

BENEFICIILE CLINICE ALE PROBIOTICELOR LA PACIENȚII CU SINDROM DE INTESTIN IRITABIL

Clinical benefits of probiotics in patients with irritable bowel syndrome

Dr. Horațiu Iustinian Teodorescu¹, Dr. Alexandru Ciric², Dr. Alma Gabriela Kosa¹,
Dr. Petre Iacob Calistru¹

¹Centrul de Diagnostic și Tratament „Dr. Victor Babeș”, București

²ICA Research and Development SRL

REZUMAT

Sindromul intestinului iritabil (SII) este un diagnostic de tip tulburare funcțională din apanajul medicinei moderne, care are un impact important asupra calității vieții individului. Contribuția disbiozei microflorei intestinale la declanșarea unor afecțiuni este deja acceptată, în literatură vorbindu-se despre acest ecosistem ca „organ funcțional”, care poate fi influențat prin medicație. Probioticele sunt microorganisme vii, administrate sub diverse forme farmaceutice/alimente nutraceutice (iaurt), pentru tratamentul SII, pornind de la conceptul că vor influența benefic acest ecosistem. Studiile clinice în domeniu trebuie să se bazeze pe metode *subiective* de apreciere a efectului terapeutic, dar și pe metode *obiective*, de punere în evidență a probioticului la locul de acțiune și, nu în ultimul rând, corelarea celor 2 tipuri de rezultate.

Cuvinte cheie: calitatea vieții, microfloră intestinală, probiotic

ABSTRACT

Irritable bowel syndrome (IBS) is frequent functional disease diagnostic in modern medicine and it has big impact on individual quality of life. The contribution of dysbiosis of the intestinal microbiota to the development of disease and illness is already accepted and we can talk about this ecosystem as important “functional organ” and possible target for intervention (medication). Probiotics are live microorganisms, that are used as pharmaceutical compounds or nutraceutical food (yoghurt) for treatment of IBS, based on the concept that they will favourable influence the functionality of the intestinal microbiota. The probiotic trials should have evaluation of effects from *subjective* and *objective* point of view (identification and quantification of probiotic at local level) and also the correlation between them.

Key words: quality of life, intestinal microbiota, probiotics

INTRODUCERE

Probioticele sunt organisme vii administrate sub diverse forme farmaceutice sau sub formă de alimente nutraceutice (iaurt) spre beneficiul pacientului, pornind de la conceptul că acestea vor deveni parte a florei intestinale sau o vor influența benefic. Microflora intestinală este compusă din organisme comensale care au o relație simbiotică cu gazda, iar administrarea probioticelor în diverse patologii se

face cu intenția de ameliorare a conținutului și funcționalității microecologiei intestinale. (1,2,3)

Sindromul intestinului iritabil (SII) este unul dintre cele mai frecvente diagnostice de tip tulburare funcțională din apanajul medicinei moderne, studiile vest-europene și americane apreciind o prevalență de aproximativ 10% în rândul populației generale (1). Probioticele au devenit un capitol important în tratarea sindromului de intestin iritabil (SII), beneficiind an de an de rezultatele unei cercetări susținute

Adresă de corespondență:

Dr. Horațiu Iustinian Teodorescu, Centrul de Diagnostic și Tratament „Dr. Victor Babeș”, Șos. Mihai Bravu Nr. 281, București

în domeniu. Controlând și inhibând „fermentația nesănătoasă” în tubul digestiv, probioticele produc efecte benefice asupra balanței florei intestinale, diminuând tulburările funcționale corespunzătoare SII.

Un număr mare de studii în literatura de specialitate prezintă rezultate dificil de comparat din cauza diferențelor de design al studiului, de doză de probiotic și de tulpinile folosite. Meta-analizele în domeniu semnalează problemele legate de perioada scurtă de administrare și numărul de subiecți din loturile de studiu – care nu întrunesc criteriile de semnificație statistică (4,6). De asemenea, un număr mare de studii s-a făcut asupra așa-numitelor cocktail-uri probiotice, făcând dificil de interpretat rezultatele (chiar benefice) obținute și atribuirea beneficiilor terapeutice unor anumite specii sau subspecii (10,11,12,13,14). Pe de altă parte, unele efecte benefice sunt totuși de necontestat și unele concluzii nu au întârziat să apară; de exemplu varietatea de doze, de la 10^5 la 10^{13} unități formatoare de colonii (UFC)/ml cu care s-au făcut studii în ultimii 10 ani, a permis aprecierea unui preparat probiotic de calitate de la peste 10^8 (UFC)/ml (2).

Supraviețuirea probioticelor în tractul gastro-intestinal este considerată o problemă în ce privește atingerea concentrației cu efect terapeutic de către o anumită formă farmaceutică/nutraceutică de probiotic (9,10). Această supraviețuire este influențată de diverse bariere fizico-chimice, incluzând aciditatea gastrică, sărurile biliare, enzimele digestive. Când se adaugă bacterii probiotice în alimente, trebuie luate în considerare tipul de cultură, concentrația necesară pentru a obține un efect, supraviețuirea în tipul digestiei, viabilitatea în timpul depozitării, efectele asupra gazdei (15,16).

Identificarea și cuantificarea microorganismelor probiotice au adus reale beneficii pentru dezvoltarea acestui domeniu, pentru aplicabilitatea acestora, clinică și comercială; este însă absolut necesară îmbunătățirea metodelor, astfel încât să existe informații mai concrete despre prezența, densitatea și efectele probioticelor într-un anumit ecosistem gazdă – flora microbială. Folosirea tehnicilor de biologie moleculară (qPCR) a revoluționat cercetarea în domeniul florei intestinale, dar, deși acuratețea și sensibilitatea acestei metode este incontestabilă, s-au conturat imediat și minusurile ei, cum ar fi faptul că, bazată fiind pe măsurarea genei ribozomale 16S rRNA, nu poate face diferența între microorganismele vii sau moarte pe care le cuantifică (18,19,20)

OBIECTIV

Ne-am propus, în cadrul tezei de doctorat cu titlul „Implicațiile administrării de probiotice la pacienții cu sindromul intestinului iritabil”, să studiem influența prelungirii viabilității probioticului și implicat a creșterii concentrației (UFC) acestuia în intestin, asupra efectului terapeutic; în acest scop am inițiat un studiu clinic prospectiv de tip randomizat dublu-orb, în care am comparat un produs probiotic microincapsulat cu același produs în forma standard, administrat la pacienții diagnosticați cu SII.

MATERIAL ȘI METODĂ

Studiul clinic s-a inițiat în Centrul de Diagnostic și Tratament „Dr. V. Babeș” (CDTVB), folosind baza de date de gastro-enterologie, în care au fost identificate 1.621 de colonoscopii în perioada 2009-2011 la pacienți cu simptomatologie digestivă (dureri abdominale, constipație, diaree), dintre care 276 au fost diagnosticați cu SII. Au fost identificați, de asemenea, în aceeași perioadă, 100 de pacienți cu vârste sub 50 de ani, diagnosticați cu SII, la care colonoscopia nu era obligatorie. Dintre aceștia (1.621 + 100), au acceptat înrolarea în teza de doctorat semnând consimțământul informat, 68 de pacienți cu colonoscopie și 56 de pacienți fără colonoscopie. După efectuarea unei baterii de teste paraclinice și confruntarea criteriilor de includere/excludere (prezentate în continuare), au rămas în studiu 60 de pacienți (34 de femei și 26 de bărbați).

Criterii de includere:

1. vârsta între 18-70 de ani;
2. pacienți cu SII care îndeplinesc criteriile Roma III (Tabelul 1), cu stare generală bună;
3. indicele de masă corporală < 35.

Criterii de excludere:

1. boli organice gastro-intestinale;
2. HTA neglijată;
3. DZ tratat medicamentos;
4. graviditate, alăptare, endometrioză;
5. tratament antibiotic administrat în ultima lună;
6. intervenții chirurgicale abdominale complicate (aderențe abdominale);
7. intoleranță la lactoză;
8. demență.

Preparatul de administrat în studiu (atât cel forma standard, cât și cel microincapsulat) s-a obținut la institutul de cercetare ICA Research and Development București, sub forma unui iaurt probiotic, folosind preparat bacterian liofilizat *Bifidobacterium*

TABELUL 1. Criteriile Roma III pentru Sindrom de Intestin Iritabil (SII)

<p>Criteriile de diagnostic*: Durere abdominală recurentă și disconfort**, pentru cel puțin 3 zile/lună în ultimele 3 luni, asociate cu două sau mai multe din următoarele: a. Ameliorare după defecație b. Debut asociat cu modificarea frecvenței scaunului c. Debut asociat cu modificarea aspectului scaunului</p>
--

*Criterii îndeplinite cel puțin în ultimele 3 luni și cu un debut al simptomatologiei cu cel puțin 6 luni înainte de stabilirea diagnosticului.

**Disconfort este senzația neplăcută ce nu este descrisă ca o durere.

HOWARU® (producător Danisco – DuPont), dextrine Crystal-tex 626 (producător National Starch) și alginat de sodiu Algogel 6020 (producător Cargill), combinate cu o metodă originală.

Procesul de microincapsulare presupune acoperire perfectă la nivel de microni (capsule cu dimensiuni mai mici de 1 mm și ajungând până la 2-4 μm), a unei substanțe de încapsulat (în cazul nostru tulpina de *Bifidobacterium*) într-o altă substanță ce formează învelișul exterior (în cazul nostru alginatul de sodiu și maltodextrina), cu scopul de imobilizare, de protejare, de control al transferului, de structurare sau de imprimare a unei anumite caracteristici funcționale substanței încapsulate micro (în cazul nostru prelungirea viabilității și concentrației în intestin).

În cadrul procesului de încapsulare este necesară instalația Buchi B290 Mini Spray Dryer (Fig. 1), iar setările au corespuns următorilor parametri (astfel încât substanța uscată totală a preparatului lichid obținut să fie de aproximativ 13%, ceea ce corespunde minimului cerut de documentația tehnică pentru astfel de aplicații) (4,5,6):

- dimensiunea orificiului duzei de pulverizare: 1,0 mm;
- debitul pompei de aspirație: 95% Dt;
- debitul pompei peristaltice: 30% Dt;
- presiunea de azot: 4,5 bari;
- temperatura de intrare a aerului în uscător: 165°C ± 5°C;
- temperatura de ieșire a aerului din uscător: 72°C ± 3.



FIGURA 1. Instalația Buchi B290 Mini Spray Dryer

Examinat la microscopul electronic, preparatul microincapsulat obținut are majoritatea granulelor de formă sferică, formând unele aglomerări, dar menținându-și individualitatea și forma inițială. Dimensiunile particulelor în cazul preparatelor realizate variază între 5 μm și 35 μm. (Fig. 2). Viabilitatea probioticului în urma acestei operații de microincapsulare înregistrează o scădere de aproximativ 30 de ori. Preparatul inițial liofilizat conține $3,3 \times 10^{11}$ celule de bifidobacterii viabile per gram, preparatul obținut după microincapsulare conține 1×10^{10} celule viabile per gram de produs. Trebuie avut însă în vedere faptul că această scădere se datorează atât procesului tehnologic de uscare prin pulverizare, cât și creșterii cantității de excipient în preparatul final (prin adăugarea dextrinelor și alginatului) și a umidității acestui preparat (comparativ cu pulberea de bacterii liofilizate) (4).

Microcapsulele probiotice au fost adăugate în produsul lactat acid pe parcursul procesului tehnologic, înainte de etapa de termostatare a acestuia. Spre comparație, a fost realizat un produs lactat acid similar cu cultura probiotică (ce are în compoziția sa, pe lângă *Bifidus* HOWARU și *Lactobacillus bulgaricus*, și *Streptococcus thermophilus*). Acesta a avut rolul de produs „martor” în studii desfășurate.

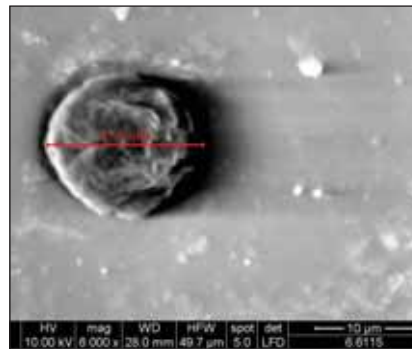


FIGURA 2. (Microscopie electronică SEM) Microcapsula Bifidobacterium HOWARU® în alginat de sodiu și dextrină

Cei 60 de pacienți din lotul de studiu sunt caracterizați din punct de vedere paraclinic (hemoleucogramă, VSH, CRP, AST, ALT, glicemie, creatinină, TSH +/- colonospie +/- biopsie, examen de scaun – coprocultură, coproparazitologic) la momentul T0 al studiului.

Folosind tehnica de biologie moleculară, probele de scaun au fost prelucrate pentru identificarea/cuantificarea organismelor probiotice la T0.

De asemenea, pacienții au fost evaluați din punctul de vedere al calității vieții (folosind chestionare SF36) și din punctul de vedere al sindromului

de intestin iritabil de care suferă (folosind chestionar IBS-QOL și scala Bristol). IBS-QOL este un instrument dezvoltat de către Donald L. Patrick și Douglas Drossman, de la Novartis Pharmaceuticals Corporation (SUA), special pentru aprecierea impactului subiectiv pe care îl provoacă SII și tratamentul acestuia asupra pacientului. În acest scop am obținut pentru studiul nostru varianta standardizată în limba română (7).

Prin randomizare, procedeu dublu-orb, pacienții au primit spre administrare produs probiotic în forma standard sau forma microincapsulată, aproximativ 570 g/zi (10^{10} UFC/g), pentru următoarea perioadă de 4 săptămâni. În prezent pacienții se află încă în perioada de tratament. Conform protocolului de studiu, ei vor fi re-evaluați *subiectiv* (folosind aceleași chestionare) la sfârșitul perioadei de 4 săptămâni de tratament și după încă 4 săptămâni de la terminarea acestuia.

Evaluarea *obiectivă* a efectului în studiul nostru se va baza pe cuantificarea *Bifidobacterium HOWARU®* în probele de scaun ale pacienților, folosind tehnica de biologie moleculară, la momentul T0, la sfârșitul celor 4 săptămâni de tratament și după încă 4 săptămâni de la terminarea acestuia.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele subiective (chestionarele IBS-QOL și SF36) și obiective (determinarea seriată a *Bifidobacterium HOWARU®* în probele de scaun) vor fi integrate folosind criteriile de semnificație statistică (SPSS Statistics). Până în prezent au fost prelucrate datele obținute din chestionarele completate de subiecți la T0 (evaluare *subiectivă*). Din chestionarele IBS-QOL a rezultat că 58% dintre pacienți percep

influența bolii lor asupra calității vieții ca fiind „moderată”, 11% ca fiind „severă” și restul (32%) ca fiind „ușoară” ($p < 0,01\%$). Procente asemănătoare am obținut și din evaluarea chestionarelor SF36; astfel 27% dintre pacienți au modificarea „ușoară” a indicelui de calitate a vieții, 60% au modificarea „medie” și 13% au modificarea „severă” a acestuia. Într-o etapă ulterioară se va urmări evoluția acestor indici și diferențierea după tratamentul cu produsul probiotic (standard și microincapsulat), la sfârșitul tratamentului și după încă 4 săptămâni.

Investigațiile privind identificarea, cuantificarea, viabilitatea și colonizarea probioticelor la nivelul florei intestinale reprezintă al doilea aspect al cercetării noastre și se vor baza pe folosirea tehnicii qPCR. În prezent s-a stabilit design-ul primerilor specifici pentru *Bifidobacterium HOWARU®* care va fi utilizat pentru testarea ADN-ului fecal la cele trei momente precizate în protocolul de studiu.

CONCLUZII

Rolul microflorei intestinale pentru menținerea calității vieții individului este foarte important, datele preliminare ale studiului nostru fiind în concordanță cu datele de literatură din acest punct de vedere. Contribuția disbiozei acestui ecosistem la declanșarea unor afecțiuni este deja acceptată, în literatură vorbindu-se despre microflora intestinală ca „organ funcțional” care poate fi influențat prin medicație. Sunt necesare în continuare studii clinice cu probiotice, în care efectul acestora să fie și *obiectivat*, iar efectele benefice – evaluare *subiectivă* – să fie corelate cu metode de identificare și cuantificare la locul de acțiune.

BIBLIOGRAFIE

1. Hungin A.P. et al. – The prevalence, patterns and impact of irritable bowel syndrome an international survey, *Aliment Pharmacol Ther*, 2003; 17:643- 650.
2. Whorwell P.J. et al. – „Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium Infantis* 35624 in women with IBS’ *Am J Gastroenterol*, 2006; 101:1581-1590
3. Fuller R. – 1992. Probiotics: The Scientific Basis, Chapman & Hall, London, p. 125
4. Vandamme T., Poncelet D., Subra-Paternault P. – 2007 Microencapsulation. Des Science aux Tehnologies, Lavoisier, Paris
5. Vilstrup P. – (editor), 2004, Microencapsulation of Food Ingredients, Leatherhead Food International, UK
6. Florea T., Dima St., Costin G.M. – 2009, Microincapsularea pentru sisteme alimentare, Ed. Academica, Galati
7. IBS-Qol questionnaire <http://www.mapi-trust.org/services/questionnairelicensing/cataloguequestionnaires/66-ibs-qol>
8. Martin H. Floch, Adam S. Kim – Probiotics – A Clinical Guide, 2010/ ISBN:978-1-55642-909-5
9. Duoglas A. – Drossman with editors, third edition, 2006-The Functional Gastrointestinal Disorders
10. Quigley E.M., Flourie B. – Probiotics and irritable bowel syndrome, a rationale for their use and an assesement of the evidence to date, *Neurogastroenterol motil*, 2007; 132:26-3
11. Camilleri M. – Probiotics and irritable bowel syndrome: rationale, putative mechanism, and evidence of clinical efficacy. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40:264-9
12. Sullivan A. – Nord CE Probiotics and gastrointestinal disease. *J Intern Med* 2005.257:78-92
13. Kajander K., Myllyluoma E., Rajilić-Stojanović M., Kyrönpalo S., Rasmussen M., Järvenpää S., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Vapaatalo H., Korpela R. – Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008;27:48–57
14. McFarland L.V., Dublin S. – Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(17):2650-2661.

15. **Ohland C., Macnaughton W.** – Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010; 298(6):G807–19
16. **Talley N.j.** – Functional gastrointestinal disorders as a public health problem. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20(suplim I)121-9
17. **Rey E., Garcia-Alonso M.O., Moreno-Ortega M., Alvarez-Sanchez A., Diaz-Rubio M.** – Determinants of quality of life in irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42:1003–1009
18. **Guyonnet D., Chassany O., Ducrotte P., Picard C., Mouret M., et al.** – Effect of a fermented milk containing *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26:475–486
19. **Whorwell P.J., Altringer L., Morel J., Bond Y., Charbonneau D., et al.** – Efficacy of an encapsulated probiotic *Bifidobacterium infantis* 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2006; 101:1581-1590
20. **Drouault-Holowacz S., Bieuvelet S., Burckel A., Cazaubiel M., Dray X., Marteau P.** – A double blind randomized controlled trial of a probiotic combination in 100 patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterol Clin Biol.* 2008; 32:147–152