

Vliv podání *Escherichia coli* Nissle (Mutaflor) na střevní osídlení, endotoxemii, funkční stav jater a minimální jaterní encefalopatii u nemocných s jaterní cirhózou

J. Lata¹, J. Juránková², V. Příbramská¹, P. Frič³, M. Šenkyřík¹, P. Dítě¹, R. Kroupa¹

¹ Interní gastroenterologická klinika Lékařské fakulty MU a FN Brno, pracoviště Bohunice, přednosta prof. MUDr. Petr Dítě, DrSc.

² Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno, pracoviště Bohunice, přednostka prim. MUDr. Alena Ševčíková

³ Interní klinika Ústřední vojenské nemocnice, Praha, přednosta doc. MUDr. Miroslav Zavoral, Ph.D.

Souhrn: Cílem naší studie bylo ověřit účinnost *Escherichia coli* Nissle (Mutaflor) na střevní osídlení, hladinu endotoxinu, jaterní encefalopatii a funkční schopnost jater u nemocných s jaterní cirhózou. Do studie bylo zařazeno 39 nemocných (22 léčených Mutaforem, 17 placebem). Přestože došlo ke snížení hodnoty testu spojování čísel u nemocných, u kterých byla popsána minimální jaterní encefalopatie, tento pokles nebyl při hodnocení trendu významný. V léčené skupině se však signifikantně zlepšilo střevní osídlení ($p < 0,001$) a byl nalezen trend k významnému snížení hladiny endotoxinu ve 42. dnu ($p = 0,07$) a zlepšení funkční schopnosti jater hodnocený Childovou-Pughovou klasifikací ve 42. i 84. dnu ($p = 0,06$). Probiotika se tak mohou stát důležitou součástí léčby u této skupiny nemocných.

Klíčová slova: jaterní cirhóza – probiotika – *Escherichia coli* Nissle – endotoxin – jaterní encefalopatie

Effect of administration of *Escherichia coli* Nissle (Mutaflor) on intestinal colonisation, endo-toxemia, liver function and minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis

Summary: The purpose of the study was to verify effects of *Escherichia coli* Nissle (Mutaflor) on intestinal colonisation, endotoxin levels, hepatic encephalopathy and liver function in patients with liver cirrhosis. The study involved 39 patients (22 taking Mutaflor and 17 taking placebo). Even though the number combination test showed extended reaction time in patients with described minimal hepatic encephalopathy the drop was not significant in the trend evaluation. However, the treated group displayed significant improvement of intestinal colonisation ($p < 0.001$) and a trend towards significant reduction of endotoxin levels on day 42 ($p = 0.07$) and improvement of liver function assessed with the Child-Pugh classification on days 42 and 84 ($p = 0.06$). Probiotic preparations can therefore represent a significant contribution to this group therapy.

Key words: liver cirrhosis – pro-biotic – *Escherichia coli* Nissle – endotoxin – hepatic encephalopathy

Úvod

Koncept probiotik je znám již téměř 100 let a jejich význam v medicíně v posledních letech stoupá. Jejich příznivý efekt byl prokázán u celé řady chorob, počínaje léčbou průjmů, nespecifických střevních zánětů až po ovlivnění alergických reakcí či karcinogeneze. U chronických jaterních chorob hraje důležitou roli mikrobiální přerůstání v tenkém střevě v důsledku kontaminace G- kolonickou mikroflórou. Důsledkem je porucha

střevní bariéry se zvýšením permeability, translokace a systémová endotoxemie. Klinickým důsledkem může být zhoršení funkční schopnosti jater, vznik infekcí, rozvoj jaterní encefalopatie apod. Probiotika by ovlivněním střevního osídlení mohla tuto situaci zlepšit. Cílem naší studie bylo probiotikem ovlivnit střevní osídlení a ověřit, zda probiotika mohou mít vliv na hladinu endotoxinu, minimální jaterní encefalopatii a funkční schopnost jater.

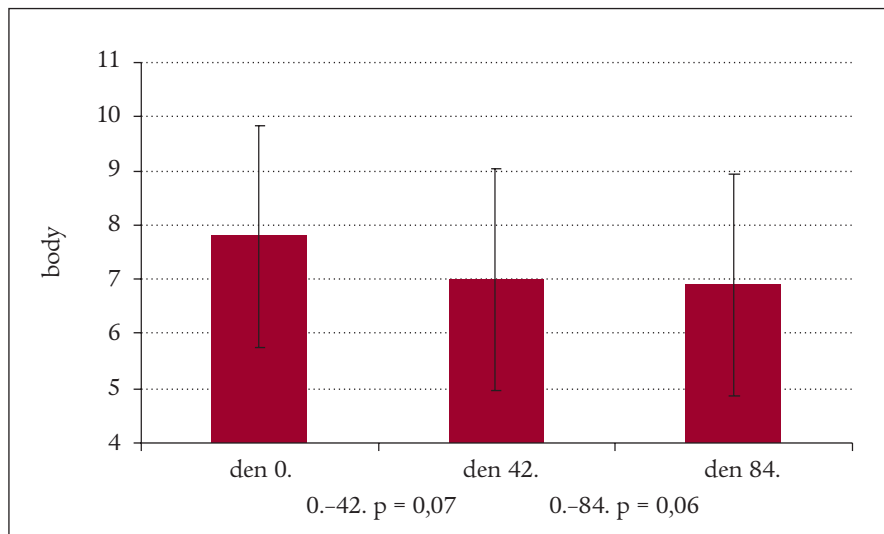
Soubor a metodika

Do studie byly zařazeni nemocní s klinicky či biopticky diagnostikovanou kompenzovanou jaterní cirhózou. Nemocní nesměli užívat antibiotika a laktulózu 4 týdny před zahájením a v celém průběhu studie a vyloučení byli pacienti s aparentní infekcí a s anamnézou krvácení do gastrointestinálního traktu v posledních 6 týdnech. Randomizace byla provedena metodou náhodných bloků. Soubor nemocných je uveden v tab. 1.

Tab. 1. Soubor nemocných.

	n	muži	ženy	Etiologie				Childova klasifikace			Prům. věk
				Toxo	VHC	PBC	Nezn	A	B	C	
Mutaflor	22	14	8	19	1	1	1	7	9	6	53,2 (35 - 65)
Placebo	17	10	7	15	0	1	1	5	7	5	51,4 (34 - 59)

Etiologie: Toxo – toxonutritivní, VHC – virová hepatitida C, PBC – primární biliární cirhóza, Nezn – nestanovena


Graf 1. Childova-Pughova klasifikace ve skupině léčené Mutaflorem.
Tab. 2. Mikrobiologický nále z stolice v den 0. a 42.

	n	den 0.	den 42.
Mutaflor	22	2,0 ± 0,7	1,5 ± 0,6
placebo	17	2,2 ± 0,7	2,3 ± 0,5
		ns	p < 0,001

Escherichia coli Nissle v dávce 2,5 až 25×10^9 bakterií v jedné kapsli (Mutaflor, Ardeypharma, Německo) i placebo (sacharóza ve stejné tobolce, připraveno Ardeypharma, Německo) byly podávány první 4 dny po jedné kapsli, od 5. dne 2 kapsle ráno. Oběma skupinám byly preparáty podávány 42 dnů, dalších 42 dnů (tj. do 84. dne) byli po odslepení léčení jen nemocní ve skupině s *Escherichia coli* Nissle.

Před podáním ve 42. dnu a u léčené skupiny v 84. dnu bylo provedeno klinické vyšetření, obvyklá biochemická a hematologická vyšetření včetně hladiny amoniaku a endotoxinu, test spojování čísel a bylo provedeno bakteriologické vyšetření sto-

lice. Minimální jaterní encefalopatie byla hodnocena testem spojování čísel (number connecting test – NCT), při kterém je měřen čas nutný ke spojení čísel od 1 do 25, nepravidelně umístěných na listu papíru [1]. Endotoxin byl stanoven pomocí *Limulus* amebocytového lyzátu (LAL), vodným roztokem amebocytů ostrorepa *Limulus polyphemus*. V přítomnosti endotoxinu jsou faktory obsažené v LAL aktivovány v proteolytické kaskádě, jejímž důsledkem je rozštěpení umělého bílkovinného substrátu, který je obsažen v LAL (kit LAL Pyrochrome, Cape Cod) [2]. Kvantitativní mikrobiologické vyšetření stolice bylo prováděno po steril-

ním rozmíchání 0,5 g stolice ve 4,5 ml sterilního pufovaného fyziologického roztoku se vznikem základního ředění 10^{-1} . Z tohoto ředění je odpi-petována 0,1 ml do 9,9 ml sterilního pufovaného fyziologického roztoku a je připraveno ředění 10^{-3} , 10^{-5} a 10^{-7} . Z těchto ředění je vzorek kalibrovanou kličkou 10 µl očkovan na krevní agar, Endovu půdu, XLD agar a VL agar s amikacinovým diskem a kultivován 24 hod při 37 °C; kultivace VL agaru se prodlužuje na 48 hod při 37 °C v anaerobním boxu. Poté je spočítán počet kolonií na jednotlivých půdách a identifikace je provedena podle růstových vlastností, morfologie kolonií a biochemických vlastností [3]. K umožnění statistického zpracování byl bakteriologický nále z hodnocen jako 1 při nálezu fyziologické flóry včetně laktobacilů a bifidobakterií, jako 2 pokud byla přítomna fyziologická flóra bez laktobacilů a bifidobakterií, jako 3 při nálezu potenciální patogenní mikroflóry. Nejzávažnější nále z hodnocený 4, obligatorní patogeny, nebyl nalezen u žádného nemocného.

Výsledky byly statisticky zhodnoceny t-testem a dvouvýběrovým t-testem. Jako statisticky významné jsme hodnotili hladiny významnosti menší než 5 %, hladinu významnosti mezi 5 a 10 % jsme hodnotili jako patrný trend, který by při větších počtech mohl být statisticky významným. Mimo rozdílu ve skupinách byly v léčené skupině hodnoceny rozdíly mezi dnem 0. a dnem 42., resp. 84.

Výsledky

Ve skupině léčené *Escherichia coli* Nissle došlo ke statisticky význam-

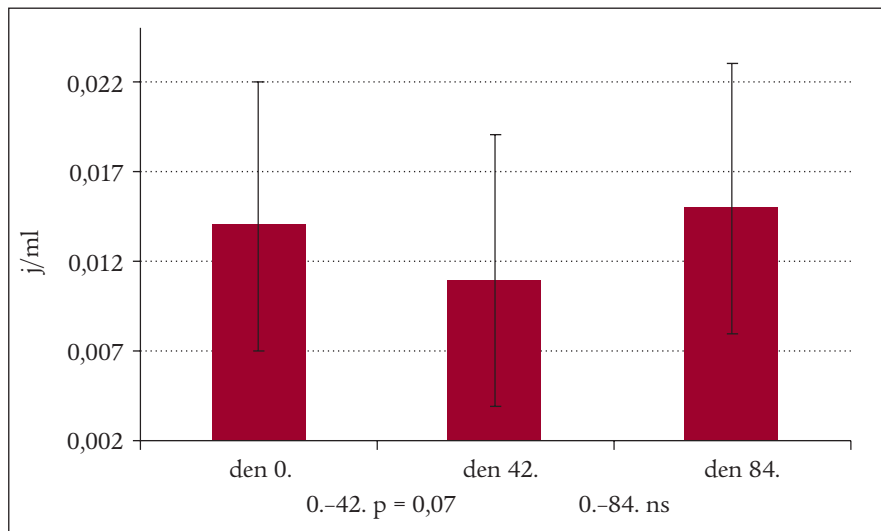
nému zlepšení nálezu ve stolici, snížení počtu potenciálních patogenů a nálezu i laktobacilů resp. bifidobakterií (tab. 2).

Žádný z dalších sledovaných parametrů nedosáhl statistické významnosti při porovnání s kontrolní skupinou, ve které také nedošlo ke změně mezi dnem 0 a 42. Ve skupině nemocných léčených *Escherichia coli* Nissle jsme však ve dvou parametrech našli trend naznačující možnou statistickou významnost při větších počtech. Došlo ke zlepšení funkční schopnosti jater hodnocené Childovou-Pughovou klasifikací mezi dnem 0. a 42. ($p = 0,07$) i dnem 0. a 84. ($p = 0,06$) (graf 1). Hladina endotoxinu se snížila v prvních 42 dnech ($p = 0,07$), ovšem po 84. dnu se vrátila k původním hodnotám (graf 2). Při hodnocení minimální jaterní encefalopatie jsme hodnotili jen patologické nálezy, tj. hladinu amoniaku nad $55 \mu\text{mol/l}$ a NCT nad 50 s a zlepšení jen v případě rozdílu většího než 15 % oproti původní hodnotě. Patologické hodnoty jsme našli jen u 14 nemocných léčených Mutaflowrem, a přestože především v hodnotě NCT došlo u většiny nemocných ke snížení, vzhledem k malému počtu a velké směrodatné odchylce nebyl nálezný statisticky významný (graf 3 a 4).

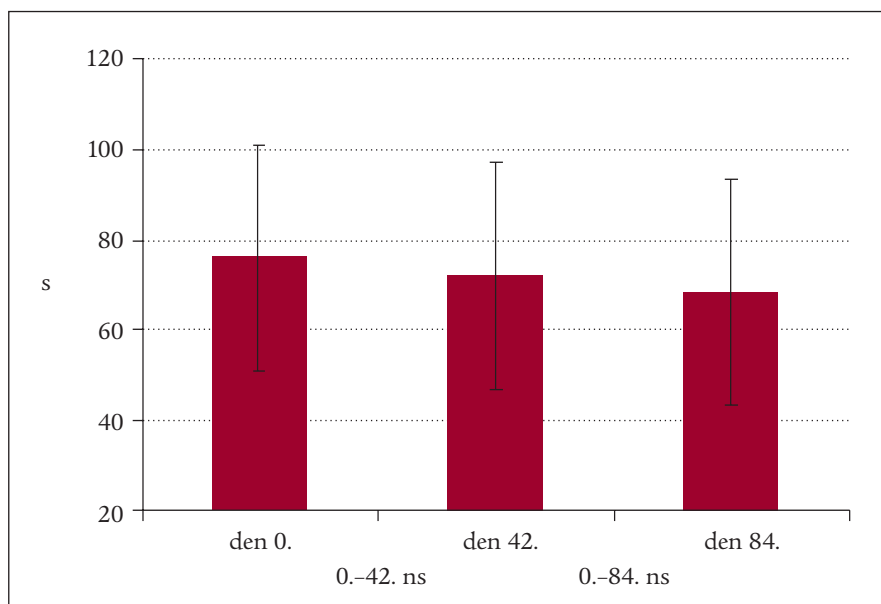
Diskuse

Historie probiotik začíná počátkem minulého století Mečnikovem [4] – němečtí autoři však často za první popis možného probiotika uvádějí práci Döderleinovu [5], který 16 let před Mečnikovem navrhl vaginální bakterie produkující kyselinu mléčnou k inhibici růstu patogenních bakterií – Mečnikov přisuzoval vyšší průměrný věk určitých etnických skupin většímu příjmu fermentovaných mléčných produktů a doporučoval jejich požívání.

Probiotika byla původně definována jako „mikroorganismy, vyvolávající růst jiných mikroorganismů“ [6],



Graf 2. Hladina endotoxinu ve skupině léčené Mutaflowrem.

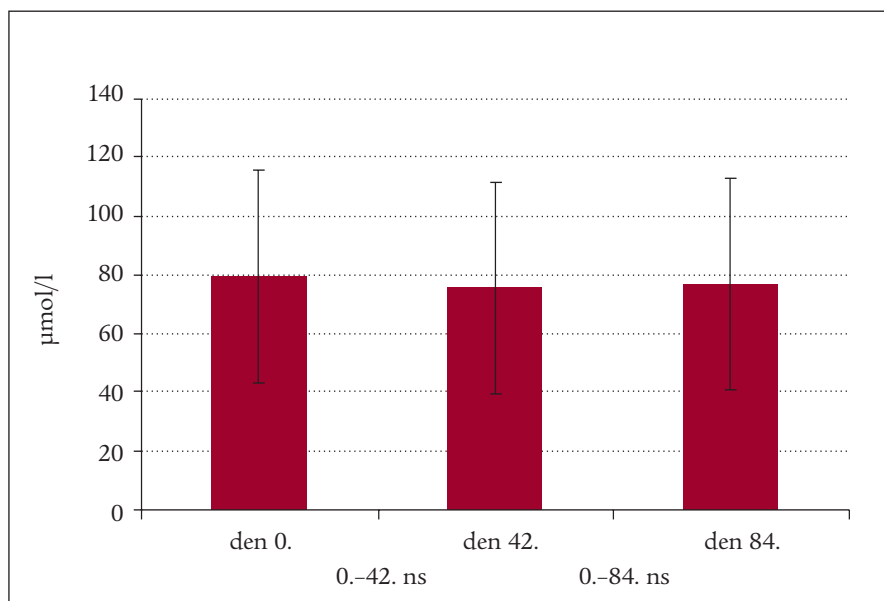


Graf 3. Hodnota testu spojování čísel ve skupině léčené Mutaflowrem.

později jako „živé mikroorganismy, které vyvolávají nebo podporují prospěšnou rovnováhu autochtonní mikrobiální populace gastrointestinálního traktu (GIT)“. Tyto mikroorganismy nemusejí být nezbytně stálou součástí GIT, ale měly by mít „prospěšný vliv na celkový a zdravotní stav člověka“ [7,8]. Nyní se probiotika definují přesněji jako „mono- nebo smíšené kultury živých mikroorganismů, které, pokud jsou podány člověku, příznivě hostitele ovlivňují zlepšením vlastností vlastní mikrobioty“ [9].

Příznivý efekt podání probiotik byl popsán ve více než 50 studiích; původně byly užívány především k léčbě průjmů nejrozličnější etiologie [10], později i k léčbě nespecifických záležitostí střevních, jatrních chorob, ovlivnění alergických reakcí a podobně [11,12].

V hepatologii by probiotika mohla být úspěšná především při léčbě či prevenci komplikací chronických jatrních onemocnění, především infekcí a jatrní encefalopatie. U 50–70 % těchto nemocných dojde v tenkém střevě k mikrobiálnímu přerůstání



Graf 4. Hladina amoniaku ve skupině léčené Mutaflorem.

v důsledku kontaminace G- kolo-nickou mikroflórou. Důsledkem je porucha střevní bariéry se zvýšením permeability a systémovou endotoxemií, která má za následek nejen poškození jaterních funkcí, ale např. i vzestup portálního tlaku a zhoršení hemostázy [13]. V naší studii jsme probiotikum obsahující *Escherichia coli* Nissle podávali nemocným s kompenzovanou jaterní cirhózou. Léčba prokázala statisticky významné zlepšení bakteriálního osídlení GIT. Bylo zajímavé, že po podávání *Escherichia coli* Nissle došlo i k překvapivě vyššímu nálezu laktobacilů či bifidobakterií. Obnova „fyziologičtější“ mikroflóry podáním *Escherichia coli* tudíž patrně umožní i snadnější osídlení střeva ostatními fyziologickými bakteriemi, které jsou přítomny ve stravě, ale toto osídlení je za patologické situace obtížné. Tento nálezn by mohl být důležitý při diskusích, zda je rozdíl v účinku jednotlivých probiotik u různých chorob. Potvrdí-li se náš závěr, že podávání jednoho druhu může usnadnit osídlení i jiným fyziologickým druhem, nemusí hrát různý obsah bakterií v probiotických zásadní roli.

Žádný z dalších nálezů již nebyl statisticky významný, ale v léčené

skupině jsme našli několik zajímavých trendů. Nejvýraznější bylo zlepšení Childovy-Pughovy klasifikace jak po 42, tak i po 84 dnech. Zlepšení funkční schopnosti jater po probiotických bylo již v literatuře popsáno [14], ale přesné vysvětlení chybí. Lze však předpokládat, že obnova fyziologické mikroflóry v trávicím traktu sniží zá-těž jater potenciálními vstřebanými toxickými metabolity, a především endotoxinem. Endotoxemie je u nemocných s jaterní cirhózou častá a bylo prokázáno, že endotoxin stimuluje sekreci cytokinů. Cytokiny, jako např. TNF α , IL-1 a IL-6 mohou ovlivnit tvorbu a degradaci extracelulární matrix, což je důležité při rozvoji jaterní fibrózy i cirhotické přestavby [15]. Po probiotických bylo popsáno snížení hladiny jak endotoxinu [16], tak i cytokinů [17], především však u cirhózy etylické etiologie. Také v naší studii (s většinou nemocných toxo-nutritivní etiologie) jsme našli trend k významnému snížení hladiny endotoxinu ve 42. dnu; jeho hladina se však po 84. dnu vrátila zpět k původním hodnotám. Ve výše citovaných studiích byla probiotika podávána krátkou dobu, další efekt sledován nebyl. Tento náš nálezn neumíme vysvětlit a bude tématem naší další práce.

Ovlivnění střevní mikroflóry by mohlo ovlivněním pH stolice působit teoreticky příznivě i na minimální jaterní encefalopatii (MJE), která může významně ovlivnit kvalitu života a každodenní činnost nemocného. Jako MJE je označována jinak nevysvětlitelná porucha kognitivních funkcí, jako je např. zpomalená psychomotorika, nedostatek pozornosti, poruchy jemné motoriky a vnímavosti zrakových vjemů detekovatelná pouze speciálními neurofyziologickými testy [18]. MJE je přítomna asi u 30–70 % nemocných s jaterní cirhózou bez jaterní encefalopatie [19]. V naší studii jsme MJE našli u 68 %, což je u horní popisované hranice. Ač bylo po probiotických popsáno zlepšení MJE [14,20], v naší studii jsme tento nálezn nepotvrdili, byť především u NCT došlo k jeho snížení. Příčinou bude patrně velmi malý počet nemocných s nálezem MJE v našem souboru, ale určitý podíl může mít i zvolené probiotikum. Vhodnější je patrně podání probiotika obsahujícího přímo *Lactobacillus* sp., které nejen že neprodukuje ureazu (tím dojde k výraznějšímu poklesu pH stolice), ale produkuje i kyselinu mléčnou a CO₂.

Závěr

Escherichia coli Nissle (Mutaflor) podaná nemocným s jaterní cirhózou významně zlepšila střevní osídlení, včetně přítomnosti laktobacilů a bifidobakterií. Její podávání snižila hladinu endotoxinu a zlepšila funkční schopnost jater. Přestože došlo ke zlepšení testu spojování čísel u nemocných s minimální jaterní encefalopatií, v našem souboru nebyl tento nálezn statisticky významný.

Práce byla podpořena Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví České republiky (NR 9116-3).

Literatura

1. Sood GK, Sarin SK, Mahapatra J et al. Comparative efficacy of psychometric tests in detection of subclinical hepatic

encephalopathy in nonalcoholic cirrhosis: search for a rational approach. *Am J Gastroenterol* 1989; 84: 156–159.

2. Bauer TM, Schwacha H, Steinbrückner B et al. Small intestinal bacterial overgrowth in human cirrhosis is associated with systemic endotoxemia. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2364–2370.

3. Murray P, Baron E, Phaller M. *Manual of clinical microbiology*. Washington DC: American Society for Microbiology 1999.

4. Metchnikoff E. *Prolongation of life*. New York: Putnam 1908.

5. Döderlein A. Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. (The vaginal transsudate and its significance for childbed fever.) *Centralblatt für Bacteriologie* 1892; 11: 699–700.

6. Cahn DR. Über die nach Gram färbbaren Bacillen des Säulingsstuhles (Bacilli of infant stools stainable according to Gram.) *Centralblatt für Bakteriologie I. Abteilung Originale* 1901; 30: 721–726.

7. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147: 747–748.

8. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365–378.

9. Havenaar R, Ten Brink B, Huis in't Veld JHJ. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R (ed). *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman and Hall, 1992: 209–224.

10. Sartor RB. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 44–50.

11. Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. *Brit J Nutrition* 2002; 88: S39–S49.

12. Frič P. Probiotika v gastroenterologii. Aktuální přehled. *Čes a slov gastroent a hepatol* 2001; 55: 237–241.

13. Thalheimer U, Triantos CK, Samonakis DN et al. Recent advances in clinical practice – Infection, coagulation and variceal bleeding in cirrhosis. *Gut* 2005; 54: 556–563.

14. Liu Q, Duan ZP, Ha DK et al. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology* 2004; 39: 1441–1449.

15. Wu CD, Li MZ, Chen CL et al. Endotoxin-induced liver injury and plasma tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 le-

vel changes in rabbits. *Chin J Dig* 1995; 15: 256–258.

16. Hai YZ, Hui JW, Zhi L et al. Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. *Chin J Dig Dis* 2004; 5: 64–72.

17. Loguericio C, Federico A, Tuccillo C et al. Beneficial effects of probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: 540–543.

18. Brůha R, Mareček Z. Esenciální fosfolipidy v léčbě jaterní encefalopatie. *Vnitř Lék* 2000; 46: 199–204.

19. Brůha R, Mareček Z, Petrtyl J et al. *Jaterní encefalopatie – komplikace jaterní cirhózy*. Praha: Medprint 2000.

20. Boča M, Vyskočil M, Mikulecký M et al. Komplexná liečba chronickej hepatálnej encefalopatie doplnená probiotikom. *Čas Lék Čes* 2004; 143: 324–328.

doc. MUDr. Jan Lata, CSc.
www.fnbrno.cz
e-mail: jlata@fnbrno.cz

Doručeno do redakce: 7. 12. 2005
Přijato po recenzii: 19. 12. 2005

www.kardiologickeforum.cz