



# In vitro testler sayesinde, ticari probiyotik suşlarının terapötik etkileri daha iyi anlaşılabilir

Paolo Pellegrino, Maria-Chiara Uboldi, Daniel Marquez ve Marcos III Perez

Bağırsak mikrobiyomu her insanda farklıdır ve sağlık üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Oral yoldan uygulanan probiyotikler gastrointestinal (GI) hastalıkların önlenmesi ve/veya tedavisinde kullanılmakta, ayrıca GI dışı hastalıkların tedavisinde de etki potansiyeli göstermektedir. In vitro çalışmalar, terapötik olarak kullanılan mikroorganizmaların biyolojik özelliklerinin ve in vivo olarak yaratabilecekleri olumlu etkilerin daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır.

İki in vitro çalışmada ticari preparatlardan izole edilen dokuz bilinen mikrobiyal suşun özellikleri test edilmiştir (bkz. **Tablo 1**) [1, 2]. Gastrointestinal kanalın karmaşıklığı nedeniyle, tekil in vitro sonuçlar fizyolojik etkileri kesin olarak açıklayamaz. Ancak klinik araştırmalar ve in vivo etkilerin anlaşılması için önemli bilgiler verirler.

## Probiyotikler ve simüle bağırsak sıvısındaki stabilite-leri

Araştırılan probiyotik suşlar olumlu etkilerini bağırsakta göstermektedir, bu nedenle hücrelerin simüle bağırsak koşulları altındaki stabilitesi önemlidir (bkz. **Tablo 1**). Farklı B. clausii suşlarının (Bacillus clausii OC, NR, SIN, T) simüle bağırsak sıvısında besin kaynakları olmadan hücre sayısındaki ilk düşüşten sonra çoğalma yetenekleri dikkat çekicidir (B. clausii SIN: t0'a kıyasla 2 saat sonra azalma [p < 0,05], 4 saate kıyasla 8 saatlik inkübasyondan sonra çoğalma [p < 0,05]). 8 saat sonrasında, t0'a kıyasla sadece 0,240-Log'luk hafif bir azalma görülmüştür. B. clausii ve B. coagulans'ın simüle bağırsak koşullarına toleransı, genellikle ticari ürünlerde bulunan spor oluşturmeyen suşlara kıyasla spor oluşturma yetenekleri göz önüne alındığında iyi doküman edilmiştir [1].

## Probiyotikler ve konak hücrelere bağlanmaları

Probiyotik mikroorganizmalar mukozal bağlanma bölgeleri için patojenlerle yarışabilir ve böylece patojenik organizmaların neden olduğu enfeksiyonları önleyebilir. Bu etki için gastrointestinal mukusa yapışmaları gereklidir. Mikropların domuz müsinleri içeren agar üzerinde inkübasyonu, bu bağlanma davranışını incelemek üzere kullanılan yerleşik bir yöntemdir. Müsin içeren agar plakaları ile negatif kontrol için müsin içermeyen agar plakaları bakteri süspansiyonu ile inoküle edilmiştir. Plakalar daha sonra hem aerobik

hem de anaerobik koşullar altında 37 °C'de inkübe edilerek inoküle edilen çukurcuk başına düşen hücre sayısı (CFU [koloni oluşturan birim]) belirlenmiştir. B. clausii, B. coagulans ve B. breve suşlarında, müsinlerin hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında inkübasyonundan sonra elde edilen CFU/çukurcuk sayısı negatif kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha yüksektir (p < 0,05 ila p < 0,001). L. reuteri sadece anaerobik koşullar altında (p < 0,001), S. boulardii ise sadece aerobik koşullar altında (p < 0,01) müsinlere yapışmıştır [1].

## Laktöz intoleransına karşı probiyotikler

Probiyotikler β-galaktosidaz gibi gıda parçalayıcı enzimler üretebilir ve bu da örneğin laktöz intoleransı olan kişilerde sindirim semptomlarını potansiyel olarak azaltarak sindirimi destekleyebilir. Tüm B. clausii suşları, B. coagulans, B. breve ve L. reuteri suşları negatif kontrole kıyasla önemli ölçüde daha fazla β-galaktosidaz üretebilmiştir (p < 0,01 ila p < 0,001) [1].

## Oksidatif stres için probiyotikler

Hücre içindeki çok sayıda metabolik süreç nedeniyle, reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi toksik etkilere neden olabilir. Katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidanlar üreten probiyotikler oksidatif stresi azaltmada faydalı olabilir. Test edilen tüm suşlar CAT ve SOD üretme yeteneği göstermiştir [1].

## Vitamin eksikliği için probiyotikler

Probiyotiklerin öncelikle bağırsak öbilyozunun sürdürülmesinde ve bazı eksiklik türlerinin giderilmesinde yardımcı olabilecek B vitaminleri ürettiği kanıtlanmıştır. Riboflavin (B2 vitamini) salgılama yeteneğine sahip probiyotik mi-

kroorganizmalar, konağın B2 vitamini eksikliğini telafi edebilir. Riboflavin eksikliği sıklıkla riboflavin açısından zengin ürünlerin bulunmadığı bir beslenme düzeninden kaynaklanmaktadır ve gelişmekte olan ülkelerde en yaygın vitamin eksikliğidir. *B. clausii*, *B. coagulans* ve *L. rhamnosus*, riboflavin üretebilmiştir (negatif kontrole kıyasla  $p < 0,001$ ) [1].

### Kısa zincirli yağ asitleri (KZYA) aracılığıyla fizyolojik dengiyi destekleyen probiyotikler

İnsan bağırsağındaki kompleks karbonhidratların mikrobiyal fermentasyonu sırasında KZYA üretilir. KZYA eksikliği ile çeşitli hastalıkların oluşumu arasındaki bağlantı ve KZYA eksikliğini önleyebilen probiyotik mikroorganizmaların iyileştirici etkileri doğrulanmıştır.

**Asetik asit:** Lipid metabolizmasının ve vücut ağırlığının düzenlenmesi.

Test edilen dokuz probiyotik suşun hepsi asetik asit salgılayabilmiştir [2].

**Propiyonik asit:** Bariyer fonksiyonunun yanı sıra bağırsak bütünlüğü, glikoz ve lipid homeostazının iyileştirilmesi.

Dört *B. clausii* suşu ile *S. boulardii*, propiyonik asit salgılamıştır. *B. coagulans*, *B. breve*, *L. reuteri* ve *L. rhamnosus* propiyonik asit salgılamamıştır [2].

**Butirik asit:** Bariyer fonksiyonunun yanı sıra bağırsak bütünlüğünün iyileştirilmesi, bağırsak epitel hücreleri için enerji kaynağı.

Tablo 1. Her bir mikrobiyal suşun in vitro özelliklerine genel bakış

Bakteriyel suş	Bağırsak sıvısında sağ kalım	Müsinlere bağlanma (aerobik)	Müsinlere bağlanma (anaerobik)	$\beta$ -galaktosidaz üretimi	Katalaz ve süperoksit dismutaz üretimi	Riboflavin üretimi	SCFA üretimi: Asetik asit	SCFA üretimi: Propiyonik asit	SCFA üretimi: Butirik asit
<i>Bacillus clausii</i> NR	+ <sup>1</sup>	+	+	+	+ <sup>4</sup>	+	+	+ <sup>6</sup>	+
<i>Bacillus clausii</i> OC	+ <sup>1</sup>	+	+	+	+ <sup>4</sup>	+	+	+ <sup>6</sup>	+
<i>Bacillus clausii</i> SIN	+ <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	+ <sup>6</sup>	+
<i>Bacillus clausii</i> T	+ <sup>1</sup>	+	+	+	+ <sup>4</sup>	+	++ <sup>5</sup>	++ <sup>6</sup>	+
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	+ <sup>1</sup>	+	+	+	+	+	+	–	–
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 16604	– <sup>1</sup>	+	+	+	+	–	+	–	–
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 17938	+ <sup>1</sup>	–	+	+	+	–	++ <sup>5</sup>	–	+
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	+ <sup>1</sup>	– <sup>2</sup>	– <sup>2</sup>	– <sup>3</sup>	+	+	+	–	–
<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM 1–745	+ <sup>1</sup>	+	–	– <sup>3</sup>	+	–	+	+ <sup>6</sup>	+

<sup>1</sup> *B. clausii* NR, OC, SIN ve T bakterisi suşlarının yanı sıra *B. coagulans*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* ve *S. cerevisiae* simüle bağırsak koşulları altında 480 dakikaya kadar sağ kalırken, *B. breve*'de 6 saat sonra hiçbir canlı hücre tespit edilememiştir.

<sup>2</sup> *L. rhamnosus* hem aerobik hem de anaerobik koşullar altında müsinlere bağlanamamıştır (sırasıyla  $p < 0,01$  ve  $p < 0,001$ ).

<sup>3</sup> *L. rhamnosus* ve *S. boulardii*  $\beta$ -galaktosidaz üretmemiştir.

<sup>4</sup> *B. clausii* OC, NR ve T'ye kıyasla daha yüksek SOD aktivitesi göstermiştir (sırasıyla  $p < 0,01$  ve  $p < 0,05$ ).

<sup>5</sup> *B. clausii* T ve *L. reuteri* en yüksek asetik asit üreten suşlardı.

<sup>6</sup> *B. clausii*, *B. clausii* NR ( $p = 0,0374$ ), *B. clausii* SIN ( $p = 0,0112$ ) ve *S. boulardii*'den ( $p = 0,0007$ ) önemli ölçüde farklılık göstererek en yüksek propiyonik asit konsantrasyonlarını üretmiştir.

Dört *B. clausii* suşu benzer salgılama özelliği göstermiştir, bu da *L. reuteri* ve *S. boulardii* suşlarının salgılamasından yüksektir [2].

uygulanmasını mümkün kılabilir. Buna bağlı olarak gelecekte yapılacak çalışmalar, hastaların yararına hangi potansiyel terapötik alanlardan daha fazla yararlanılabileceğini netleştirebilir.

### Özet

Probiyotik mekanizmaların daha iyi anlaşılması, mikrobiyotaya temelli tedavilerin hastalara daha seçici bir şekilde

## Literatür

1. Mazzantini D, Calvigioni M, Celandroni F, Lupetti A, Ghelardi E. In vitro assessment of probiotic attributes for strains contained in commercial formulations. *Sci Rep.* 2022 Dec 14;12(1):21640. doi: 10.1038/s41598-022-25688-z. PMID: 36517529; PMCID: PMC9751119.
2. Calvigioni M, Bertolini A, Codini S, Mazzantini D, Panattoni A, Masimino M, Celandroni F, Zucchi R, Saba A, Ghelardi E. HPLC-MS-MS quantification of short-chain fatty acids actively secreted by probiotic strains. *Front Microbiol.* 2023 Mar 3;14:1124144. doi: 10.3389/fmicb.2023.1124144. PMID: 36937254; PMCID: PMC10020375.

Çıkar çatışması: P. Pellegrino, M. C. Ubaldi ve M. III Perez Sanofi çalışanlarıdır. D. Marquez makale gönderimi sırasında Sanofi çalışanı, makalenin kabulü ve yayınlanması sırasında ise Boehringer Ingelheim çalışanıdır.

Açıklamalar: Tıbbi Yazım ve yayın Sanofi tarafından finanse edilmiştir.

## Yazı ile ilgili bilgiler:

Gönderim tarihi: 21.09.2023

Kabul tarihi: 09.02.2024

Yayınlanma tarihi: 11.03.2024