

Ženské zdraví a mikrobióm

Cílená kombinace prospěšné bakterie *Lacticaseibacillus rhamnosus* CA15, rostlinných extraktů ze šafránu a olivových listů, vitamínu B3 a B7.



KLINICKÁ STUDIE

- 30denní
- randomizovaná
- dvojitě zaslepená
- placebem kontrolovaná
- na souboru 60 žen s příznaky a symptomy vaginální dysbiózy

Perorální konzumace probiotického kmene *L. rhamnosus* CA15 ve studii znamenala významné zlepšení klinických příznaků a symptomů nejen 10 dní po zahájení léčby (T1), ale i 30 dní po ukončení léčby (T2).

Cílená kombinace prospěšné bakterie *Lacticaseibacillus rhamnosus* CA15, rostlinných extraktů ze šafránu a olivových listů, vitamínu B3 a B7

Kombinace probiotické bakterie *Lacticaseibacillus rhamnosus* **CA15** (**CA15**), rostlinných extraktů ze šafránu a olivových listů, vitamínu B3 a B7 byla vybrána na základě jejich vědecky prokázaných pozitivních účinků na obnovení a udržení rovnováhy vaginální mikrobioty, jakož i na zvládnutí symptomů spojených s PMS či menopauzou.



Úvod

Vaginální mikrobiota (VM) je dynamický ekosystém složený z bakterií, virů, archeí, hub a prvků (1, 2). Za fyziologických podmínek hraje VM klíčovou roli ve zdraví žen jako ochránce před patogenními mikroorganismy. Obecně se uvádí, že u zdravých žen v reprodukčním věku ve vyvážené VM dominují laktobacily (3).

Laktobacily mohou produkcí metabolitů (např. kyseliny mléčné), antimikrobiálních látek, jako jsou bakteriociny a peroxid vodíku, a interakcí s vrozeným imunitním systémem hostitelky chránit vaginální sliznici před potenciálně škodlivými mikroorganismy (4). V případě VM nedominantního laktobacilu se uvádí vysoké riziko nepříznivých

zdravotních výsledků. Snížení nebo ztráta laktobacilů je spojena zejména s vaginálními infekcemi, jako je bakteriální vaginóza (BV), vulvovaginální kandidóza (VVK), smíšená vaginitida, sexuálně přenosná infekce (SPI) a spontánní předčasný porod (1–3).

Standardní léčba BV zahrnuje použití metronidazolu (topického nebo perorálního) nebo klindamycinu (topického) (4), zatímco polyeny (např. nystatin) a azoly se obvykle podávají v případě VVK (5).

Bohužel antibiotika a antimykotika nejsou vždy účinná, protože mikroorganismy odpovědné za BV a VVK mohou odolávat vytvářením biofilmů nebo získáním rezistence (6, 7). Kromě toho mohou antibiotika, která nepůsobí selektivně proti patogenům, negativně ovlivnit endogenní laktobacily a následně potenciálně podporovat recidivu BV a VVK (8). Na základě těchto důkazů jsou zapotřebí alternativní strategie k vyvážení VM a udržení zdravého vaginálního ekosystému. Údaje z klinických studií a metaanalýz naznačují, že probiotika mohou hrát pozitivní roli při léčbě vaginální dysbiózy (9–11).

Současná randomizovaná dvojité zaslepená placebo kontrolovaná studie byla provedena za účelem vyhodnocení účinnosti potenciálního probiotického kmene *L. rhamnosus* CA15, podávaného perorálně, při léčbě vaginální dysbiózy. Na základě toho byly hodnoceny klinické parametry a subjektivní vaginální symptomy žen.

Metodika

Do studie bylo zařazeno 60 zdravých žen v reprodukčním věku (18–45 let) s vaginálními příznaky a příznaky vaginálních infekcí, potvrzenými klinickými a mikrobiologickými analýzami.

Pacientky zařazené do aktivní skupiny užívaly 1 perorální kapsli po dobu 10 po sobě jdoucích dnů. Každá aktivní kapsle obsahovala 10×10^9 CFU/g probiotického kmene *L. rhamnosus* CA15. Placebo sestávalo z identické kapsle obsahující kukuřičný škrob jako pomocnou látku. Vyšetření každé ženy bylo naplánováno ve třech termínech: základní linie (T0), 10 dní po zahájení léčby (T1) a 30 dní po ukončení léčby (T2).

Kromě toho byla kvalita života hodnocena pomocí dotazníku WHO pro hodnocení kvality života na začátku léčby (T0) a 30 dní po ukončení léčby (T2).

Výsledky

Diagnostické parametry

Výsledky klinických příznaků a symptomů zaznamenaných v časech odběru vzorků T0, T1 a T2 jsou znázorněny na **Obr. 1** (panely A a B).

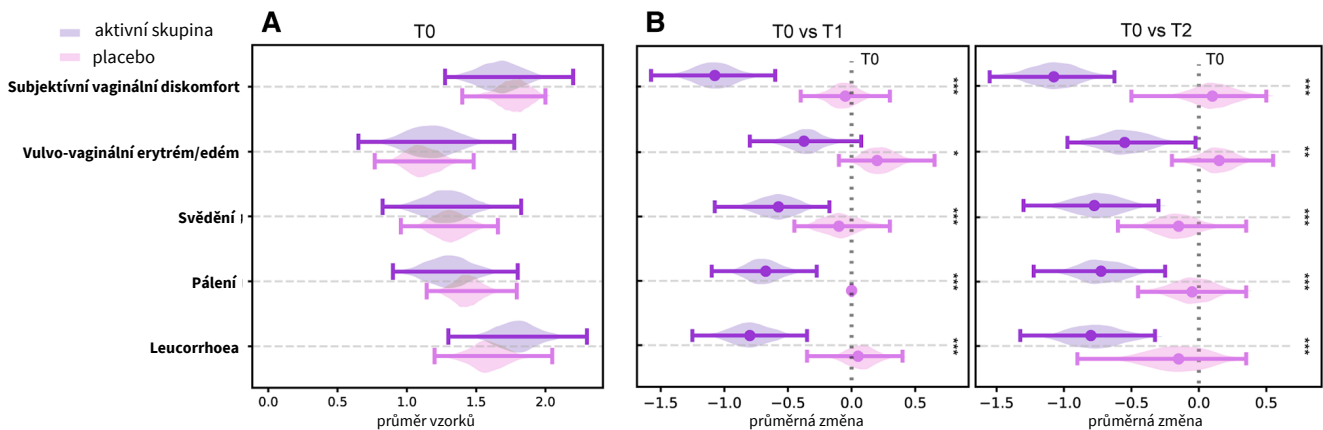
Ve srovnání s výchozí hodnotou (T0) bylo hlášeno statisticky významné snížení skóre souvisejícího s příznaky, které ženy samy hlásily v aktivní skupině 10 dní po zahájení léčby (T0 vs. T1). V podstatě nezměněné výsledky byly získány 30 dní po ukončení léčby (T0 vs. T2).

Na druhé straně skóre zaznamenané ve skupině s placebem v časech odběru vzorků T1 i T2 bylo mnohem blíže skóre pozorovanému v T0 a nebylo statisticky významné (**Obr. 1B**).

Kromě toho bylo v aktivní skupině zjištěno významné snížení skóre Nugen v časech odběru vzorků T1 i T2. Zajímavější je, že v čase odběru vzorků T2 měly všechny účastnice zařazené do aktivní skupiny skóre Nugent mezi 0 a 3. Skóre této skupiny vždy vedlo k negativní korelaci v průběhu času. Skóre skupiny s placebem nekorelovalo, protože u nich došlo jen k mírnému a nevýznamnému kolísání v T1.

Složení bakteriální bioty podle počtu mikroorganismů

Celkově na začátku (T0) u všech účastnic v aktivní i placebo skupině dominovaly bakterie s potenciálně nevyváženými patogenními mikroorganismy se sníženou hustotou mikrobiálních buněk. V aktivní skupině perorální podávání kmene CA15 po dobu 10 dnů (T1) statisticky významně snížilo počet zkoumaných patogenů. Naopak bylo zjištěno významné zvýšení počtu laktobacilů o přibližně 4 log jednotky. Třicet dní po ukončení léčby (T2) bylo složení vaginální mikrobioty celkem stabilní a podobné tomu, které bylo pozorováno v době odběru vzorků T1. Ve skutečnosti při srovnání údajů získaných v době odběru vzorků T1 a T2 nezjistili



Obr. 1: Vnímání klinických příznaků. Distribuce bootstrapped středních hodnot se vztahovala ke skóre získanému hodnocením intenzity klinických příznaků a symptomů v T0 v obou skupinách (panel A). Rozdíly v distribuci středních hodnot T1 a T2 ve srovnání s T0 ve dvou různých skupinách (panel B). * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$ (upraveno podle Rapisarda et al., 2023).)

žádné významné rozdíly ve složení bakteriální bioty, což naznačuje, že vyvážený stav dosažený v čase T1 nebyl narušen. Odlišné chování bylo zjištěno ve skupině s placebem, u které nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly ve složení bakteriální bioty. Během celé studie byl zjištěn vysoký počet potenciálně patogenních bakterií a nízká buněčná hustota laktobacilů.

Závěr

Perorální konzumace kmene *L. rhamnosus* CA15 znamenala významné zlepšení klinických příznaků a symptomů nejen 10 dní po zahájení léčby (T1), ale i 30 dní po ukončení léčby (T2). Kmen CA15 byl bezpečným a účinným přístupem k obnovení a udržení vyvážené vaginální mikrobioty.

IN VITRO STUDIE

1) Antagonistická aktivita proti patogenům

Antagonistická aktivita proti patogenům, jejichž přítomnost je často spojena s různými dysbiózami urogenitálního traktu, byla hodnocena agarovým bodovým testem. Kmen *L. rhamnosus* CA15 vykazoval celkově široké spektrum antagonistické aktivity, přičemž nejvyšší antimikrobiální aktivita byla prokázána proti *Candida albicans* ATCC10231, *Candida krusei* ATCC 14243, *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018 a *Streptococcus agalactiae* DSM 2134. Na základě ošetření CFS byla antagonistická aktivita ve všech případech přisuzována produkci organických kyselin.

Úvod

Bakteriální vaginóza postihuje **23–29 % žen** v **reprodukčním věku**. Odhaduje se, že více než 75 % žen zažije alespoň jednu epizodu vulvovaginální kandidózy během svého života a že **opakované epizody** jsou velmi časté (12).

Za účelem studia účinku CA15 na vaginální dysbiózu a vaginální nepohodlí se ukázalo, že CA15 širokospektrálně **inhibuje adhezi a proliferaci patogenů**, včetně hub (tj. *Candida spp.*) a bakterií.

Kromě toho může CA15 **inhibovat tvorbu biofilmu** *Candida spp.* prostřednictvím vytlačování a soutěže o živiny.

Aby se zajistilo, že se CA15 dostane do vaginálního traktu, byl tento kmen testován in vitro a bylo prokázáno, že přežije **průchod gastrointestinálním traktem** a přilne k buněčným liniím střevního svalu, liniím vaginálních (VK2/E67) a střevních (Caco-2) buněk (13).

Mezi další přínosy CA15 pro zdraví žen patří jeho **protizánětlivé a antioxidační účinky**. CA15 **snížuje prozánětlivé cytokiny** IL-6 a **zvysuje cytokiny adaptivní imunity** IL-2.

2) Antiadhezivní aktivita proti biofilmům různých druhů Candida

Antiadhezivní aktivita kmene *L. rhamnosus* CA15 byla prokázána v testech předběžného potahování a společné inkubace. Procento antiadheze se pohybovalo od 87 % do 50,1 % a od 48,4 % do 20,1 % v testech předběžného potahování a koinkubace. Podrobněji, v testu předběžného potahování byla prokázána antiadhezivní aktivita proti *C. glabrata* (87 %) a *C. albicans* (84,6 %), následovaná *C. parapsilosis* (75,7 %), *C. tropicalis* (71,6 %) a *C. krusei* (50,1 %). V koinkubačním testu byla nejvyšší antiadhezivní aktivita prokázána proti *C. tropicalis* se 48,4% snížením tvorby biofilmu.

3) Přežití v podmínkách gastrointestinálního traktu in vitro

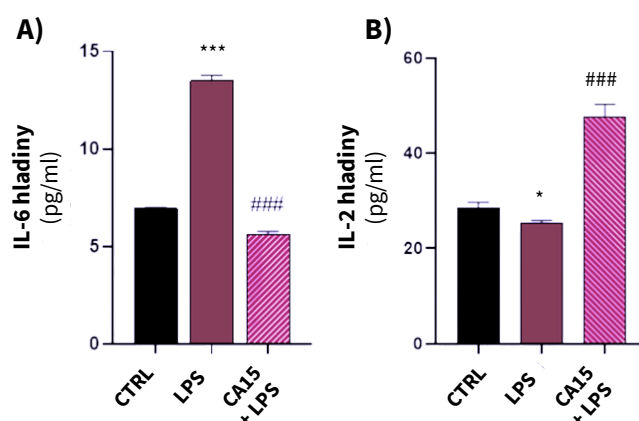
In vitro byla hodnocena tolerance na lysozym, kyslé podmínky a žlučové soli, stejně jako schopnost přežít během simulovaného gastrointestinálního (GI) tranzitu. Celkově kmen *L. rhamnosus* CA15 prokázal schopnost přežít v testovaných stresových podmínkách s mírou přežití (MP) vyšší než 80 %. Podrobně, kmen *L. rhamnosus* CA15 byl schopen přežít v kyselých podmínkách (pH 2,0 a 3,0) po 2 i 4 hodinách inkubace. Pokud jde o toleranci vůči lysozymu, kmen CA15 byl klasifikován jako rezistentní vůči lysozymu (14), protože vykazoval MP 95 % a 93 % po 30 a 120 minutách inkubace. Tolerance 0,5 % i 1 % solí hovězí žluči s MP vyšší než 80 % byla zaznamenána po 2 hodinách, resp. 4 hodinách inkubace. MP vyšší než 90 % byla pozorována po ošetření simulovanou žaludeční šťávou a simulovanou střevní tekutinou. Na základě počátečního počtu životaschopných buněk 9,13 log CFU/ml vykazoval kmen *L. rhamnosus* CA15 9,10 log CFU/ml životaschopných buněk po ošetření simulovanou žaludeční šťávou a 8,74 log CFU/ml po ošetření simulovanou střevní tekutinou.

4) In vitro antioxidační a protizánětlivé účinky a schopnost adheze na Caco-2 a lidské vaginální epiteliální buňky

V buněčných liniích Caco-2 ošetřených LPS po ošetření filtratem kultury kmene CA15 bylo zjištěno významné snížení hladin IL-6, což naznačuje schopnost kmene snižovat oxidační stres aj zánět

(Obr. 2A). Naopak, ošetření buněčných linií Caco-2 ošetřených LPS filtratem kultury kmene CA15 bylo schopné vyvolat zvýšení hladin IL-2 (Obr. 2B).

Kmen CA15 dále vykazoval i protizánětlivou aktivitu v diferencovaných lidských makrofázích léčených LPS. Podrobně, ve srovnání s neléčenými buňkami, léčba kmenem CA15 kultivačním filtrátem určila downregulaci genů COX-2 i IL-8, zatímco gen IL-10 byl upregulován. Kromě toho testovaný kmen vykazoval vazebnou schopnost k buněčným liniím Caco-2 i lidským vaginálním epiteliálním buněčným liniím (VK2/E6E7) s mírou 36,15 % $\pm$ 0,32 a 34,71 % $\pm$ 0,09, v daném pořadí.



Obr. 2: Měření hladin IL-6 a IL-2 v buněčných supernatantech pomocí ELISA (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0005$ vs. CTRL; a ### $p < 0,0005$ vs. LPS). (upraveno podle Pino et al., 2022)

OLIVOVÉ POLYFENOLY A MENOPAUZA

Je známo, že vaginální pH se v průběhu života ženy výrazně mění. Hnací silou variace pH jsou **estrogen**, **glykogen** a **laktobacily**. V aktivním věku ženy se hladina estrogenu začíná zvyšovat s funkcí vaječníků – vaginální epitel zhoustne a naplní se glykogenem, který endogenní degradací poskytne pH blízké se 5. Pokud jsou hladiny estrogenu narušeny, epitel ztrácí glykogen, což může vést k narušení rovnováhy pH a vzniku vaginální dysbiózy (15,16).

Menopauza znamená ukončení reprodukční fáze ženy, která je poháněna snížením produkce ovariálních hormonů, jako je estrogen. Často ji

doprovází, jako je estrogen. Často ji doprovází celá řada nejen fyzických, ale i psychických symptomů, které ovlivňují celkové zdraví a kvalitu života, jako jsou návaly horka, poruchy spánku, únava, suchá pokožka a snížené libido.

S přibývajícím věkem se rovnováha mezi tvorbou kostí a kostním obratem negativně posouvá. Tento problém se ještě více zrychluje u žen právě v důsledku menopauzy. Nejnižší výskyt osteoporózy v Evropě je pozorován v oblasti Středozevního moře, pravděpodobně díky obvykle vysoké spotřebě olivových polyfenolů (OP). Aktivní a hlavní složkou OP je oleuropein s hydroxytyrosolem a tyrosolem. Oleuropein má aromatický kruh, který je podobný estrogeneru, a proto se může vázat na vazebná místa na β -receptorech estrogeneru.

Jeho účinek při menopauze byl studován v 12měsíční intervenční studii se dvěma paralelními skupinami u 64 žen po menopauze. Skupina s placebem dostávala 1 g Ca denně a léčebná skupina 250 mg extraktu z olivových listů a 1 g vápníku denně. Primárním cílem bylo zkoumat jeho účinek na kostní obrat u žen po menopauze se sníženou kostní hmotou. Sekundárním cílem bylo zkoumat účinek na minerální hustotu kostí a profily lipidů v séru ve stejné kohortě.

Výsledky

1) Kostní obrat

Byl pozorován významný účinek na primární koncový ukazatel, tj. hladiny osteokalcinu. Po 12 měsících suplementace extraktem z olivových listů bylo v léčené skupině pozorováno 32% zvýšení hladiny osteokalcinu ve srovnání s placebem (**Obr. 3**). Ve stejnou dobu došlo k poklesu osteokalcinu o 6 % ve srovnání s placebem.

Stejně tak se poměr kostní rovnováhy (OC/CTX) významně snížil ve skupině s placebem, zatímco v aktivní skupině nebyla pozorována žádná významná změna. OC/CTX je relevantním ukazatelem rovnováhy kostního obratu. Jeho pokles naznačuje vyšší aktivitu kostní resorpce.

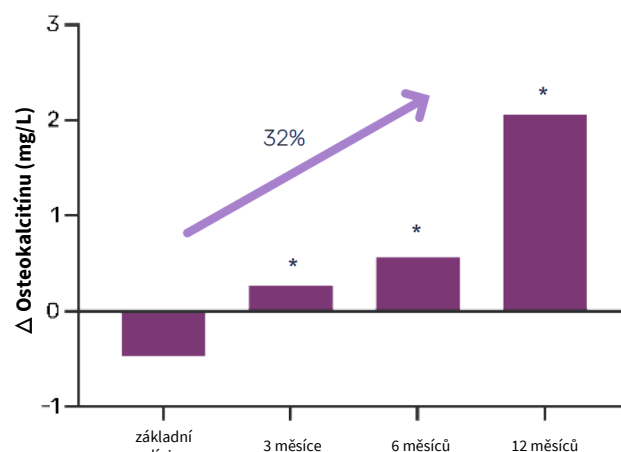
Zlepšený poměr kostní rovnováhy se projevuje i měřením DEXA. Konkrétně po 12 měsících se BMD

v krční a lumbální páteři se snížila ve skupině s placebem, zatímco ve aktivní skupině zůstala stabilní.

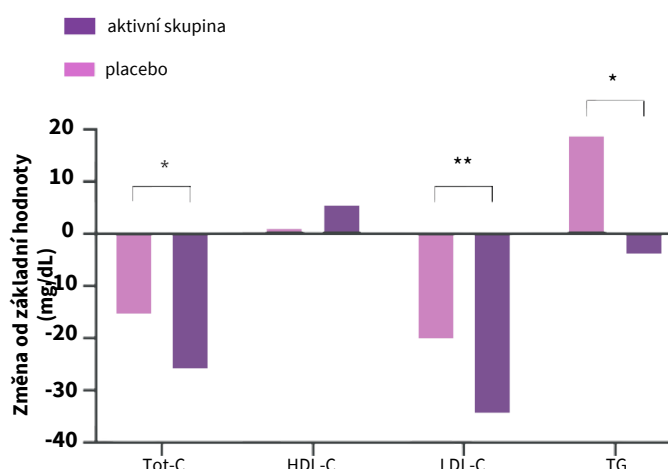
2) Krevní lipidový profil

Hladiny lipidů v séru se v aktivní skupině zlepšily ve srovnání s výchozí hodnotou po 12 měsících (**Obr. 4**). Významný účinek byl pozorován u celkového cholesterolu, LDL cholesterolu a triglyceridů.

Celkový cholesterol se snížil o 11 % v aktivní skupině a byl významně nižší ve srovnání se skupinou s placebem. LDL cholesterol se snížil o 21 % v aktivní skupině a byl významně nižší ve srovnání se skupinou s placebem. Kromě toho se v aktivní skupině hladiny triglyceridů snížily o 4 %, zatímco ve skupině s placebem se zvýšily o 15 %.



Obr. 3: 32% rozdíl v hladinách osteokalcinu v krvi mezi intervenční a placebovou skupinou během 12měsíčního období; *významný rozdíl mezi časovými body $p < 0,05$ (upraveno podle Filip a kol., 2015).



Obr. 4: Relativní změna hladin lipidů v krvi po 12 měsících; *významný rozdíl mezi skupinami $p = 0,01$; ** $p = 0,02$ (upraveno podle Filip a kol., 2015).

Výsledky

Klinické studie ukázaly, že extrakt z olivových listů může zvýšit hladiny osteokalcínu, zmírnit bolesti kloubů a zlepšit profil krevních lipidů a nabízí přirozenou a neestrogenní alternativu k zvládání postmenopauzálních symptomů, čímž zlepšuje kvalitu života žen po menopauze.

EXTRAKT ZO ŠAFRANU

A PMS

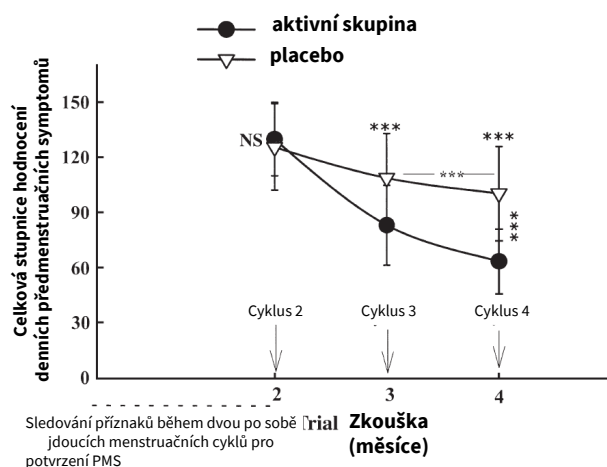
Premenstruační syndrom (PMS) patří k nejčastějším zdravotním problémům u žen a postihuje 20–40 % žen v reprodukčním věku. Jedná se o skupinu chronických a cyklických poruch souvisejících s menstruací, které se vyznačují emocionálními, behaviorálními a fyzickými příznaky v druhé polovině (luteální fázi) menstruačního cyklu (18). Existuje řada důkazů poukazujících na změny v serotonergní vodivosti v centrálním nervovém systému u PMS. Předpokládá se tedy, že PMS je částečně spojeno s narušenou serotonergní vodivostí. Tuto možnost potvrzuje pozitivní terapeutický účinek serotonergních inhibitorů u žen trpících PMS, jejichž užívání však přináší i mnoho nežádoucích účinků (19).

Předpokládá se, že serotonergní mechanismus se podílí na antidepresivním účinku šafránu (*Crocus sativus* L.), proto byla v roce 2007 provedena dvojitě zaslepená a placebem kontrolovaná studie, jejímž cílem bylo zjistit, zda šafrán může zmírnit příznaky PMS. Do studie bylo zařazeno 50 žen ve věku 20–45 let s pravidelným menstruačním cyklem a zkušenostmi s příznaky PMS po dobu nejméně 6 měsíců. Byly rozděleny do dvou skupin: aktivní skupina s kapslemi obsahujícími 30 mg šafránu denně a placebo v kapslích, které užívaly během dvou menstruačních cyklů (cyklus 3 a 4). Cykly 1 a 2 byly pozorovací, pro potvrzení PMS.

Výsledky

Studie zjistila, že šafrán je účinný při zmírňování příznaků PMS. Významný rozdíl byl pozorován v účinnosti šafránu v cyklech 3 a 4 v celkových před-

menstruačních denních symptomech (**Obr. 5**) a Hamiltonově stupnici hodnocení deprese.



Obr. 5: Průměrné $\pm$ SD skóre dvou skupin žen v celkových předmenstruačních denních symptomech. NS, nevýznamné; *** = $P < 0,001$. Horizontální symboly (***) byly použity k vyjádření statistické významnosti oproti jejich příslušné základní hodnotě a vertikální symboly (**) byly použity k porovnání mezi skupinami (upraveno podle Agha-Hosseini et al., 2018).

Reference

- (1) Romero R., et al. *Preterm labor: one syndrome, many causes*. Science 2014, 345(6198), 760-765.
- (2) Elovitz, M., et al. *Cervicovaginal microbiota and local immune response modulate the risk of spontaneous preterm delivery*. Nature communications 2019, 10(1), 1305.
- (3) Walther-Antônio, M. R. et al. *Pregnancy's stronghold on the vaginal microbiome*. PLoS one 2014, 9(6), e98514.
- (4) Workowski, K. A. *Sexually transmitted infections treatment guidelines*. MMWR. Recommendations and Reports 2021, 70.
- (5) Gonçalves B., et al. *Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology and risk factors*. Crit Rev Microbiol 2016, 42(6):905–27.
- (6) Swidsinski A., et al. *Polymicrobial Gardnerella biofilm resists repeated intravaginal antiseptic treatment in a subset of women with bacterial vaginosis: a preliminary report*. Arch Gynecol Obstet 2015, 291(3):605–9.
- (7) Bhattacharya S., et al. *Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance*. Antibiotics 2020, 9(6):312.
- (8) Chen R., et al. *Probiotics are a good choice for the treatment of bacterial vaginosis: a meta-analysis of randomized controlled trial*. Reprod Health 2022 19(1):137.
- (9) Liu HF, Yi N. A systematic review and meta-analysis on the efficacy of probiotics for bacterial vaginosis. Eur Rev Med Pharmacol Sci 2022, 26(1):90–8.
- (10) Wang Z, He Y, Zheng Y. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis: a meta-analysis. Int J Environ Res Public Health 2019, 16(20):3859.
- (11) Jeng HS, Yan TR, Chen JY. Treating vaginitis with probiotics in nonpregnant females: a systematic review and meta-analysis. Exp Ther Med. 2020, 20(4):3749–65.
- (12) Blostein F., et al. *Recurrent vulvovaginal candidiasis*. Annals of Epidemiology 2017, 27(9), 575–582.
- (13) Pino A., et al. *Lactocaseibacillus rhamnosus CA15 (DSM 33960) as a candidate probiotic strain for human health*. Nutrients 2022, 14(22), 4902.
- (14) Rapisadra A, et al. *Lactocaseibacillus rhamnosus CA15 (DSM 33960) strain as a new driver in restoring the normal vaginal microbiota: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial*. Frontiers in Surgery 2023, 9: 1075612.
- (15) Holmes K., et al. *Normal genital flora*. Sexually Transmitted Diseases 2008, Eds.: 289–307.
- (16) Thoma M.E., et al. *Longitudinal changes in vaginal microbiota composition assessed by Gram stain among never sexually active pre- and postmenarcheal adolescents*. J. Pediatr. Adolesc. Gynecol 2011. 24: 42–47.
- (17) Filip R., et al. *Twelve-month consumption of a polyphenol extract from olive (Olea europaea) in a double blind, randomized trial increases serum total osteocalcin levels and improves serum lipid profiles in postmenopausal women with osteopenia*. The journal of nutrition, health & aging 2015, 19, 77–86.
- (18) Andrzej M, Diana J. *Premenstrual syndrome: from etiology to treatment*. Maturitas 2006. 55S:S47–S54.
- (19) Wyatt KM, et al. *Selective serotonin reuptake inhibitors for premenstrual syndrome*. Cochrane Database Syst Rev 2002; D001396.
- (20) Agha-Hosseini M., et al. *Crocus sativus L. (safron) in the treatment of premenstrual syndrome: a double-blind, randomised and placebo-controlled trial*. An International Journal of Obstetrics & Gynaecology 2008, 115(4), 515–519.