

Przesłanki wykorzystywania probiotykoterapii celowanej w praktyce klinicznej

Premises for the use of targeted probiotic therapy in clinical practice

dr hab. n. med. Agnieszka Skowrońska, prof. UWM¹, dr inż. Anna Majkowska², dr Ewelina Sosnowska-Turek³, dr Marcin Dzioba⁴, prof. dr hab. n. med. Dariusz Sitkiewicz⁵, prof. dr hab. n. med. Grażyna Sygitowicz⁵

¹Katedra Fizjologii i Patofizjologii Człowieka, prodziekan Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

²Institut Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk w Olsztynie, Oddział Nauk o Żywności

³Probios Sp. z o.o., Olsztyn

⁴USP Zdrowie Sp. z o.o., Warszawa

⁵Zakład Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

DOI artykułu: 10.57591/LEK.202310.01 © P

■ **Słowa kluczowe:** mikrobiom jelitowy, legislacja, krioprotekcja, formułacja.

■ **Streszczenie:** Koncepcja wykorzystania probiotyków w leczeniu po raz pierwszy została wzmiankowana ponad 500 lat temu w Chinach. Jednak dopiero od kilku dekad jesteśmy świadkami rozkwitu wiedzy na ten temat. Przełomowym wydarzeniem w świecie nauki, który otworzył probiotykom drogę do zastosowań medycznych, był trwający w latach 2008–2013 *Human Microbiome Project*. Badania te zmieniły paradygmat postrzegania ludzkiego organizmu w kierunku superorganizmu złożonego z ciała ssaka i zamieszkującej je mikrobioty. Rynek probiotyków rozwinął się dynamicznie zarówno w obszarze żywności i suplementów diety przeznaczonych dla poprawy dobrostanu ludzi zdrowych, jak i w obszarze preparatów do postępowania dietetycznego w chorobie. Rozwojowi rynku towarzyszą próby jego uregulowania, których podstawą stała się definicja probiotyków przyjęta w 2001 r. przez WHO. Definicja ta stworzyła „efekt klasy” i spowodowała, iż probiotyki zaczęto traktować jako jednorodną grupę, ignorując wpływ specyfiki poszczególnych produktów, dawek, czasu przyjmowania, składu szczerbowego, metod wytwarzania i formułacji na osiągnięte korzyści podawania.

■ **Keywords:** gut microbiome, legislation, cryoprotection, formulation.

■ **Abstract:** The concept of using probiotics in medicine was first mentioned over 500 years ago in China. However, it wasn't until a few decades ago that we witnessed a flourishing of knowledge on this topic. A groundbreaking event in the world of science that paved the way for medical applications of probiotics was the Human Microbiome Project, which took place from 2008 to 2013. These studies changed the paradigm of how we perceive the human body, shifting it towards a superorganism composed of the mammalian body and the microbiota residing within and on it. The probiotics market has grown rapidly, both in the realm of food and dietary supplements aimed at improving the well-being of healthy individuals and in the field of dietary approach in diseases management. The development of the market has been accompanied by attempts to regulate it, with the basis for regulation being the definition of probiotics adopted by the WHO in 2001. This definition created an "class effect" and led probiotics to be treated as a homogeneous group, ignoring the impact of the specific characteristics of individual products, dosages, timing of administration, strain composition, manufacturing methods, and formulations on the benefits of their use.

■ Wprowadzenie

Liczni autorzy podejmujący tematykę ludzkiego mikrobiomu cytują informację o niebywalej liczbie komórek bakterii tworzących mikrobiotę człowieka, która o rząd lub dwa przewyższa liczbę komórek ludzkich [1]. Grupa badaczy z Izraela postanowiła zweryfikować metodologię z lat 70., która doprowadziła do upowszechnienia tego poglądu i dowiodła jego nieścisłości. Wykorzystując najnowszą wiedzę oraz narzędzia diagnostyczne, podważono zarówno domniemaną różnicę w liczbie komórek, jak i masę bakterii zasiedlających ludzkie jelita [2]. Fakt ten doskonale ilustruje sytuację panującą wokół probiotyków i mikrobioty. Mamy bowiem do czynienia z niezwykle dynamicznym rozwojem wiedzy, który ustawicznie weryfikuje powstające tezy oraz z równie dynamicznym rozwojem rynku, który szuka perswazyjnych narracji. Mikrobiom, szczególnie ten jelitowy, traktowany jest jak organ bakteryjny o znaczącej aktywności metabolicznej, której zaburzenie wydaje się stanowić istotny czynnik etiologiczny wielu chorób o podłożu zapalnym lub immunologicznym. W świetle tych doniesień rodzi się popyt na produkty, które mogłyby korzystnie oddziaływać na mikrobiom, czyli np. probiotyki. Postrzeganie mikrobioty jelitowej jako organu wprowadza jednak sporo problemów poznawczych. Przede wszystkim umyka fakt, iż w jelicie grubym człowieka mamy do czynienia z ekosystemem i to jednym z najbardziej złożonych spośród dotąd poznanych. Organ składa się z jednorodnych komórek o znanej fizjologii. W przypadku mikrobioty jelitowej nie ma mowy o jednorodności. Podobnie probiotyk pod względem technologicznym znacząco odbiega od typowego leku czy suplementu, mimo iż występuje w znanych formacjach.

■ Status prawny probiotyków

Probiotyki wprowadzane na rynek z oświadczeniem zdrowotnym, implikującym leczenie, terapię, prewencję czy usuwanie objawów chorób, w myśl obowiązujących przepisów powinny być

klasyfikowane jako farmaceutyki. Jednocześnie, ponieważ probiotyki to żywe organizmy, to tego typu produkt podlega regulacjom stworzonym dla żywych bioterapeutyków [3]. W praktyce większość probiotyków jest klasyfikowanych jako suplementy diety, a nieliczne wyjątki zarejestrowanych produktów to wynik zaszłości, związanych ze zmianami przepisów rejestracyjnych. Wartym odnotowania faktem jest jednak pierwszy zarejestrowany przez FDA lek probiotyczny ze wskazaniem do leczenia CDC [4].

Regulacje dotyczące probiotyków różnią się istotnie w zależności od kraju. W Unii Europejskiej suplementy diety, a w tym probiotyki, są regulowane: rozporządzeniem 178/2002/EC i dyrektywą 2000/13/EU. Oświadczenia zdrowotne dla suplementów diety wymagają autoryzacji EFSA. Jak dotąd wszystkie zgłoszone oświadczenia dla probiotyków zostały odrzucone. EFSA publikuje jednocześnie listę szczepów bakterii, które nie wymagają badań w zakresie bezpieczeństwa (QPL) [5]. Lista jest bardzo obszerna, co oznacza, że w praktyce nie istnieje kontrola procesu produkcji probiotyków, mimo blokowania oświadczeń zdrowotnych, czyli w istocie ich promocji.

W Stanach Zjednoczonych większość probiotyków jest sklasyfikowana jako żywność lub suplementy diety. Suplementy diety muszą spełniać normy GMP, jednak nie dotyczy to oceny jakości i skuteczności [6]. Podobnie jak w Europie producenci suplementów diety nie mogą formułować oświadczeń implikujących leczenia chorób, ale dopuszczalne są tzw. strukturalne lub funkcjonalne oświadczenia, takie jak: „wspomaga prawidłowe trawienie”, którym jednocześnie towarzyszy wzmianka, iż FDA nie wspiera takiego oświadczenia. Tym niemniej sformułowane oświadczenie musi być prawdziwe, nie wprowadzać w błąd i powinno opierać się na dowodach naukowych [7].

Sytuacja regulacyjna w obu wspomnianych regionach jest niezadowolająca i wprost prowadzi do problemów związanych z jakością,

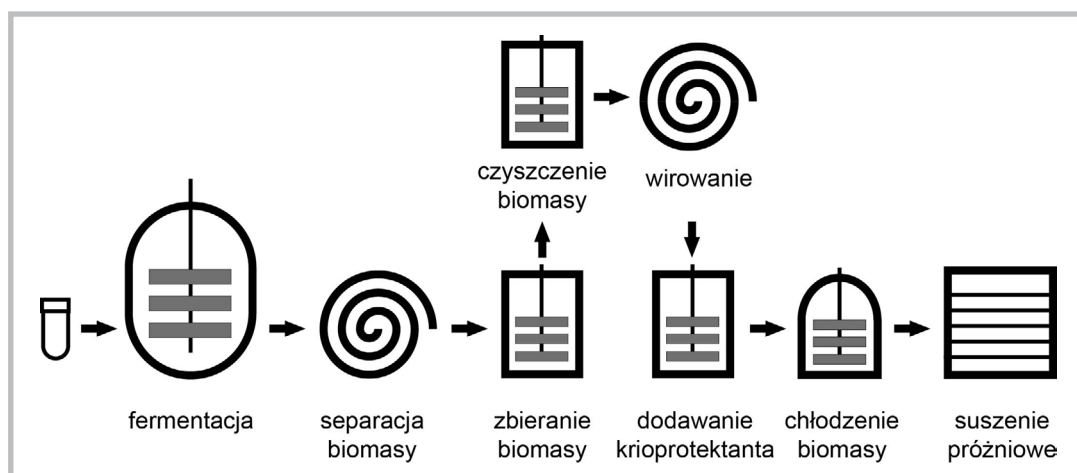
bezpieczeństwem i prawdziwością oświadczeń produktów probiotycznych, funkcjonujących w środowisku komercyjnym. Przede wszystkim, probiotyki to żywe organizmy, a więc produkt przygotowany z ich udziałem nie jest statyczny. Dodatkowo właściwości i wymagania poszczególnych gatunków i szczepów bakterii różnią się zasadniczo. Nie wspominając już o sytuacji w produktach wieloszczepowych oraz kombinacjach probiotyków z różnymi substancjami. Gdy tego typu produkty są podawane ludziom zdrowym, zagrożenie jest niewielkie, jednak zupełnie inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku pacjentów z zaburzoną funkcją śluzówki jelit lub osłabionym układem immunologicznym. Paradoksalnie to właśnie te grupy pacjentów mogłyby najwięcej skorzystać z prawidłowo prowadzonej probiotykoterapii.

■ Proces produkcji probiotyków

Przemysłowy proces produkcji mikroorganizmów o właściwościach probiotycznych składa się z kilku etapów: fermentacji, zagęszczania biomasy, oczyszczania komórek bakteryjnych ze szkodliwych metabolitów, krioprotekcji i liofilizacji (ryc. 1). Przemysłowy proces fermentacji istotnie różni się od skali laboratoryjnej, w związku z czym nie wszystkie mikroorganizmy o właściwościach probiotycznych nadają

się do przemysłowej produkcji. Ze względu na dużą objętość bioreaktora chłodzenie mieszaniny wymaga czasu, podobnie jak proces separacji komórek bakteryjnych z mieszaniny produkcyjnej. Przemysłowe mikroorganizmy muszą być więc odporne na stres wynikający z okresów przestoju w suboptymalnych warunkach [8]. Oddzielenie komórek bakteryjnych od medium poreakcyjnego odbywa się zazwyczaj na drodze wirowania. W niektórych przypadkach biomasa komórkowa jest odmywana z metabolitów i ponownie wirowana.

Kolejnym ważnym etapem jest mieszanie oczyszczonych komórek z krioprotektantem [9]. Proces ten jest kluczowy, gdyż w trakcie liofilizacji komórki bakteryjne narażone są na silny stres. W pierwszej fazie dochodzi do tworzenia się kryształków lodu w roztworze, co zwiększa stężenie substancji rozpuszczonych, wywołując stres osmotyczny. Wzrasta również stężenie reaktywnych cząsteczek tlenu, wzmagając stres oksydacyjny. Kryształki lodu mogą się tworzyć także wewnątrz komórek bakteryjnych, co zagraża integralności błony komórkowej oraz organelom wewnątrzkomórkowym [10]. Następnie sublimacyjne usunięcie wody w gwałtowny sposób zwiększa stosunek powierzchni komórki bakteryjnej do jej objętości, powodując deformacje oraz wzrost powierzchni kontaktu



Rycina 1. Schemat produkcji probiotyków

z reaktywnymi cząsteczkami tlenu, obecnymi w atmosferze. Jeśli probiotyki mają być wykorzystane w matrycy żywnościowej, zaleca się jedynie zamrożenie koncentratu. Jeśli probiotyk ma trafić do saszetki lub kapsułki, konieczne jest sublimacyjne wysuszenie w celu wprowadzenia komórek w stan stagnacji metabolicznej. Wysuszony materiał poddaje się mieleniu, aby uzyskać pożądany rozmiar cząsteczkowy i miesza z wybranym nośnikiem – celulozą mikrokryształiczną lub maltodekstryną [11].

Dodatki stosowane na wszystkich etapach produkcji probiotyków mają istotny wpływ na finalny produkt. Decydują o przeżywalności komórek bakterii podczas produkcji oraz w trakcie przechowywania i transportu gotowego produktu, jak również podczas pasażu przez układ pokarmowy. Wszystkie stosowane dodatki muszą spełniać wymogi dotyczące produkcji żywności. Odpowiedni dobór dodatków decyduje o tym, czy produkt finalny będzie pozbawiony niepożądanych przez nabywców substancji, takich jak: laktoza, gluten, soja czy białka mleka [12]. Tymczasem powszechnie stosowanym w produkcji probiotyków krioprotektantem jest odtłuszczone mleko, co nie jest zaskakujące, ponieważ większość produkcji probiotycznej trafia do nabiału lub innych produktów spożywczych. Wśród krioprotektantów nie pochodzących od zwierząt wyróżnia się: dwucukry (sacharoza, trehaloza), polialkohole (mannitol, sorbitol) i wielocukry (maltodekstryna, dekstran, inulina) [13].

W przypadku suplementów diety ślady niepożądanych domieszek mogą się obniżyć poniżej dopuszczalnych progów w procesie standaryzacji, czyli mieszania z nośnikiem. Mogą się one również nakładać w przypadku łączenia szczepów pochodzących od różnych producentów w produkty wieloszczepowe. Znaczna liczba probiotycznych suplementów diety obecnych na rynku nie jest komponowana przez producentów szczepów, lecz podmioty niedysponujące pełnią wiedzą na temat ich charakterystyki.

■ Formułacja

Na rynku można spotkać probiotyki w zasadzie we wszystkich znanych formułacjach. Dominują jednak kapsułki twarde i saszetki. Bardzo często podmiotem odpowiedzialnym za formułację suplementu diety jest wytwórca kontraktowy, bazujący na szczepach zakupionych od różnych producentów. Biagioli i wsp. [14] porównali dwa produkty zawierające tę samą kompozycję szczepów, przeznaczone do postępowania dietetycznego w IBD, wprowadzone na rynek przez dwóch różnych producentów. Okazało się, że produkty istotnie różnią się aktywnością metaboliczną.

Wysuszone komórki bakterii to materiał wysoce higroskopijny, a jego specyfikacja zwykle zawiera informację o konieczności przechowywania w chłodzie. Aby utrzymać liofilizat w stanie stagnacji metabolicznej, kluczowe jest zachowanie niskiej wilgotności na wszystkich etapach poprzedzających moment przyjmowania gotowego produktu [15]. Co do zasady niska temperatura oraz wilgotność przyczyniają się do zachowania żywotności komórek bakterii probiotycznych [16]. Aby to osiągnąć, należy ograniczyć do minimum liczbę dodawanych substancji, kontrolować atmosferę pracy oraz poziom wilgotności dodatków, stosować odpowiednio barierowe opakowania oraz utrzymywać gotowy produkt w chłodnym kanale rynku.

Jak powszechnie wiadomo, tak się nie dzieje. Formułacje suplementów zawierających probiotyki odzwierciedlają najczęściej strategię marketingowe, produkty pakowane są w nieodpowiednie, tanie materiały w niekontrolowanych warunkach. Konsumentom natomiast otrzymują komunikat o braku konieczności przechowywania produktu w lodówce. Jak to jest możliwe? Prawne możliwości takiego stanu rzeczy tworzą omówione wcześniej nieadekwatne regulacje. Technologicznie efekt osiąga się, stosując kilka zabiegów związanych z odpowiednią selekcją szczepów, mikroenkapsulacją liofilizatu, doborem materiałów opakowaniowych oraz manipulacją na poziomie oznakowania produktu.

Ta ostatnia praktyka stosowania tzw. naddatków technologicznych jest szczególnie niebezpieczna. Producent zakłada na bazie eksperymentu lub *a priori*, że dana część komórek bakterii nie dożyje do końca okresu ważności produktu. Produkt wypuszczony na rynek zawiera 100%, a czasem 200% więcej CFU niż deklaruje etykieta. W przypadku produktów wieloszczepowych z deklaracją CFU na sumę szczepów, naddatek wprowadzony do produktu dotyczy najtrwalszego szczepu, który zwykle jest najtańszy i nie jest autochtoniczny dla ludzkiego układu pokarmowego.

Producenci spełniają wymogi prawne, ale konsument przyjmuje produkt o zupełnie innej aktywności niż się spodziewa, co jest szczególnie niebezpieczne w przypadku osób chorych lub osłabionych. W rzeczywistości konsument przyjmuje sumę żywych i martwych bakterii znacząco przekraczającą deklarację na opakowaniu. Ta ukryta zawartość jest szczególnie niebezpieczna w przypadku suplementów zawierających wysokie dawki probiotyków. Nadmiarowe żywe komórki oraz martwe, całe lub jedynie ich fragmenty mogą zaburzać równowagę aktywności cytokin przeciw- i prozapalnych oraz inne procesy komórkowe [17], a tym samym wywoływać efekty odwrotne do zamierzonych. Całkowite wyeliminowanie nieżywych komórek bakterii z produktów probiotycznych nie jest możliwe ze względu na ich naturę oraz sam proces produkcji, jednak dalsze pogłębianie tego problemu poprzez ogromne naddatki tworzy potencjalnie niebezpieczny precedens.

Podsumowanie

W świetle powyższych informacji możliwość korzystania z probiotyków monoszczepowych produkowanych w kontrolowanych i znanych warunkach zapewnia znaczący wzrost bezpieczeństwa z punktu widzenia praktyki klinicznej. Wielu specjalistów zajmujących się tematem postuluje konieczność wprowadzenia zmian w oznakowaniu probiotyków, aby znana była liczba zarówno żywych, jak i martwych komórek bakterii.

Nadesłano: 04-09-2-23

Adres do korespondencji: redakcja@lekwpolisce.pl

Piśmiennictwo:

1. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 2009;136(1):65-80.
2. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016;14(8):e1002533.
3. O'Toole PW, Marchesi JR, Hill C. Next-generation probiotics: the spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Nat Microbiol*. 2017;2:17057.
4. FDA Approves First Pill for the Microbiome. Dostępne na: <https://time.com/6274112/fda-approves-microbiome-pill/> (odwiedzona: 19.06.2023).
5. European Food Standards Agency. Qualified Presumption of Safety (QPS). Dostępne na: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/qualified-presumption-safety-qps>. (odwiedzona 28.08.2023).
6. Kolaček S, Hojsak I, Berni Canani R, Guarino A, Indrio F, Orel R, et al. A Call for Improved Quality Control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65(1):117-124.
7. International Probiotics Association. Regulation of Probiotics in the USA: Dietary Supplements. 2016. Dostępne na: <http://internationalprobiotics.org/regulation-probiotics-usa/>. (odwiedzona: 28.08.2023).
8. Wendel U. Assessing Viability and Stress Tolerance of Probiotics-A Review. *Front Microbiol*. 2022;12:818468.
9. Fenster K, Freeburg B, Hollard C, Wong C, Rønhave Laursen R, Ouwehand AC. The Production and Delivery of Probiotics: A Review of a Practical Approach. *Microorganisms*. 2019;7(3):83.
10. Wendel U. Assessing Viability and Stress Tolerance of Probiotics-A Review. *Front Microbiol*. 2022;12:818468.
11. Forssten SD, Laitila A, Maukonen J, Ouwehand AC. Probiotic triangle of success; strain production, clinical studies and product development. *FEMS Microbiol Lett*. 2020;367(19):fnaa167.
12. Mogna G, Strozzi GP, Mogna L. Allergen-free probiotics. *J Clin Gastroenterol*. 2008;42:S201-S204.
13. Aschenbrenner M, Foerst P, Kulozik U. Freeze-drying of probiotics. 2015:213-241. W książce: Först P, Santivarangkna C. *Advances in Probiotic Technology*, CRC Press 2020 Nowy York.
14. Biagioli M, Laghi L, Carino A, Cipriani S, Distrutti E, Marchianò S, et al. Metabolic Variability of a Multispecies Probiotic Preparation Impacts on the Anti-inflammatory Activity. *Front Pharmacol*. 2017;8:505.
15. Hansen SJZ, Morovic W, DeMeules M, Stahl B, Sindelar CW. Absolute Enumeration of Probiotic Strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI-04 ® via Chip-Based Digital PCR. *Front Microbiol*. 2018;9:704.
16. Forssten SD, Sindelar CW, Ouwehand AC. Probiotics from an industrial perspective. *Anaerobe* 2011;17:410-413.
17. de Simone C. The Unregulated Probiotic Market. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2019;17(5):809-817.