; součást buněčné stěny živé i teplem usmrcené bakterie), o kterém se prokázalo, že **má imunomodulační aktivitu**. PG05 významně zvyšuje produkci specifických protilátek a počet alveolárních makrofágů (AM) produkujících IFN- β . Tyto buňky hrají klíčovou roli v prospěšné modulaci vrozené imunitní odpovědi během virových a bakteriálních infekcí (17).

Závěr

Závěry studie, zabývající se mechanismem účinku imunomodulační aktivity teplem-usmrcené Lr1505 potvrzují a umocňují výsledky z předchozí klinické studie, prováděné na dětské populaci, jakož i výsledky klinické studie, realizované na dospělé populaci, která bude publikována v průběhu roku 2024.

IMUNOMODULAČNÍ EFEKT BETA-GLUKANŮ

V současnosti je většina prebiotik na trhu odvozena z nestravitelných oligosacharidů, avšak nejnovější výzkum se zaměřuje i na nestravitelné komplexní sacharidy s dlouhým řetězcem jako jsou **beta-glukany**, získávané z různých potravinových zdrojů, které prokázaly nejen účinky podporující zdraví, ale také potenciál nového zdroje prebiotik. Nejnovější byl zkoumán vliv konzumace **(1,3)-(1,6)-β-D-glukanu** s dlouhým řetězcem izolovaným z **kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*** na počet epizod nachlazení u zdravých jedinců pomocí placebem kontrolované, dvojitě zaslepené, randomizované, multicentrické klinické studii, která prokázala, zvýšení potenciálu imunitního systému člověka bránit se proti invazním patogenům (18).

Beta-glukan (1,3)-(1,6)-β-D-glukan s dlouhým řetězcem izolovaný z kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, **stimuluje imunitní buňky ve střevě, aby spustily nespecifickou nebo specifickou imunitní odpověď**, která aktivuje takzvané "scavenger cells" (makrofágy) v Peyerových plátech. Tyto "vyčytávací" buňky začínají destrukcí patogenů a aktivují další obranné buňky, jako jsou B- a T-buňky nebo dendritické buňky. Podporou bílých krvinek tento beta-glukan ve velké míře přispívá k boji proti bakteriím, virům, houbám a parazitům, které způsobují nemoci (19).

Vitamin D

Enzymy metabolizující vitamin D a receptory vitaminu D jsou přítomny také v imunitních buňkách (buňky prezentující antigen, T buňky, B buňky, monocyty). Údaje in vitro ukazují, že kromě modulace vrozených imunitních buněk podporuje vitamin D také tolerogennější imunologický stav. Údaje in vivo ze zvířat a ze studií suplementace vitaminu D u lidí prokázaly příznivé účinky vitaminu D na imunitní funkci, zejména v kontextu autoimunity (20).

Reference

- (1) Villena J, Kitazawa H. The Modulation of Mucosal Antiviral Immunity by Immunobiotics: Could They Offer Any Benefit in the SARS-CoV-2 Pandemic? *Front Physiol.* 2020 Jun 16;11:699.
- (2) Chiba E, et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 17: 373–382.
- (3) Zelaya H, et al. (2014). Immunobiotic lactobacilli reduce viral-associated pulmonary damage through the modulation of inflammation-coagulation interactions. *Int. Immunopharmacol.* 2014; 19: 161–173.
- (4) Salva S, et al. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections. *Int. J. Food Microbiol.* 2010; 141: 82-9.
- (5) Villena J, et al. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunol.* 2012a;13:53.
- (6) Villena J, et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial and antigen presenting cells. *BMC Microbiol.* 2014; 14:126.
- (7) Albarracin L, et al. Transcriptomic analysis of the innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells: influence of immunobiotic lactobacilli. *Front. Immunol.* 2017; 8:57.
- (8) Chen Y, et al. Recombinant murine gamma interferon induces enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection in neonatal mice. *Infection and Immunity*, 1989; 57: 2345–2349.
- (9) Bryce J, et al. WHO Child Health Epidemiology Reference Group. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005; 365: 1147-52.
- (10) Lopez AD, et al. Global and regional burden of disease and risk factors: systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367: 1747-57
- (11) Black RE, et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet* 2008; 371: 243-60.
- (12) Pang IK, Iwasaki A. Control of antiviral immunity by pattern recognition and the microbiome. *Immunol Rev* 2012; 245: 209-26.
- (13) Villena J, et al. Lactic acid bacteria in the prevention of pneumococcal respiratory infection: future opportunities and challenges. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 1633-45.
- (14) Villena J, et al. Probiotics for Everyone! The Novel Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and the Beginning of Social Probiotic Programs in Argentina. *Int J Biotechnol Wellness Ind.* 2012;1: 189-198
- (15) Kohei Fujiki et al., Effects of food containing heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 on immune function and physical conditions—A randomized, double-blinded placebo-controlled, parallel-group study—, *薬理と治療*, 2023; 51: 941-949
- (16) Lande R, Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells: key players in the initiation and regulation of immune responses. *Ann N Y Acad Sci*, 2010; 1183: 89-103.
- (17) Clua P, et al. The Role of Alveolar Macrophages in the Improved Protection against Respiratory Syncytial Virus and Pneumococcal Superinfection Induced by the Peptidoglycan of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Cells.* 2020; 9(7):1653.
- (18) Auinger A, et al. Yeast (1,3)-(1,6)-beta-glucan helps to maintain the body's defence against pathogens: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentric study in healthy subjects. *Eur J Nutr.* 2013; 52: 1913–1918.
- (19) Dharsono T, et al. Effects of Yeast (1,3)-(1,6)-Beta-Glucan on Severity of Upper Respiratory Tract Infections: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study in Healthy Subjects. *J Am Coll Nutr.* 2019;38(1):40-50.
- (20) Prietl B, et al. Vitamin D and Immune Function. *Nutrients.* 2013; 5(7): 2502-2521.