

Aspekty kliniczne i mikrobiologiczne zastosowania szczepów *Lactobacillus rhamnosus* PL1 u pacjentów z objawami zapalenia odbytnicy w przebiegu chorób dystalnego odcinka jelita grubego

Clinical and microbiological aspects of use of *Lactobacillus rhamnosus* PL1 strains in proctologic patients with symptoms of chronic proctitis

Wkład autorów:

A – Projekt badań
B – Zbieranie danych
C – Analiza statystyczna
D – Interpretacja danych
E – Przygotowanie manuskryptu
F – Analiza literatury
G – Zbieranie funduszy

Katarzyna Borycka-Kiciak^{1ABDEF}, Magdalena Strus^{2ABDEF}, Piotr Pietrzak^{1CE}, Adam Kiciak^{1BF}, Karolina Wawiernia^{1B}, Diana Mikołajczyk^{2BDE}, Mirosława Gałęcka^{3AD}, Piotr Heczko^{2AEC}, Wiesław Tarnowski^{1DG}

¹Klinika Chirurgii Ogólnej, Onkologicznej i Przewodu Pokarmowego Centrum Medycznego Kształcenia Podyplomowego, Warszawa, Polska;

²Zakład Bakteriologii, Ekologii Drobnoustrojów i Parazytologii, Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, Polska

³Instytut Mikrobiologii, Poznań, Polska

Historia artykułu: Otrzymano: 31.10.2016 Zaakceptowano: 10.01.2017 Opublikowano: 30.06.2017

STRESZCZENIE:

Nawracające stany zapalne odbytnicy i związane z nimi dolegliwości stanowią problem kliniczny u pacjentów leczonych z powodu chorób proktologicznych.

Celem pracy była ocena wpływu probiotycznego szczepu *Lactobacillus rhamnosus* PL1 na obraz kliniczny i skład mikrobioty jelitowej u pacjentów z objawami zapalenia jelita grubego w przebiegu choroby hemoroidalnej i choroby uchyłkowej.

Materiał stanowiła grupa 24 pacjentów, u których nie uzyskano pełnej poprawy klinicznej po leczeniu choroby zasadniczej. Oceniano obecność i nasilenie objawów klinicznych oraz ilościowe i jakościowe zmiany w składzie bakterii obecnych w kale przed 9-tygodniową suplementacją probiotycznym szczepem *Lactobacillus rhamnosus* PL1, w jej trakcie i po niej.

Wyniki: w całej badanej grupie intensywność bólu po 12 tygodniach było znacząco mniejsza ($p=0,011$) w porównaniu z wartościami wyjściowymi; intensywność wzdęć i dyskomfort w jamie brzusznej zmniejszył się znacząco już po 3 tygodniach, a po 12 tygodniach różnica była wysoce statystycznie ($p<0,0001$). Nie wykazano znaczącej różnicy w częstotliwości zgłaszanych biegunek, zaparć, a także świądu i pieczenia w okolicy odbytu. Już 3-tygodniowa suplementacja probiotycznym szczepem *L. rhamnosus* PL1 spowodowała istotne zmiany ilościowe i jakościowe w składzie mikrobioty jelitowej, różne w zależności od choroby zasadniczej. Stwierdzono zwiększenie globalnej liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, ze szczególnym uwzględnieniem szczepu *L. rhamnosus* PL1, niezależnie od choroby zasadniczej.

Wnioski: Probiotyczny szczep *Lactobacillus rhamnosus* PL1 wydaje się mieć wartość w przywracaniu właściwych proporcji populacji bakteryjnych u pacjentów z objawami zapalenia odbytnicy w przebiegu leczenia niektórych chorób dolnego odcinka przewodu pokarmowego.

SŁOWA KLUCZOWE: choroba hemoroidalna, choroba uchyłkowa, probiotyki, mikrobiota jelitowa, *Lactobacillus rhamnosus* PL1

ABSTRACT

Recurrent proctitis and the symptoms associated therewith pose significant clinical problem in proctological patients.

The objective of this study was to assess the impact of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* PL1 strain on the clinical presentation and composition of intestinal microbiota in patients with symptoms of proctitis in the course of hemorrhoidal disease and diverticulosis.

Material consisted of 24 patients in whom no complete clinical improvement could be obtained after the treatment of the underlying disease. Subject to the assessment was the presence and the intensity of clinical symptoms as well as qualitative and quantitative changes in the composition of bacterial flora detected in the stool before, during and after a 9-week supplementation with the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* PL1 strain.

Results: In the entire study group, the intensity of pain after 12 weeks was significantly lower ($p=0.011$) compared to baseline; the intensity of flatulence and abdominal discomfort was reduced significantly as early as after 3 weeks, with the difference reaching a highly significant level after 12 weeks ($P<0.0001$). No significant difference was observed in the frequency of the reported episodes of diarrhea, constipation, as well as itching and burning in the anal region. As early as after 3 weeks of supplementation with the probiotic *L. rhamnosus* PL1 strain, significant qualitative and quantitative changes were observed in the composition of intestinal microbiota; the changes differed depending on the underlying disease. An increase in the total counts of the bacteria of *Lactobacillus* genus, particularly *L. rhamnosus* PL1 strain was observed regardless of the underlying disease.

Conclusion: the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* PL1 strain appears to be useful in restoring appropriate ratios of bacterial populations in patients presenting with symptoms of proctitis in the course of the treatment of certain diseases of the lower gastrointestinal tract.

KEYWORDS:

hemorrhoidal disease, diverticulosis, probiotics, gut microbiota, *Lactobacillus rhamnosus* PL1

WSTĘP

W praktyce proktologicznej istnieje spora grupa pacjentów, którzy mimo często skutecznego leczenia choroby zasadniczej dolnego odcinka przewodu pokarmowego (choroby hemoroidalnej, szczeliny odbytu, przetoki okołoodbytowej, choroby uchyłkowej esicy) cierpią z powodu nawracających stanów zapalnych odbytnicy i związanych z nimi dolegliwości. Przy objawach miernie nasilonego stanu zapalnego w obrazie anoskopowym oraz braku innych nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych, endoskopowych i obrazowych pacjenci skarżą się na ból w podbrzuszu i okolicy odbytu, dyskomfort w jamie brzusznej, wzdęcia, zaparcia, nagłe parcia, uczucie niepełnego wypróżnienia, a także świąd i pieczenie w okolicy odbytu. Zmiana nawyków żywieniowych i stosowanie diet eliminacyjnych nie przynoszą spodziewanych efektów. Jako ostatnią rozważa się ewentualność, że związek z dolegliwościami mogłyby mieć zaburzenia w składzie mikrobioty jelitowej, powstałe w trakcie choroby lub samego jej leczenia. Nawet wtedy jednak probiotyki ordynuje się niechętnie, zakładając, że suplementacja pojedynczym szczepem bakteryjnym, często o wątpliwej aktywności, może nie być w stanie radykalnie wpłynąć na skład mikrobioty jelitowej, a w konsekwencji na obraz kliniczny choroby.

Od dawna wiadomo, że właściwe proporcje populacji bakteryjnych wchodzących w skład mikrobioty jelitowej są warunkiem prawidłowego funkcjonowania jelita grubego i całego układu immunologicznego. Skład mikrobioty determinowany jest przez wiele czynników, takich jak wiek [1], nawyki żywieniowe, choroby przewlekłe, stosowanie antybiotyków czy też sterydowych leków przeciwzapalnych. Także procesy zapalne toczące się w świetle przewodu pokarmowego, a przebiegające z uwalnianiem reaktywnych form tlenu (ROS), mediatorów stanu zapalnego czy pojawieniem się krwi w świetle jelita mogą prowadzić w krótkim czasie do znacznych przesunięć równowagi ekologicznej mikroflory jelit. Naruszenie tej delikatnej równowagi mikrobiologicznej w jelicie skutkuje podtrzymaniem stanu zapalnego w obrębie śluzówki jelita grubego, a w konsekwencji narastaniem objawów klinicznych.

Z każdym rokiem przybywa też dowodów naukowych na to, że dysbioza, czyli zaburzenia w składzie mikrobioty przewodu pokarmowego, odgrywa istotną rolę w patogenezie lub stanowi konsekwencję zarówno jelitowych (choroby zapalne jelit, zespół jelita nadwrażliwego, choroba uchyłkowa, celiakia), jak i pozajelitowych (alergie, astma, zespół metaboliczny, choroby układu krążenia) chorób ogólnoustrojowych [2] oraz nowotworów.

Doceniając wagę właściwego składu mikrobioty jelitowej, autorzy podjęli próbę sprawdzenia, czy, a jeśli tak, to jak, suplementacja pojedynczym szczepem bakterii probiotycznych wpływa na obraz kliniczny choroby i skład mikrobioty jelitowej u chorych z objawami zapalenia dystalnego odcinka jelita grubego leczonych z powodu chorób proktologicznych.

Celem pracy była ocena wpływu probiotycznego szczepu *Lactobacillus rhamnosus PL1* na obraz kliniczny i skład mikrobioty jelitowej u pacjentów z objawami zapalenia jelita w przebiegu choroby hemoroidalnej i choroby uchyłkowej.

MATERIAŁ I METODA

Pacjenci

Analizą objęto grupę 24 pacjentów (17 z chorobą hemoroidalną i 7 z chorobą uchyłkową) leczonych w Poradni Przyklinicznej Kliniki Chirurgii Ogólnej i Przewodu Pokarmowego CMKP, u których nie uzyskano pełnej poprawy klinicznej po leczeniu choroby zasadniczej. Do badania kwalifikowano:

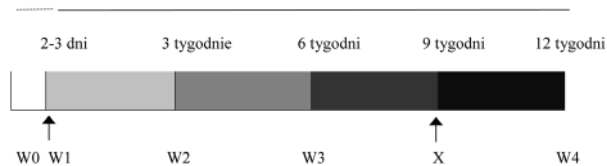
- pacjentów z chorobą hemoroidalną w stopniu II i III po leczeniu zachowawczym i/lub operacyjnym i z objawami zapalenia śluzówki odbytnicy w badaniu anoskopowym, po uprzednio odbytym, wystandaryzowanym, 8-tygodniowym leczeniu zachowawczym (maści i czopki), z poprawą w kontrolnym badaniu anoskopowym, jednak z utrzymującymi się dolegliwościami;
- pacjentów z potwierdzoną endoskopowo chorobą uchyłkową, obecnie bez cech ostrego zapalenia uchyłków, po zakończonym leczeniu standardowym rifaksymina kontynuowanym przez 6 miesięcy (2x2 tabletki przez 7 dni, powtarzanych co miesiąc) jednak z utrzymującymi się cechami zapalenia odbytnicy w badaniu anoskopowym i dolegliwościami z dolnego odcinka przewodu pokarmowego.

Wszyscy pacjenci włączani byli do badania po co najmniej 4-tygodniowym okresie bez stosowania antybiotyków i preparatów probiotycznych.

W badaniu zaprojektowanym jako prospektywne, w którym każdy pacjent stanowił kontrolę dla samego siebie, czas obserwacji wynosił 12 tygodni. Wyjściowo oceniano obecność i nasilenie objawów klinicznych, przeprowadzono badanie proktologiczne (z oceną anoskopową), wykonywano badania laboratoryjne (morfologię, CRP) oraz pobierano (w sposób wystandaryzowany) próbkę kału (PK1) z bańki odbytnicy, w celu oceny wyjściowego stanu mikrobioty jelitowej. Obecność klinicznych objawów nietrzymania gazów i stolca oceniano przy użyciu skali Wexnera. Następnie każdy pacjent otrzymywał preparat probiotyczny zawierający pojedynczy szczep *Lactobacillus rhamnosus PL1* do regularnego stosowania 1 x dziennie przez 9 tygodni. Obecność (oceniana jako 0 lub 1) oraz zmiany w nasileniu objawów klinicznych (ocenianych w skali 0-5) odnotowywane były przez cały okres trwania badania w dzienniku pacjenta. W trakcie obserwacji przeprowadzano wizyty kontrolne: W2 po 3, W3 po 6 i W4 po 12 tygodniach od rozpoczęcia przyjmowania preparatu. Kał do badania mikrobiologicznego pozyskiwano w trakcie wizyty pierwszej (PK1) oraz drugiej (PK2), tj. po 3 tygodniach przyjmowania preparatu probiotycznego. Badanie mikrobiologiczne kału było badaniem ilościowym, w którym skupiano się na ocenie zmian liczebności populacji hodowlanych grup bakterii wchodzących w skład mikrobioty jelitowej oraz skuteczności kolonizacji przewodu pokarmowego probiotycznym szczepem *L. rhamnosus PL1*. Dodatkowo podczas wizyt W3 (po 6 tygodniach) i W4 (wizycie kończącej badanie po 12 tygodniach) oceniano obecność i zmiany w nasileniu objawów klinicznych.

Mikrobiologiczne badanie kału

Kał uzyskiwany od każdego pacjenta podczas wizyt W1 i W2 pobierany był za pomocą anoskopu z bańki odbytnicy na wysokości ok. 7 cm od zwieraczy. Po pobraniu materiał umieszczano w płynnym



W0 – wizyta skringingowa, W1 – włączenie pacjenta do badania, W2, W3 – wizyty kontrolne,

W4 – wizyta kończąca badanie X – koniec przyjmowania preparatu

Ryc. 1. Schemat badania

podłożu Schaedler z dodatkiem 15% glicerolu w jałowej próbówce o pojemności 50 ml i natychmiast zamrażany do temperatury -20°C . Do pracowni mikrobiologicznej materiał transportowano w głębokim zamrożeniu przy pomocy suchego lodu. Przed posiewem mikrobiologicznym próbówki rozmrażano w temperaturze pokojowej, a następnie kał rozdrabniano za pomocą stomachera (BagMixer 400 P, Bionovo). Materiał wysiewano po 100 μl na odpowiednie, stałe podłoża wzrostowe: McConkey agar w kierunku pałeczek Gram-ujemnych, podłoże Columbia agar w kierunku wzrostu paciorkowców i gronkowców, agar Schaedler w kierunku bakterii beztlenowych oraz na podłoże MRS w kierunku bakterii kwasu mlekowego z rodzaju *Lactobacillus*. W celu potwierdzenia obecności w badanym materiale grzybów z rodzaju *Candida* stosowano podłoże Sabourand agar. Posiany materiał umieszczano w cieplarni w temperaturze 37°C w warunkach tlenowych lub beztlenowych na odpowiednio 24 lub 48 godzin. Wyhodowane kolonie bakterii identyfikowano do gatunku za pomocą zestawów API firmy bioMerieux (API 20E, API 20A, API Strep, API Staph, API 50CH), a następnie kolonie zliczano podając wynik końcowy w jednostkach tworzących kolonie w przeliczeniu na gram kału (j.t.k./g kału). Tylko bakterie kwasu mlekowego, które zostały wstępnie zidentyfikowane za pomocą metody fenotypowej (tj. API 50CHL) jako *L. rhamnosus*, poddano dalszej identyfikacji za pomocą metody genotypowej, tj. techniki PCR z wykorzystaniem gatunkowo swoistych starterów (PrI: CAG, ACT, GAA, AGT, CTG, ACG G, RhaII: GCG, ATG, CGA, ATT, TCT, ATT, ATT) [3]. W celu ostatecznego potwierdzenia kolonizacji przewodu pokarmowego badanych pacjentów szczepem probiotycznym *L. rhamnosus* PL1 zastosowano metodę elektroforezy pulsacyjnej (ang. pulsed-field gel electrophoresis, PFGE). Pozwalała ona na porównanie zgodności profilu DNA genomowego wszystkich bakterii zaliczonych do gatunku *L. rhamnosus* z wzorcowym profilem typowym dla szczepu PL1. Procedura izolacji DNA genomowego, doboru enzymów restrykcyjnych została przeprowadzona w oparciu o metodykę Tynkynena [4].

Analiza statystyczna

Zebrane wyniki zostały opracowane i przeniesione do plików Excel (raw data). Uzyskane dane poddano analizie statystycznej (test t-studenta, chi-kwadrat i Manna-Whitneya; dwa ostatnie jako testy nieparametryczne w celu określenia rachunku błędu pomiarowego), aby wykazać zmiany w mierzonych parametrach między początkiem a końcem badania (endpoints), a także w trakcie wizyt kontrolnych (interim analysis). Jako pierwotne punkty końcowe przyjęto: obecność (0 lub 1) oraz nasilenie objawów klinicznych (mierzone w skali 0-5) na podstawie dzienniczka pacjenta. Do

Tab. I. Charakterystyka grup badanych

	PACJENCI Z CHOROBA HEMOROIDALNA	PACJENCI Z CHOROBA UCHYŁKOWA	PACJENCI UCZESTNICZĄCY W BADANIU OGÓLNEM
N	17	7	24
Kobiety	41,2% (7)	85,7% (6)	54,2% (13)
Mężczyźni	58,8% (10)	14,3% (1)	45,8% (11)
Średni wiek	43,5	70,4	51,7
Czas trwania objawów (mies.)	36,5	28,7	34,2
Leczenie zachowawcze	100% (17/17)	100% (7/7)	100% (24/24)
Leczenie operacyjne	70,6% (12/17)	14,3% (1/7)	54,2% (13/24)
Ocena w skali Wexnera	0,5	2	0,96
CRP	4,07	6,9	4,88

Tab. II. Nasilenie objawów klinicznych w całej grupie badanej w poszczególnych etapach badania (średnia \pm SEM)

	W1	W2	W4	P
Bóle brzucha	1,78 \pm 0,28	1,33 \pm 0,27	0,58 \pm 0,19	0,01
Wzdęcia	2,69 \pm 0,27	1,47 \pm 0,29	1,0 \pm 0,22	0,0002
Dyskomfort w jamie brzusznej	2,69 \pm 0,31	1,47 \pm 0,23	0,76 \pm 0,25	<0,0001
Nagłe parcia	2,00 \pm 0,4	1,09 \pm 0,38	0,53 \pm 0,32	0,029

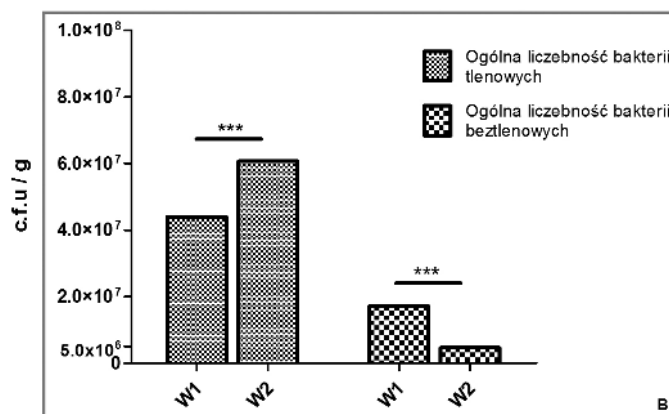
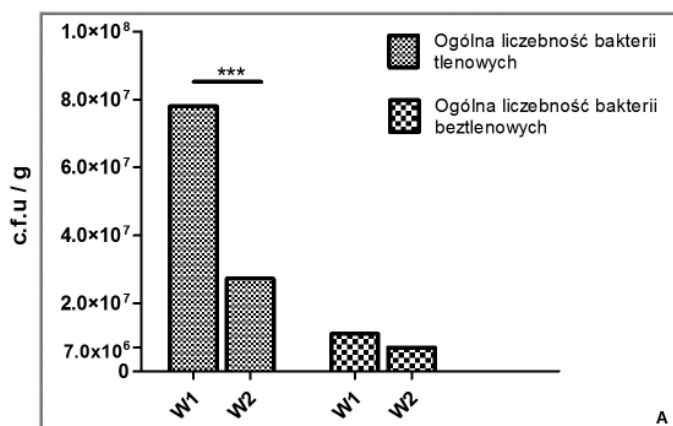
Tab. III. Nasilenie objawów klinicznych u pacjentów z chorobą hemoroidalną (średnia \pm SEM)

	W1	W2	W4	P
Bóle brzucha	1,56 \pm 0,36	1,46 \pm 0,35	0,45 \pm 0,24	0,074
Wzdęcia	2,81 \pm 0,35	1,6 \pm 0,38	1,00 \pm 0,33	0,005
Dyskomfort w jamie brzusznej	2,62 \pm 0,41	1,4 \pm 0,32	0,63 \pm 0,33	0,002
Nagłe parcia	2,56 \pm 0,48	1,53 \pm 0,49	0,81 \pm 0,48	0,059

Tab. IV. Nasilenie objawów klinicznych u pacjentów z chorobą uchyłkową (średnia \pm SEM)

	W1	W2	W4	P
Bóle brzucha	2,28 \pm 0,42	1,00 \pm 0,36	0,83 \pm 0,04	0,024
Wzdęcia	2,42 \pm 0,42	1,17 \pm 0,4	1,00 \pm 0,25	0,029
Dyskomfort w jamie brzusznej	2,85 \pm 0,4	1,66 \pm 0,21	1,00 \pm 0,36	0,005
Nagłe parcia	2	0	0	-

wtórnych punktów końcowych zaliczono ilościowe i jakościowe zmiany w składzie bakterii obecnych w kale, w tym z rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczki z gatunku *Escherichia coli*, paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* oraz szczepy z gatunku *Enterococcus faecalis*. Przeanalizowano także zmiany w proporcjach pomiędzy liczebnością populacji bakterii tlenowych w stosunku do bakterii ściśle beztlenowych. Dodatkowo zwrócono uwagę na zmiany liczbowe zaobserwowane w kale u pacjentów pomiędzy wizytami W1 a W2 w odniesieniu do globalnej liczby bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, ze szczególnym uwzględnieniem szczepu probiotycznego *L. rhamnosus* PL1.



Ryc. 2. Ogólna liczebność bakterii tlenowych i beztlenowych mikrobioty jelitowej przed suplementacją szczepem probiotycznym *L. rhamnosus* PL1 (W1) i w jej trakcie (W2) u pacjentów: A) leczonych z powodu choroby hemoroidalnej, B) leczonych w powód choroby uchyłkowej

WYNIKI

W badanej grupie 24 chorych (13 kobiet i 11 mężczyzn) było 17 pacjentów z chorobą hemoroidalną i 7 z chorobą uchyłkową. Średni wiek wynosił 51,7 lat. Charakterystykę obu grup przedstawia tabela I.

W trakcie badania po 3, 6 i 12 tygodniach zaobserwowano zmiany w zakresie nasilenia objawów klinicznych. Nasilenie bólu po 12 tygodniach było znamienne mniejsze ($p=0,011$) w porównaniu z wartościami wyjściowymi. Nasilenie wzdęć zmniejszało się znamienne już po 3 tygodniach, a w dłuższym okresie obserwacji (po 12 tygodniach) różnica była wysoce znamieną statystycznie ($p=0,0002$). Uczucie dyskomfortu w jamie brzusznej zmniejszało się od wczesnego okresu obserwacji (znamienne już po 3 tygodniach), a po 12 tygodniach różnica była wysoce znamieną statystycznie ($p<0,0001$). Szczegółowe dane przedstawiono w tabeli II. Świąd i pieczenie w okolicy odbytu zgłaszało wyjściowo 33,3% pacjentów, po 12 tygodniach zaś 12,5%, różnica nie była jednak znamieną statystycznie ($p=0,49$). Identyczne wyniki uzyskano w przypadku biegunek (33,3% przed i 12,5% po 12 tygodniach od rozpoczęcia przyjmowania preparatu, $p=0,49$). Zaparcia przed rozpoczęciem stosowania preparatu zgłaszało 58,33% (14/24) pacjentów, po 3 tygodniach było to już 12,5% (3/24), a po 12 tygodniach trwania badania (3 tygodnie po zaprzestaniu zażywania preparatu) tego problemu nie zgłaszał żaden z badanych pacjentów ($p<0,0001$).

Przeprowadzając szczegółową analizę grupy 17 pacjentów z chorobą hemoroidalną, różnice zaobserwowano zwłaszcza w zakresie nasilenia wzdęć ($p=0,005$) oraz dyskomfortu w jamie brzusznej ($p=0,002$), które uległy znamiennej zmniejszeniu. Różnica w zakresie częstości nagłych parć nie była znamieną statystycznie (Tabela III). Nie wykazano znamiennej różnicy w częstości zgłaszanych biegunek (6/17 versus 2/17, $p=0,556$), zaparcí (5/17 versus 0/17, $p=0,097$), a także świądu i pieczenia w okolicy odbytu (6/17 versus 3/17, $p=0,789$).

W grupie pacjentów z chorobą uchyłkową najbardziej zauważalne klinicznie było zmniejszenie nasilenia dolegliwości bólowych po 12 tygodniach ($p=0,025$), wzdęć ($p=0,029$) i dyskomfortu w jamie brzusznej ($p=0,005$) (Tabela IV). Nie stwierdzono różnic w zakre-

się częstości zgłaszanego świądu w okolicy odbytu, biegunek (2/7 versus 1/7, $p=0,836$) oraz zaparcí (2/7 versus 0/7, $p=0,056$).

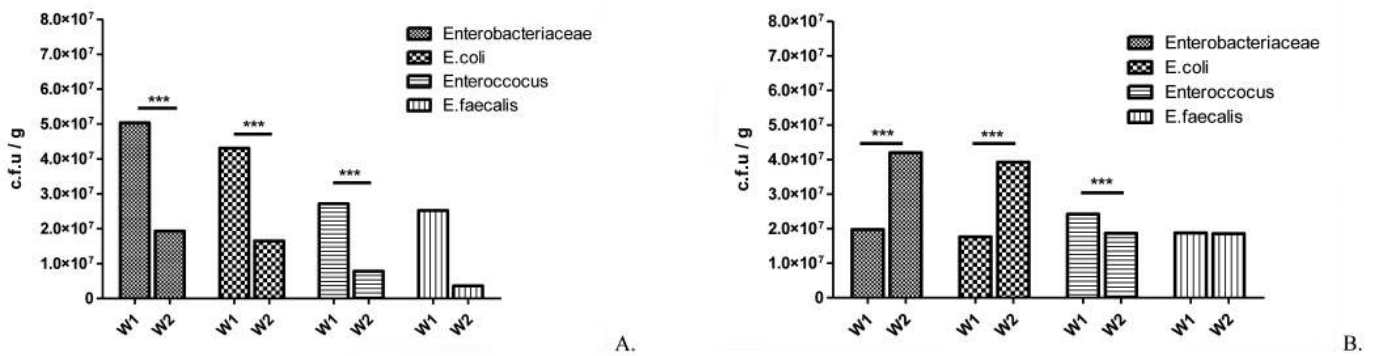
Wyniki mikrobiologiczne

Trzytygodniowa doustna suplementacja pojedynczym szczepem probiotycznym *L. rhamnosus* PL1 spowodowała istotne zmiany w składzie mikrobioty jelitowej. U pacjentów z chorobą hemoroidalną zaobserwowano znamienne spadki populacji bakterii tlenowych ($p<0,0001$), przy praktycznie utrzymującej się na niezmiennym poziomie liczebności bakterii ściśle beztlenowych (rycina 2A). Spadek ten (obserwowany podczas drugiej wizyty) był związany ze statystycznie istotną redukcją: pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* ($p<0,0001$), w tym populacji *E. coli* ($p<0,0001$), oraz paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* ($p<0,0001$) (rycina 3A).

W przypadku pacjentów z chorobą uchyłkową proporcje pomiędzy liczebnością populacji bakterii tlenowych i beztlenowych różniły się zasadniczo od tych obserwowanych u pacjentów z chorobą hemoroidalną. Po 3 tygodniach suplementacji nastąpił znamienne wzrost globalnej liczebności populacji bakterii tlenowych ($p=0,0001$) (Rycina 2B). Wzrost ten był związany ze zwiększeniem populacji pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae* ($p=0,0001$), ale nie przyrostem populacji paciorkowców z rodzaju *Enterococcus*, gdyż liczebność tych paciorkowców, zaliczanych do bakterii tlenowych, podczas drugiej wizyty (W2) wykazuje tendencje spadkowe ($p=0,0001$) (Rycina 3B).

Redukcja ogólnej populacji paciorkowców kałowych z rodzaju *Enterococcus* obserwowana podczas drugiej wizyty (W2) może mieć bezpośredni związek z poprawą parametrów klinicznych, którą stwierdzano już po 3-tygodniowej kuracji probiotycznej (Tabela IV).

U 7 na 17 pacjentów (41,18%) leczonych z powodu choroby hemoroidalnej z wyjściowej próbki kału (PK1) nie wyizolowano żadnych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. Po 3-tygodniowej doustnej suplementacji bakterie z tego rodzaju wykryto już u 15 na 17 pacjentów (88,24%) (Tabela V). Kolonizacja szczepem *L. rhamnosus* PL1 została potwierdzona u 15 na 17 pacjentów leczonych z powodu choroby hemoroidalnej, co wskazuje na 88,24% skuteczność kolonizacji.



Ryc. 3. Średnia liczebność populacji bakterii z rodziny Enterobacteriaceae (w tym *E. coli*) oraz z rodzaju *Enterococcus* (w tym *E. faecalis*) dla pacjentów leczonych z powodu A) choroby hemoroidalnej, B) choroby uchyłkowej.

W przypadku pacjentów leczonych z powodu choroby uchyłkowej po 3-tygodniowej suplementacji kolonizacja szczepem *L. rhamnosus* PL1 została potwierdzona w 4 przypadkach (57% chorych). Wpływ szczepu *L. rhamnosus* PL1 na zwiększenie ogólnej liczebności populacji *Lactobacillus* jest jeszcze bardziej zauważalny niż w przypadku pacjentów z chorobą hemoroidalną (Tabela VI), a mianowicie w trakcie wizyty W1 tylko 1 pacjent na 7 włączonych do badania był skolonizowany bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* (14%), po 3 tygodniach (W2) zaś liczba takich pacjentów zwiększyła się aż do 6 na 7 badanych (86%).

DYSKUSJA

W trakcie badania zaobserwowano ograniczenie nasilenia objawów klinicznych w całej badanej populacji. Po 9-tygodniowej suplementacji pojedynczym szczepem probiotycznym *Lactobacillus rhamnosus* PL1 chorzy znacząco rzadziej zgłaszali dolegliwości bólowe, wzdęcia, dyskomfort w jamie brzusznej i zaparcia. Zmiana obrazu klinicznego wykazywała zależność od choroby zasadniczej. U chorych leczonych z powodu choroby hemoroidalnej obserwowano głównie zmniejszenie nasilenia wzdęć i dyskomfortu w jamie brzusznej. Mimo braku znamienności statystycznej wyników u części chorych widoczne było również ograniczenie nasilenia nagłych parć, występowania biegunek (u 4 na 6 zgłaszających ten problem), zaparc (u wszystkich 5 chorych pierwotnie zgłaszających ten problem) oraz świądu i pieczenia w okolicy odbytu (u 3 na 6 pierwotnie zgłaszających ten problem). Nieliczne doniesienia na ten temat w literaturze potwierdzają spostrzeżenia autorów. W prospektywnym, randomizowanym badaniu prowadzonym u kobiet z chorobą hemoroidalną i zaparciami, po porodach siłami natury, suplementacja probiotycznym szczepem *Lactobacillus casei* pozwoliła na znamienne poprawę zarówno w zakresie objawów brzusznych, jak i tych z okolicy okołoodbytniczej w porównaniu z grupą placebo [5]. W dwóch metaanalizach [6, 7] oceniających wpływ probiotyków na obecność czynnościowych zaparc wykazano ich skuteczność w regulacji pasażu jelitowego, częstości defekacji i konsystencji stolca. Efekt ich działania był jednak każdorazowo bezpośrednio zależny od rodzaju zastosowanego szczepu probiotycznego (*Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* Shirota, *Escherichia coli* Nissle 1917, *L. casei rhamnosus* Lcr35, *L. rhamnosus* GG). Przeprowadzone przez autorów badanie wykazało, że szczep *Lactobacillus rhamnosus* PL1 również należy do grupy probiotyków wykazujących skuteczność

Tab. V. Liczebność populacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z kału pacjentów leczonych z powodu choroby hemoroidalnej

LP.	W1		W2	
	OGÓLNA LICZEBNOŚĆ POPULACJI LACTOBACILLUS (J.T.K./G KAŁU)	W TYM LICZEBNOŚĆ POPULACJI LACTOBACILLUS RHAMNOSUS PL1 (J.T.K./G KAŁU)	OGÓLNA LICZEBNOŚĆ POPULACJI LACTOBACILLUS (J.T.K./G KAŁU)	W TYM LICZEBNOŚĆ POPULACJI LACTOBACILLUS RHAMNOSUS PL1 (J.T.K./G KAŁU)
1.	1,1x10 ⁶	0	9,3x10 ⁴	0
2.	2,0x10 ⁵	0	3,8x10 ⁶	6,3x10 ³
3.	1,5x10 ⁶	0	9,5x10 ⁶	7,1x10 ⁶
4.	0	0	4,8x10 ⁷	4,8x10 ⁷
5.	1,9x10 ⁴	0	5,6x10 ⁵	3,5x10 ⁴
6.	9,7x10 ⁵	0	1,4x10 ⁶	2,0x10 ⁵
7.	0	0	6,5x10 ⁵	6,5x10 ⁵
8.	1,3x10 ⁸	0	9,5x10 ⁴	4,7x10 ²
9.	2,8x10 ³	0	4,4x10 ⁶	4,4x10 ⁶
10.	1,2x10 ⁴	0	1,1x10 ⁶	1,1x10 ⁶
11.	2,3x10 ⁶	0	6,3x10 ²	6,3x10 ²
12.	0	0	9,1x10 ⁵	9,1x10 ⁵
13.	0	0	1,4x10 ⁴	1,4x10 ⁴
14.	8,1x10 ⁶	0	1,3x10 ⁵	1,3x10 ⁵
15.	0	0	0	0
16.	0	0	7,7x10 ⁵	7,7x10 ⁵
17.	0	0	3,4x10 ⁶	6,7x10 ⁴

w zakresie ograniczania dolegliwości brzusznych. Brak znamienności w częstości zgłaszanych zaparc w badanej grupie związany jest prawdopodobnie z jej niewielką liczebnością.

W grupie chorych leczonych z powodu choroby uchyłkowej, mimo niewielkiej liczebności grupy, znamienne poprawę zaobserwowano zarówno w zakresie nasilenia wzdęć i dyskomfortu w jamie brzusznej, jak i dolegliwości bólowych. U chorych z tym rozpoznaniem obserwacja taka nie jest zaskakująca. Zaburzenia składu mikrobioty jelita są uważane za kluczowy czynnik rozwoju kolejnych zaostrzeń w przebiegu choroby uchyłkowej. Sprawia to, że probiotyki są skutecznym elementem terapii [8] w przypadku ostrego zapalenia uchyłków. Odgrywają też ważną rolę w zapobieganiu nawrotom choroby [9] oraz ograniczają nasilenie dolegliwości brzusznych u pacjentów z niepowikłaną chorobą uchyłkową [10].

W badaniu Lamiki i wsp., zastosowanie probiotycznych szczepów *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus heveticus*, *Bifidobacterium spp.* 420 i *Lactobacillus paracasei* pozwoliło na znaczne ograniczenie nasilenia dolegliwości brzusznych u ponad 70% badanych. Ocena próbek kału w tej grupie pacjentów wykazała statystycznie znamienne wzrost liczby kolonii *Lactobacilli* i *Bifidobacteriae* podczas suplementacji, a analiza genomowa potwierdziła przeżywalność podawanych szczepów w całym 6-miesięcznym okresie trwania badania.

Analiza mikrobiologiczna przeprowadzona w badaniu autorów wykazała znaczne zmiany w składzie mikrobioty jelitowej już 3 tygodnie po rozpoczęciu suplementacji pojedynczym szczepem probiotycznym *Lactobacillus rhamnosus PL1*. Zmiany te były różne w zależności od choroby zasadniczej i wywołanych przez nią zaburzeń w składzie bakteryjnym jelita.

Uważa się, że w przebiegu choroby hemoroidalnej pojawiająca się okresowo w świetle odbytnicy krew jest wystarczającym czynnikiem zaburzającym skład mikrobioty dystalnego odcinka jelita grubego. Zmiany, które wywołuje, mogą utrzymywać się przez długi czas, nawet po skutecznym leczeniu choroby zasadniczej. Wzrost stężenia wolnych jonów żelaza, uwalnianych w trakcie procesu rozkładu hemoglobiny, wpływa na przyrost liczebności populacji bakterii Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*, a w szczególności pałeczek *E. coli* pochodzących z naturalnej mikroflory jelita pacjenta [11]. To wzrost liczebności populacji *E. coli*, a nie ich wyjątkowa wirulencja, jest czynnikiem podtrzymującym proces zapalny w dolnej odbytnicy i odbycie [12]. Taki właśnie wzrost populacji *E. coli* zarejestrowano u większości pacjentów z chorobą hemoroidalną w badaniu wyjściowym (PK1).

W przypadku pacjentów leczonych z powodu choroby uchyłkowej zaobserwowano korelację pomiędzy poprawą parametrów klinicznych a znamienym spadkiem populacji paciorkowców z rodzaju *Enterococcus*. Z danych dostępnych w literaturze wiadomo, że *Enterococcus faecalis* na równi z *E. coli* może indukować produkcję prozapalnych cytokin, takich jak: TNF α , czy IL-12p70 [13]. Ponadto *Enterococcus faecalis*, ze względu na budowę ściany komórkowej zawierającej peptydoglikan, jest w stanie aktywować nuklearny czynnik kB zależny od TLR2 w komórkach układu odpornościowego, zatem pobudzać ten układ, a w konsekwencji stan zapalny. Można więc przyjąć, że podwyższona liczebność populacji *E. faecalis* w świetle i ścianie jelita w toku rozwiniętego zapalenia jest elementem podtrzymującym ten proces [14].

Uzupełnienie standardowego leczenia dodatkową suplementacją preparatem probiotycznym zawierającym szczep *Lactobacillus rhamnosus PL1* w istotny sposób wpłynęło na poprawę parametrów klinicznych u pacjentów zarówno z chorobą hemoroidalną, jak i uchyłkową.

Działanie szczepów *Lactobacillus* na kolonocyty może być wielorakie, ale przede wszystkim stymulują one produkcję śluzu, poprawiając w ten sposób funkcje bariery jelitowej [15]. Integralność bariery jelitowej może być zwiększona przez działanie *Lactobacillus* także na drodze podnoszenia poziomu śluzówkowej β -defensyny 2 [16]. Ponadto wykazano, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* mogą hamować apoptozę komórek ściany jelita wzbudzaną przez cytokiny [17]. Można także przyjąć, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* dzięki syntezie licznych sub-

Tab. VI. Liczebność populacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus* wyizolowanych z kału od pacjentów leczonych z powodu choroby uchyłkowej

LP.	W1		W2	
	OGÓLNA LICZEBNOŚĆ POPULACJI LACTOBACILLUS (J.T.K./G KAŁU)	W TYM LICZEBNOŚĆ POPULACJI LACTOBACILLUS RHAMNOSUS PL1 (J.T.K./G KAŁU)	OGÓLNA LICZEBNOŚĆ POPULACJI LACTOBACILLUS (J.T.K./G KAŁU)	W TYM LICZEBNOŚĆ POPULACJI LACTOBACILLUS RHAMNOSUS PL1 (J.T.K./G KAŁU)
1.	5,9x10 ⁷	0	1,1x10 ⁴	7,3x10 ³
2.	0	0	2,0x10 ²	2,0x10 ²
3.	0	0	6,0x10 ⁶	6,0x10 ⁵
4.	0	0	1,2x10 ⁴	0
5.	0	0	6,1x10 ⁵	6,1x10 ⁵
6.	0	0	0	0
7.	0	0	6,78x10 ⁵	0

stancji antybakteryjnych, np. bakteriocyn, kwasu mlekowego, octowego czy pyroglutaminowego, mogą w aktywny sposób redukować populację pałeczek Gram-ujemnych, co obserwowano właśnie u pacjentów z chorobą hemoroidalną już po 3 tygodniach suplementacji.

Natomiast u pacjentów z chorobą uchyłkową wykazano spadek populacji paciorkowców z rodzaju *Enterococcus*, przy jednoczesnym zwiększeniu liczby pacjentów skutecznie skolonizowanych bakteriami z rodzaju *Lactobacillus*, co może świadczyć o większej skuteczności *L. rhamnosus* PL1 w konkurowaniu o receptory na powierzchni nabłonka jelitowego w porównaniu z paciorkowcami z rodzaju *Enterococcus*.

Już 3-tygodniowe stosowanie preparatu probiotycznego spowodowało dwukrotne zwiększenie kolonizacji jelit bakteriami z rodzaju *Lactobacillus* zarówno u pacjentów z chorobą hemoroidalną, jak i uchyłkową. Efekt ten ma szczególną wartość w badanych grupach chorych, ponieważ bakterie probiotyczne są bezpośrednio odpowiedzialne za utrzymanie prawidłowej równowagi mikrobiologicznej w świetle jelita, a obniżając (poprzez swoje metabolity) pH w przewodzie pokarmowym, poprawiają tym samym jego motorykę, ograniczając objawy nasilenia zapor.

Podsumowując, probiotyczny szczep *Lactobacillus rhamnosus PL1* wydaje się mieć kliniczną wartość w przywracaniu właściwych proporcji pomiędzy różnymi gatunkami bakterii kolonizującymi jelito u pacjentów leczonych z powodu niektórych chorób dolnego odcinka przewodu pokarmowego. Konieczne są jednak dalsze badania kliniczne prowadzone na znacznie większej grupie pacjentów.

WNIOSKI

Zapalenie odbytnicy i związane z nim objawy kliniczne u pacjentów leczonych z powodu chorób dolnego odcinka przewodu pokarmowego mogą wynikać z zaburzeń składu mikrobioty jelitowej.

Probiotyczny szczep *Lactobacillus rhamnosus PL1* skutecznie redukuje nasilenie objawów klinicznych, takich jak: dolegliwości

bólów, wzdęcia i dyskomfort w jamie brzusznej u pacjentów leczonych z powodu choroby hemoroidalnej i niepowikłanej choroby uchyłkowej.

Suplementacja pojedynczym szczepem bakterii probiotycznych *Lactobacillus rhamnosus* PL1 wywołuje znaczne zmiany ilościowe i jakościowe w składzie mikrobioty jelitowej, różne w zależności od choroby zasadniczej.

Suplementacja *Lactobacillus rhamnosus* PL1 zwiększa globalną liczbę bakterii z rodzaju *Lactobacillus* (ze szczególnym uwzględnieniem szczepu probiotycznego *L. rhamnosus* PL1) niezależnie od choroby zasadniczej.

Konieczne są dalsze badania prowadzone w większych grupach i z uwzględnieniem kolejnych patologii dolnego odcinka przewodu pokarmowego.

PIŚMIENICTWO

- Duncan S.H., Flint H.J. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations. *Maturitas*, 2013; 75(1): 44-50
- Carding S., Verbeke K., Vipond D.T. i wsp. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 2015; 26: 26191
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A. i wsp. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000; 66(1): 297-303
- Tynkkynen S., Satokari R., Saarela M. i wsp. Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999; 65(9): 3908-3914
- Sakai T., Kubota H., Gawad A., i wsp. K. Effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on constipation-related symptoms and hemorrhoids in women during puerperium. *Benef. Microbes*, 2015; 6(3): 253-262
- Dimidi E., Christodoulides S., Fragkos K.C. i wsp. The effect of probiotics on functional constipation in adults: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2014; 100(4): 1075-1084
- Chmielewska A., Szajewska H. Systematic review of randomised controlled trials: probiotics for functional constipation. *World J. Gastroenterol.*, 2010; 16(1): 69-75
- Narula N., Marshall J.K. Role of probiotics in management of diverticular disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2010; 25(12): 1827-1830
- Dughera L., Serra A.M., Battaglia E. i wsp. Acute recurrent diverticulitis is prevented by oral administration of a polybacterial lysate suspension. *Minerva Gastroenterol. Dietol.*, 2004; 50(2): 149-153
- Lamiki P., Tsuchiya J., Pathak S., Okura R. i wsp. Probiotics in diverticular disease of the colon: an open label study. *J. Gastrointest. Liver Dis.*, 2010; 19(1): 31-36
- Griffiths E. The iron uptake systems of pathogenic bacteria. W: Bullen J.J., Griffiths E.: *Iron and infection*. John Wiley, Chichester 1985
- Pilarczyk-Żurek M., Chmielarczyk A., Gosiewski T. i wsp. Possible role of *Escherichia coli* in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol.*, 2013; 13: 61
- Marcinkiewicz J., Ciszek M., Bobek M. i wsp. Differential inflammatory mediator response in vitro from murine macrophages to lactobacilli and pathogenic intestinal bacteria. *Int. J. Exp. Pathol.*, 2007; 88(3): 155-164
- Golińska E., Tomusiak A., Gosiewski T. i wsp. Virulence factors of *Enterococcus* strains isolated from patients with inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2013; 19(23): 3562-3572
- Mack D.R., Michail S., Wei S. i wsp. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.*, 1999; 276(4): G941-950
- Fellermann K., Wehkamp J., Herrlinger K.R. i wsp. Crohn's disease: a defensin deficiency syndrome? *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2003; 15(6): 627-634
- Yan F., Polk D.B. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277(52): 50959-50965

Liczba słów: 3600

Liczba stron: 7

Tabele: 6

Ryciny: 4

Piśmiennictwo: 17

DOI: 10.5604/01.3001.0010.1083

Spis treści: <http://ppch.pl/resources/html/articlesList?issueId=9993>

Prawa autorskie: Copyright © 2017 Fundacja Polski Przegląd Chirurgiczny. Published by Index Copernicus Sp. z o.o. All rights reserved.

Konflikt interesów: Autorzy deklarują brak konfliktu interesów.

Autor do korespondencji: Katarzyna Borycka-Kiciak, M.D., Ph.D.; Orłowski Hospital, Medical Centre of Postgraduate Education, Department of General, Oncological and Gastrointestinal Surgery; 231 Czerniakowska Street, 00-416 Warsaw, Poland; tel. +48 22 629 00 04, +48 502 733 961, fax. +48 22 622 78 33; e-mail: kborycka@interia.pl

Cytowanie pracy: Borycka-Kiciak K., Strus M., Pietrzak P., Kiciak A., Wawiernia K., Mikołajczyk D., Gałęcka M., Heczko P., Tarnowski W.; Clinical and microbiological aspects of the use of *Lactobacillus rhamnosus* PL1 strains in proctological patients with symptoms of chronic proctitis; *Pol Przegl Chir* 2017; 89 (32): 16-22