

Modulácia ľudskej respiračnej imunity Imunobiotikami

Cielená kombinácia prospešnej baktérie *Lactiseibacillus rhamnsosus* CRL1505, beta-glukánov a vitamínu D



Cielená kombinácia prospešnej baktérie *Lactiseibacillus rhamnsosus* CRL1505, beta-glukánov a vitamínu D

Kombinácia baktérie mliečneho kvasenia *Lactiseibacillus rhamnsosus* CRL1505 (Lr1505) a beta-glukánov bola vybraná na základe ich vedecky a klinicky preukázanej schopnosti regulácie imunitnej odozvy mimo gastrointestinálneho traktu, vrátane sliznice dýchacích ciest.



IN VIVO ŠTÚDIE

Viacero súčasných štúdií demonštrovalo značný dosah črevnej mikrobioty na vrodené antivírusové mechanizmy imunity respiračného systému cez jej vplyv na **a)** respiračné epitelové bunky, **b)** respiračné dendritické bunky (DC) a **c)** pľúcne makrofágy. Vplyv črevnej mikrobioty na vrodenú imunitu taktiež modifikuje humorálne adaptívne imunitné reakcie (Obr. 1) (1).

Za účelom študovania mechanizmov zapojených do posilnenia respiračnej antivírusovej imunity sprostredkovanej Lr1505, sa uskutočnili štúdie na zvieracích modeloch s použitím dvoch respiračných vírusov: respiračný synciciálny vírus (RSV) a vírus chrípky (z angl. Influenza virus - IFV) (2,3).

Za účelom študovania mechanizmov zapojených do posilnenia črevnej ako aj respiračnej antibakteriálnej imunity sprostredkovanej Lr1505, sa uskutočnili štúdie na zvieracích modeloch s použitím baktérií: *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* a *Streptococcus pneumoniae* (4).

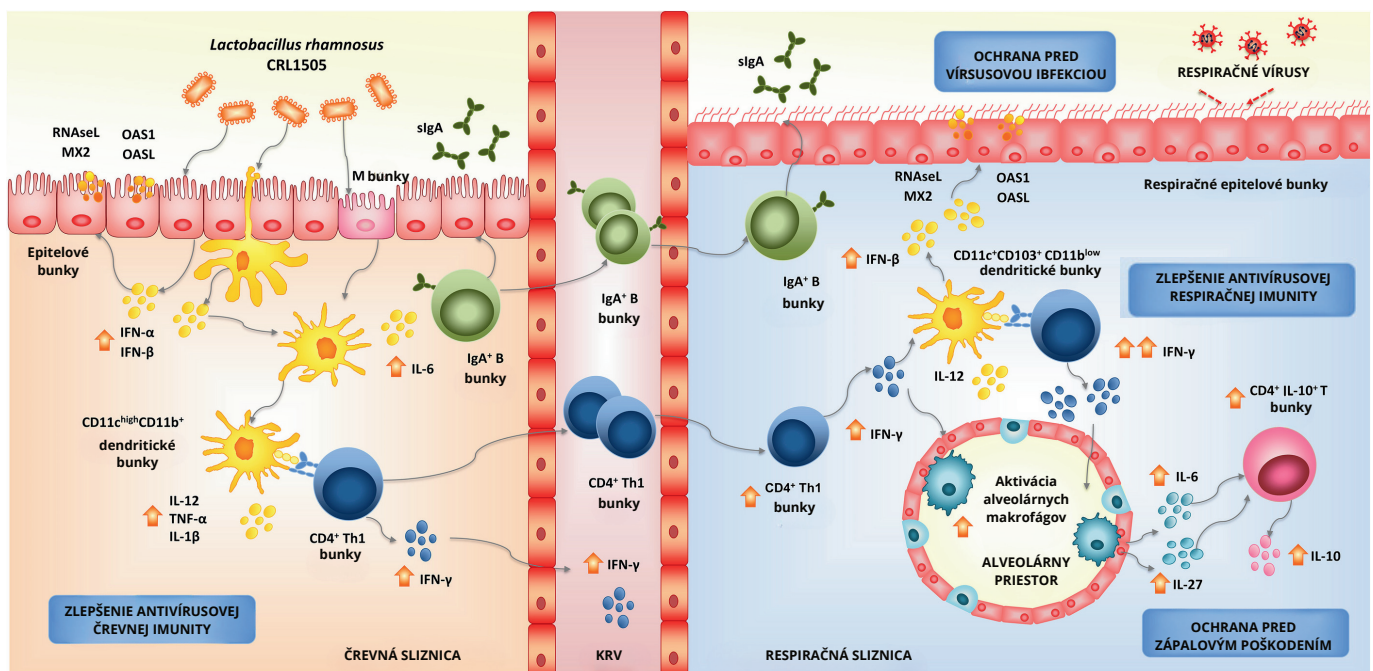
1) Respiračná vrodenná antivírusová imunitná odpoveď a *L. rhamnosus* CRL1505

Výsledky štúdie ukázali, že orálne podávaný kmeň Lr1505 bol schopný významne znížiť vírusové titre v pľúcach, znížiť poškodenie pľúc a zvýšiť prežitie myší v reakcii na infekcie RSV (2) alebo IFV (3). Ochranný účinok vyvolaný Lr1505 bol spojený s jeho schopnosťou zvýšiť hladiny IFN typu I v respiračnom trakte (1,2,3).

Preukázala sa tiež zlepšená prezentácia antigénu sprostredkovaná Lr1505, čo by mohlo mať priaznivý účinok na respiračnú humorálnu imunitnú odpoveď (1).

3) Intestinálna antivírusová imunitná odpoveď a *L. rhamnosus* CRL1505

Ďalšie štúdie vykonané na črevných epitelových bunkách ukázali, že Lr1505 je schopný zvýšiť



Obr. 1. Modulácia respiračnej antivírusovej imunity pomocou *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. Navrhovaný mechanizmus pre distálnu imunomoduláciu indukovanú imunobiologickým kmeňom *L. rhamnosus* CRL1505 a zvýšenie odolnosti proti vírusovým infekciám prostredníctvom zlepšenia respiračných vrodenných a adaptívnych antivírusových imunitných odpovedí. (upravené podľa Villena a Kitazawa, 2020)

Probiotický kmeň Lr1505 vyvolal mobilizáciu CD4(+)IFN-γ(+) T buniek z čreva do dýchacieho traktu, čím sa zvýšila lokálna produkcia IFN-γ, kľúčového aktivátora vrodenného a adaptívneho imunitného systému, a stimulovali sa bunky prezentujúce antigén (2, 5) (Obr. 1).

2) Respiračná adaptívna antivírusová imunitná odpoveď a *L. rhamnosus* CRL1505

Hodnotenie populácie pľúcnych dendritických buniek (DC) u myší po perorálnom podaní Lr1505 poukázalo na zvýšené hladiny CD11c(+)CD103(+) a CD11c(+)CD11b(high) DC.

produkcii INF typu 1 (6), zlepšiť expresiu INF-α a INF-β ako aj rôznych antivírusových faktorov (Nplr3, Oas1, a i.) potrebných pre efektívnu obranu voči vírusom (7).

4) Antibakteriálna imunitná odpoveď a *L. rhamnosus* CRL1505

Perorálna suplementácia Lr1505 sa osvedčila aj v prípade enteropatogénnych baktérií a dokázala sa aj stimulácia imunitného systému respiračnej sliznice. Zvýšením hladín IFN-γ v dôsledku užívania Lr1505 v sére a v črevnej tekutine sa podarilo aktivovať peritoneálne makrofágy, čo viedlo k zvýšenej eliminácii enteropatogénov *S. typhimurium*

(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) (8).

Podávanie Lr1505 významne zvýšilo aj hladiny antipneumokokových respiračných a sérových IgA a IgG protilátok, čo poukazuje na priaznivý účinok na protilátkovú odpoveď v prípade infekcie *Streptococcus pneumoniae*.(4).

KLINICKÉ ŠTÚDIE

- 6-mesačná (Júl-December), na súbore 298 detí s Lr1505
- spôsob účinku imunomodulácie preukázaný aj v *in vivo* a klinickej 8-týždňovej štúdií, na súbore 60 jedincov s teplom usmrteným Lr1505 (HkLr1505)
- randomizované
- dvojito zaslepené
- placebom kontrolované

Výsledky prvej štúdie, realizovanej na skupine detí vo veku 2-5 rokov naznačujú výrazné zmiernenie závažnosti a zníženie incidencie gastrointestinálnych a respiračných infekcií najmä u malých detí a to priamym antimikrobiálnym účinkom a posilnením funkcie slizničnej bariéry v dôsledku účinkov baktérie Lr1505 na vrodenu aj adaptívnu imunitu.

Výsledky štúdie mechanizmu účinku, realizovanej na dospeljej populácii 60 zdravých jedincov poukázali aj na schopnosť teplom-usmrtenej baktérie Lr1505 udržať optimálny stav imunitného systému ako aj fyzickú kondíciu pôsobením na a aktiváciou pDC buniek, ktoré pôsobia na celú imunitnú funkciu, čo potvrdilo imunomodulačný potenciál živého kmeňa Lr1505.

Úvod

Infekčné ochorenia ako akútne zápal stredného ucha, faryngitída a tonzilitída, infekcie horných dýchacích ciest, zápal pľúc, bronchitída, hnačka sú aj naďalej jednou z hlavných príčin úmrtí detí predškolského veku (9-11).

Nárast rezistencie na antibiotiká a potreba nových a zlepšených stratégií na riešenie infekčných chorôb viedli k preskúmaniu **terapeutického potenciálu indukovanej modulácie slizničnej imunitnej odpovede pomocou probiotík**.

V dôsledku toho sa zistilo, že určité probiotické baktérie mliečneho kvasenia (LAB) majú ochranné účinky proti bakteriálnym a vírusovým infekciám v gastrointestinálnom trakte (12)

Značná pozornosť sa sústredila na úlohu probiotík pri ochrane čreva pred patogénmi. Stále však pribúda viac dôkazov, že perorálne podávané probiotiká sú schopné regulovať imunitné reakcie mimo gastrointestinálneho traktu, vrátane sliznice dýchacích ciest (13).

Prvá klinická štúdia odhalila, že probiotikum Lr1505 pridávané do jogurtu **posilnilo a zlepšilo slizničnú imunitu a znížilo výskyt a závažnosť črevných a respiračných infekcií u detí** (14).

V roku 2023 boli ukončené klinické štúdie na báze výživového doplnku na detskej a dospeljej populácii a výsledky korešponujú so závermi štúdie s probiotickým jogurtom. To znamená, že nosič pre baktérie nie je kľúčový a ich efekt je prenosný. Štúdie budú publikované v priebehu roka 2024.

Metodika

Do štúdie boli zaradené zdravé deti navštevujúce centrá dennej starostlivosti päť dní v týždni. Probiotický kmeň Lr1505 bol pridaný do osladeného jogurtu s obsahom najmenej 1×10^8 jednotiek tvoriacich kolónie (CFU)/100 g (14).

Placebo skupine bol podávaný ten istý jogurt bez obsahu Lr1505.

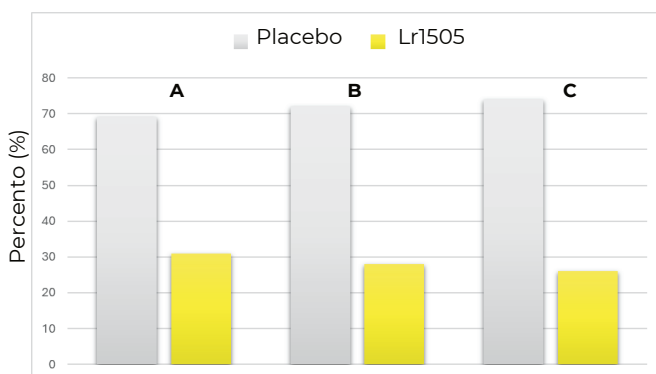
Obe skupiny boli po celú dobu štúdie (6 mesiacov) sledované odborníkmi na výživu, pediatrami a imunológmi.

Na začiatku a na konci štúdie sa odobrali vzorky stolice, aby sa určil počet baktérií mliečneho kvasenia. Okrem toho boli stanovené hladiny IgA v slinách (14).

Výsledky

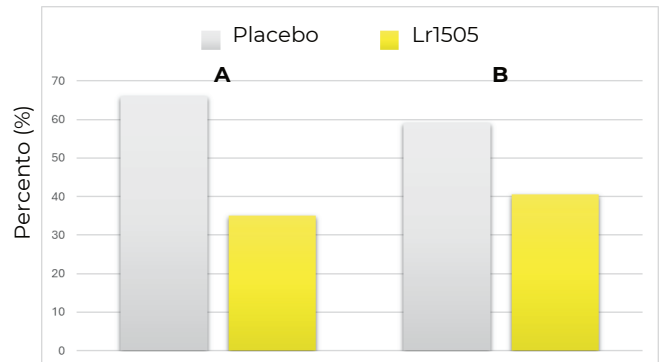
1) Výskyt infekcií

Z celkového počtu 298 detí, ktoré sa zúčastnili štúdie, 132 (45 %) z nich malo počas štúdie infekčné ochorenie. Najčastejšími infekčnými ochoreniami boli **infekcie horných dýchacích ciest, ďalej faryngitída a tonzilitída a hnačka**. V skupine detí, ktoré dostávali jogurt s probiotickým kmeňom *L. rhamnosus* CRL1505, bol pozorovaný významný **pokles infekčných ochorení** v porovnaní so skupinou s placebom (34 % oproti 66 %). Analýza následne odhalila významné rozdiely medzi placebo skupinou a skupinou s Lr1505 v prípade výskytu infekčných ochorení a to: infekcie horných dýchacích ciest (31 % oproti 69 %)(**Obr. 2A**), faryngitída a tonzilitída (28 % oproti 72 %)(**Obr. 2B**) a akútna hnačka (26 % oproti 74 %)(**Obr. 2C**) (14).



Obr. 2: Porovnanie výskytu infekčných ochorení u testovaných skupín, **A:** infekcie horných dýchacích ciest, **B:** tonzilitída a faryngitída, **C:** hnačka (upravené podľa Villena a kol., 2012)

Hodnotili sa aj klinické účinky suplementácie probiotík na výskyt horúčky a potrebu antibiotickej liečby. Zistilo sa, že subjekty v skupine s probiotikom Lr1505 v jogurte mali výrazne nižší výskyt horúčky (**Obr. 3A**). Okrem toho **potreba antibiotickej liečby** u detí konzumujúcich probiotiká bola výrazne nižšia ako v skupine s placebom (**Obr. 3B**) (14).



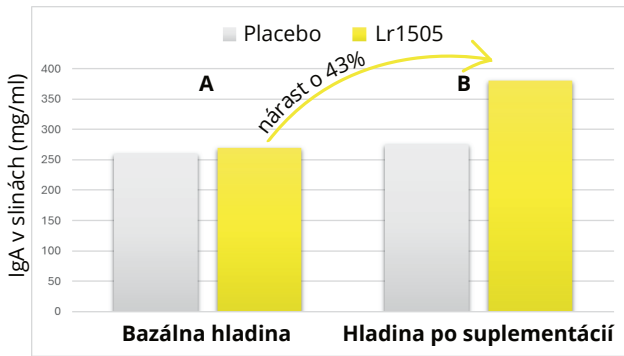
Obr. 3: Percentuálne porovnanie **A)** prítomnosti horúčky a **B)** nutnosti antibiotickej terapie u testovaných skupín (upravené podľa Villena a kol., 2012)

2) Hladiny imunoglobulínu A (IgA) v slinách

Vykonalo sa aj stanovenie IgA v slinách za účelom stanovenia **miery slizničnej imunity**. Vzorky boli odobraté deň pred začiatkom intervencie (bazálne hladiny) a na konci podávania probiotík alebo placebo (hladiny po suplementácii). Pri porovnaní probiotického jogurtu a placebo neboli pozorované žiadne významné rozdiely v bazálnych hladinách IgA.

Naopak, pozorovalo sa **významné zvýšenie hladín IgA u detí, ktoré dostávali probiotický jogurt**, zatiaľ čo hladiny IgA po suplementácii v skupine s placebom boli podobné tým, ktoré boli namerané na začiatku štúdie. Konzumácia probiotík s obsahom kmeňa Lr1505 je preto schopná zlepšiť slizničnú imunitu, o čom svedčí aj hladina IgA v slinách (Obr. 4) (14).

Výsledky štúdie naznačujú, že probiotikum Lr1505 napomáha znížiť výskyt infekcií horných dýchacích ciest a gastrointestinálneho traktu, podporuje imunitný systém a znižuje potrebu konzumácie antibiotík.



Obr. 4. Hladiny IgA v slinách v skupinách s Lr1505 a placebom. (upravené podľa Villena a kol., 2012)

MECHANIZMUS ÚČINKU

Imunitný systém človeka predstavuje účinný obranný mechanizmus pred všadeprítomnými baktériami a vírusmi, ktorým sme vystavení každý deň a jeho vitalitu je potrebné udržať a podporiť.

Predpokladá sa, že **plazmocytoidné dendritické bunky (pDC)** sú dôležité pri aktivácii a regulácii imunitných funkcií. Aktivácia pDC aktivuje rôzne imunitné bunky zodpovedné za vrodenu a získanú imunitu zvýšením IF- α , HLA-DR a iných dôležitých imunitných molekúl, čo vedie k normálnemu udržaniu celkovej imunitnej funkcie (16).

Táto klinická štúdia odhalila aj potenciál **teplom-usmrtenej baktérie Lr1505 (HkLr1505)** podporiť **udržanie normálnej imunitnej funkcie aktiváciou pDC buniek** ako aj redukovať symptómy ochorenia v čase infekcie (15), čo umocňuje zistenia z predošlej klinickej štúdie (14).

Metodika

Klinická štúdia bola realizovaná na zdravých jedincoch oboch pohlaví vo veku 20-64 rokov po dobu 8 týždňov, ktorí neboli liečení na a nemali vážne či chronické ochorenie, nemali nikdy črevné ochorenia ovplyvňujúce trávenie či absorpciu a za obdobie posledných 2 rokov, nemali infekčné ochorenie dýchacích ciest. Účastníkom štúdie bola podávaná tabletky s **a)** obsahom HkLr1505 alebo **b)** bez obsahu HkLr11505 (placebo skupina) (15).

pDC aktivita bola vyhodnotená meraním expresie hladín HLA-DR a CD86. Celkový zdravotný stav bol hodnotený sériou zdravotných dotazníkov a sledovaný lekárom (15).

Výsledky

1) Hladiny HLA-DR

Pri hodnotení imunitnej funkcie sa HLA-DR znížila v oboch skupinách po 8 týždňoch konzumácie, ale zostala významne vyššia v skupine s HkLr1505 ako v skupine s placebom (15).

2) Celková fyzická kondícia

Pri hodnotení fyzického stavu boli kumulatívne počty dní čiastkových symptómov (ako je upchatý nos, nepríjemné pocity v hrdle, ťažoba v hrudníku, chraptot, bolesti hlavy, nevoľnosť, bolesti kĺbov a svalov, bolesti žalúdka počas obdobia príjmu) výrazne redukované v skupine s HkLr1505 v porovnaní so skupinou s placebom (15).

3) PG05 - Kľúčový aspekt imunomodulačnej aktivity baktérie Lr1505

Jedným z kľúčových prvkov identifikovaných v interakcii Lr1505 a HkLr1505 s hostiteľom je jeho **kmeňovo špecifický peptidoglykán (PG05; súčasť bunkovej steny živej i teplom-usmrtenej baktérie)**, o ktorom sa preukázalo, že **má imunomodulačnú aktivitu**. PG05 významne zvyšuje produkciu špecifických protilátok a počet alveolárnych makrofágov (AM) produkujúcich IFN- β . Tieto bunky hrajú kľúčovú úlohu v prospešnej modulácii vrodenej imunitnej odpovede počas **vírusových a bakteriálnych infekcií** (17).

Záver

Záver štúdie, zaoberajúcej sa mechanizmom účinku imunomodulačnej aktivity teplom-usmrtenej Lr1505 potvrdzujú a umocňujú výsledky z predchádzajúcej klinickej štúdie, realizovanej na detskej populácii ako aj výsledky klinickej štúdie, realizovanej na dospelých populácii, ktorá bude publikovaná v priebehu roka 2024.

IMUNOMODULAČNÝ EFEKT BETA-GLUKÁNOV

V súčasnosti je väčšina prebiotík na trhu odvodená z nestráviteľných oligosacharidov, avšak najnovší výskum sa zameriava aj na nestráviteľné komplexné sacharidy s dlhým reťazcom ako sú **beta-glukány**, získavané z rôznych potravinových zdrojov, ktoré preukázali nielen účinky podporujúce zdravie, ale aj potenciál nového zdroja prebiotík. Najnovšie sa skúmal vplyv konzumácie **(1,3)-(1,6)-β-D-glukánu** s dlhým reťazcom izolovaným z **kvasinky *Saccharomyes cerevisiae*** na počet epizód prechladnutia u zdravých jedincov pomocou placebom kontrolovanej, dvojito zaslepanej, randomizovanej, multicentrickej klinickej štúdií, ktorá preukázala, zvýšenie potenciálu imunitného systému človeka brániť sa proti inváznym patogénom (18).

Beta-glukán (1,3)-(1,6)-β-D-glukán s dlhým reťazcom izolovaný z kvasinky *Saccharomyes cerevisiae*, **stimuluje imunitné bunky v čreve, aby spustili nešpecifickú alebo špecifickú imunitnú odpoveď**, ktorá aktivuje takzvané „scavenger cells“ (makrofágy) v Peyerových plátoch. Tieto „vyčytávacíe“ bunky začínajú deštrukciu patogénov a aktivujú ďalšie obranné bunky, ako sú B- a T-bunky alebo dendritické bunky. Podporou bielych krviniek tento beta-glukán vo veľkej miere prispieva k boju proti baktériám, vírusom, hubám a parazitom, ktoré spôsobujú choroby (19).

Vitamín D

Enzymy metabolizujúce vitamín D a receptory vitamínu D sú prítomné aj v imunitných bunkách (bunky prezentujúce antigén, T bunky, B bunky, monocyty). Údaje *in vitro* ukazujú, že okrem modulácie vrodenej imunitných buniek podporuje vitamín D aj tolerogénnejší imunologický stav. Údaje *in vivo* zo zvierat a zo štúdií suplementácie vitamínu D u ľudí preukázali priaznivé účinky vitamínu D na imunitnú funkciu, najmä v kontexte autoimunity (20).

Referencie

- (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.