

Η δράση των προβιοτικών στο βλεννογόνο εντερικό φραγμό

Γ. Μεταξάς,
Κ. Κοτζάμπαση,
Δ. Παραμυθιώτης,
Α. Ζαταγιάς,
Ε. Ελευθεριάδης

Α΄ Προπαιδευτική Χειρουργική Κλινική,
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο
Θεσσαλονίκης

The influence of probiotics
on bacterial translocation

Abstract at the end of the article

ΣΚΟΠΟΣ Τα προβιοτικά είναι μη παθογόνα βακτήρια, τα οποία ασκούν θετική επίδραση στη φυσιολογία και την υγεία του οργανισμού: τροποποιούν την εντερική μικροχλωρίδα, προλαμβάνουν την προσκόλληση των παθογόνων μικροβίων, παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες και διεγείρουν την ανοσιακή άμυνα του ξενιστή. Επειδή η εντερική χλωρίδα και ο βλεννογόμος φραγμός συνιστούν τις δύο βασικές δομές, τις υπεύθυνες για το φαινόμενο της βακτηριακής μετακίνησης, επιχειρήθηκε η διερεύνηση του κατά πόσο η προληπτική χορήγηση προβιοτικών ενισχύει το βλεννογόνο εντερικό φραγμό και εμποδίζει τη βακτηριακή μετακίνηση από άσηπτη περιτονίτιδα με Zymosan σε επίμους. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Χρησιμοποιήθηκαν 80 επίμους (4 ομάδες), οι οποίοι έλαβαν από του στόματος προβιοτικά ή placebo και ενδοπεριτοναϊκά Zymosan ή placebo. Ως προβιοτικό χορηγήθηκε *Lactobacillus reuteri* (1×10^7 CFU/ημέρα) επί 5 ημέρες, στο πόσιμο νερό. Η περιτονίτιδα προκλήθηκε με Zymosan ενδοπεριτοναϊκά (500 mg/kg βάρους σώματος) 18 ώρες πριν από τη θυσία των πειραματοζώων. Αξιολογήθηκαν η μικροκυκλοφορία στον εντερικό βλεννογόνο (LASER Doppler) και το πάχος της προσκολλημένης στον εντερικό βλεννογόνο βλήννας (μικροσκόπηση σε άμεσο παρασκεύασμα), ως στοιχεία του βλεννογόνιου εντερικού φραγμού, και η βακτηριακή μετακίνηση προς τους μεσεντέριους λεμφαδένες (ποσοτική εκτίμηση των αναπτυχθεισών αποικιών/g ιστού), ως το αποτέλεσμα της δράσης των προβιοτικών. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της μικροκυκλοφορίας και του πάχους βλήννας και αύξηση της βακτηριακής μετακίνησης στις ομάδες που έλαβαν Zymosan, σε σχέση με τους υγιείς. Οι μεταβολές όμως αυτές ήταν πολύ σημαντικά μικρότερες στην ομάδα που έλαβε και προβιοτικά σε σχέση με αυτή που δεν έλαβε. Επίσης, το προβιοτικό, χορηγούμενο στους υγιείς, αύξησε σημαντικά τη μικροκυκλοφορία και το πάχος βλήννας και μείωσε ακόμη περισσότερο την ήδη πολύ μικρή βακτηριακή μετακίνηση σε σχέση με τους υγιείς. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Στο μοντέλο επίμους με άσηπτη περιτονίτιδα, η προληπτική χορήγηση του *L. reuteri* προάγει τον εντερικό αμυντικό φραγμό, βελτιώνοντας την ισορροπία της εντερικής χλωρίδας και αυξάνοντας τη μικροκυκλοφορία του βλεννογόνου καθώς και το πάχος της προσκολλημένης βλήννας, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της βακτηριακής μετακίνησης.

Λέξεις ευρετηρίου

Βακτηριακή μετακίνηση
Βλεννογόμος εντερικός φραγμός
Μικροκυκλοφορία
Πάχος βλήννας
Περιτονίτιδα, άσηπτη
Προβιοτικά
Zymosan

Επαινος
Επαθλο «Σ. Παπασταμάτης» 2002

Η διατήρηση της ενδογενούς ικανότητας του εντερικού βλεννογόνου να παρεμποδίζει την έξοδο βακτηρίων από αυτόν προϋποθέτει ισορροπία στη φυσιολογική εντερική χλωρίδα, ακέραιο εντερικό επιθήλιο και βλεννογόνο, καλή κινητικότητα του εντέρου και καλή λειτουργία του ανοσιακού συστήματός του.¹ Επειδή πολλές καταστάσεις, όπως το τραύμα, η φλεγμονή, η υποξία, η ασσιτία, αλλά και η παρεντερική σίτιση, προκαλούν βακτηριακή μετακίνηση, έχουν γίνει κατά καιρούς ποικί-

λες προσπάθειες για την υποστήριξη ή την αποκατάσταση της δυσλειτουργίας των ανωτέρω μηχανισμών, με σκοπό την πρόληψή της.

Τα τελευταία χρόνια γίνεται εκτεταμένη έρευνα, κυρίως πειραματική, για το ρόλο των προβιοτικών στη διατήρηση ή την αποκατάσταση της διαταραγμένης ισορροπίας της εντερικής χλωρίδας, την οποία προκαλούν διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Τα προβιοτικά είναι μη

παθογόνα βακτήρια, τα οποία, όταν χορηγηθούν από του στόματος, θεωρείται ότι έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την εντερική μικροχλωρίδα, να ανταγωνίζονται τα παθογόνα βακτήρια, να παράγουν αντιμικροβιακές ουσίες και να διεγείρουν την ανοσιακή άμυνα του ξενιστή.²⁻⁶

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η έρευνα του ρόλου των προβιοτικών, όταν χορηγηθούν προληπτικά, στο βλεννογόνο εντερικό φραγμό σε ένα μοντέλο άσπτης περιτονίτιδας από Zymosan σε επίμυες. Ως στοιχεία του βλεννογόνιου εντερικού φραγμού μελετήθηκαν η μικροκυκλοφορία του εντερικού βλεννογόνου και το πάχος του στρώματος της προσκολλημένης σε αυτόν βλέννας, ενώ το αποτέλεσμα της δράσης των προβιοτικών στα στοιχεία αυτά εκτιμήθηκε με την ύπαρξη μετακίνησης βακτηρίων στους μεσεντέριους λεμφαδένες.

ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν 80 άρρενες έφηβοι επίμυες Wistar, σωματικού βάρους 220±12 g, οι οποίοι ζούσαν υπό τις ίδιες συνθήκες τυποποιημένης διατροφής (ΕΛΒΥΖ, Πλατύ Ημαθίας) και εναλλαγής φωτός/σκότους από τη γέννησή τους. Μία εβδομάδα πριν από την έναρξη του πειράματος, τα πειραματόζωα τοποθετήθηκαν σε κλουβιά ανά ένα, ώστε, στη συνέχεια, να είναι απόλυτα ελεγχόμενη η χορήγηση του προβιοτικού. Όλοι οι χειρισμοί, που ακολούθησαν, έγιναν σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Κοινότητας για τη χρήση και το χειρισμό των πειραματόζωων.

Χορήγηση προβιοτικών

Ως προβιοτικό χρησιμοποιήθηκε ο *Lactobacillus reuteri*. Το ανθρώπινο στέλεχος SD2112 είναι εμπορικά διαθέσιμο στο εξωτερικό από την BioGaia (Sweden) σε φακελίσκους, που περιέχουν 10⁸ βακτήρια σε 2,5 g ινουλίνης, ως μία ημερήσια δόση για τον άνθρωπο. Στην προκειμένη περίπτωση χορηγήθηκαν 10⁷ βακτήρια ημερησίως ανά πειραματόζωο, δηλαδή ένας φακελίσκος σε 10 πειραματόζωα. Η τακτική αυτή ακολουθήθηκε, γιατί βιβλιογραφικά υπάρχει η τάση να δίνονται υψηλές συγκεντρώσεις βακτηρίων στα πειραματόζωα.^{5,7-9} Η δόση αυτή, ανά πειραματόζωο, προστέθηκε σε 10 mL πόσιμου νερού, το οποίο χορηγήθηκε σε 7-10 ώρες και στη συνέχεια δόθηκε καθαρό νερό σε ελεύθερη ποσότητα. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίστηκε η λήψη όλης της ποσότητας, χωρίς να απαιτηθεί η στρεσογόνος διαδικασία της χορήγησής της με καθετήρα στο στόμαχο. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για 5 ημέρες, ενώ οι μάρτυρες ελάμβαναν καθαρό νερό με τον ίδιο τρόπο.

Πρόκληση άσπτης περιτονίτιδας

Άσπτη περιτονίτιδα προκλήθηκε με ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση διαλύματος Zymosan (Sigma Chemicals, St Louis, MO) 500 mg/kg βάρους σώματος σε 10 mL φυσιολογικού ορού.^{10,11} Με την τεχνική αυτή προκαλείται μη βακτηριακή, μη ενδοτοξινική περιτοναϊκή φλεγμονή, με υψηλά ποσοστά μετακίνησης βακτηρίων προς τους μεσεντέριους λεμφαδένες από τη 2η ώρα, και τελική κατάληξη την πολυοργανική ανεπάρκεια.¹⁰⁻¹²

Πειραματική διάταξη

Μετά το πέρας των 5 ημερών χορήγησης του προβιοτικού ή μόνο πόσιμου νερού, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση Zymosan ή μόνο φυσιολογικού ορού. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν 4 ομάδες μελέτης (πίν. 1). Κάθε ομάδα περιελάμβανε 20 επίμυες. Δεκαοκτώ ώρες αργότερα, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε αναισθησία (Ketalar, 50 mg/kg βάρους σώματος, ενδομυϊκά) και λαπαροτομία με άσπτες συνθήκες για την πραγματοποίηση των μετρήσεων των παραμέτρων της μελέτης.

Παράμετροι μελέτης

Σε 10 πειραματόζωα, από κάθε ομάδα, μελετήθηκε η μικροκυκλοφορία στον εντερικό βλεννογόνο και το πάχος της προσκολλημένης σε αυτόν βλέννας, ενώ στα υπόλοιπα 10 η βακτηριακή μετακίνηση στους μεσεντέριους λεμφαδένες.

Μικροκυκλοφορία εντερικού βλεννογόνου. Η μέτρηση της βλεννογόνιας μικροκυκλοφορίας επιτεύχθηκε με το LASER-Doppler αιματοαχόμετρο Periflux PF2B (Perimed Sweden). Οι μετρήσεις έγιναν σε συχνότητα 4 kHz και χρονική διακριτική ικανότητα 0,2 sec και εκφράστηκαν σε σχετικές μονάδες ροής. Το αιματοαχόμετρο συνδέθηκε μέσω ενός A/D μετατροπέα (DT2801 series, DATA Translation Marlboro, MA) με υπολογιστή, στον οποίο έτρεχε το λογισμικό Perisoft (Perimed, Sweden) για την αποθήκευση των δεδομένων της μικροκυκλοφορίας, την ανάλυση και τη στατιστική τους επεξεργασία.

Ως αισθητήρας χρησιμοποιήθηκε η μονή οπτική ίνα PF319 διαμέτρου 0,5 mm και μήκους 70 mm, η οποία έχει την ικανότητα μεταφοράς ενός πολύ σταθερού οπτικού σήματος. Η ίνα αυτή τοποθετήθηκε, μετά από λαπαροτομία, ενδοαυδικά

Πίνακας 1. Ομάδες μελέτης.

Από το στόμα	Ενδοπεριτοναϊκά	Ομάδα
<i>Lactobacillus</i>	+ Zymosan	LZ
<i>Lactobacillus</i>	+ Placebo	Lp
Placebo	+ Zymosan	pZ
Placebo	+ Placebo	pp

σε μια εντερική έλικα και η άλλη άκρη της εξήλθε από το κοιλιακό τοίχωμα και προσαρμόστηκε στο δεύτερο τμήμα του αισθητήρα (master-probe PF318), το οποίο συνδέθηκε με το αιματοταχύμετρο. Μετά από μια περίοδο πρεμίας 10 min έγινε μια μέτρηση διάρκειας 2 min περίπου.

Πάχος προσκολλημένου στρώματος βλέννας. Μετά τη μέτρηση της μικροκυκλοφορίας, αφαιρέθηκε το λεπτό έντερο και διανοίχθηκε κατά μήκος του αντιμεσεντερικού του χείλους. Το περιεχόμενο του εκπλύθηκε ήπια με διάλυμα φυσιολογικού ορού και από διάφορα ύψη κόπηκαν κατά τον επιμήκη του άξονα 5 συνολικά λωρίδες πλάτους 1 mm και μήκους 30 mm περίπου. Στη συνέχεια, τα ιστοτεμάχια τοποθετήθηκαν σε πλάγια θέση σε αντικειμενοφόρο πλάκα και καλύφθηκαν με διάλυμα 0,15 M NaCl, ώστε να αποφευχθεί η αφυδάτωση του ιστού. Η μικροσκοπήσή τους έγινε αμέσως σε μεγέθυνση 125× και χρησιμοποιήθηκε προσοφθάλμιος φακός με μικρομετρική κλίμακα. Η μέτρηση του πάχους της βλέννας έγινε ανά 4 mm περίπου κατά μήκος της λωρίδας του ιστού και το μέσο πάχος της εντερικής βλέννας ανά πειραματόζωο υπολογίστηκε από 40 τέτοιες μετρήσεις (8 μετρήσεις × 5 λωρίδες). Ο χρόνος που διέρρευσε από την αφαίρεση του εντέρου μέχρι τη μέτρηση ήταν μικρότερος από 10 min. Όλη η τεχνική αποτελεί τροποποίηση αυτής των Sandzen et al.¹³

Βακτηριακή μετακίνηση. Με σχολαστικά άσπτες συνθήκες αφαιρέθηκε ολόκληρο το μεσεντέριο και πριν από την τοποθέτησή του σε προζυγισμένα τρυβλία εκπλύθηκε με στείρο διάλυμα φυσιολογικού ορού. Στη συνέχεια, ομογενοποιήθηκε με στείρες συνθήκες σε ειδικά πλαστικά σακίδια (Stomacher, Lab-Blender 80) με την προσθήκη φυσιολογικού ορού. Η ομογενοποιημένη μάζα των οργάνων αραιώθηκε 1:3 και από κάθε αραιώση ελήφθη ποσότητα 0,05 mL και έγινε σπορά, σε διπλή σειρά, για κάθε υπόστρωμα MacConkey και αιματούχου άγαρ. Επίσης, έγινε σπορά ολόκληρης της ομογενοποιημένης μάζας σε όμοια με τα ανωτέρω υποστρώματα σε ποσότητα 0,3 mL ανά τρυβλίο.¹⁴ Η ταυτοποίηση των αποικιών της *Escherichia coli* έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφεται από τη MacFaddin.¹⁵ Μετά από 48 ώρες επώαση, έγινε καταμέτρηση των αναπτυχθεισών αποικιών (CFU) και αναγωγή του αριθμού τους ανά γραμμάριο εξετασθέντος υλικού.

Παράλληλα, έγινε και ταυτοποίηση των βακτηρίων του τυφλού, από δείγματα που ελήφθησαν πριν από τη θανάτωση των πειραματοζώων με υπερδοσολογία αναισθητικού.

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι αναφερόμενες τιμές εκφράζονται ως μέσες τιμές ±SD. Η στατιστική τους επεξεργασία έγινε σε ηλεκτρονικό υπολογιστή Macintosh, με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου Stat-View (Brain Power Inc, Calabasas, CA), με τη μέθοδο της ανάλυσης της μεταβλητότητας για επαναλαμβανόμενες μετρήσεις (analysis of variance for repeated measurements). Η διαφορά θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική για τιμές P μικρότερες του 0,05.

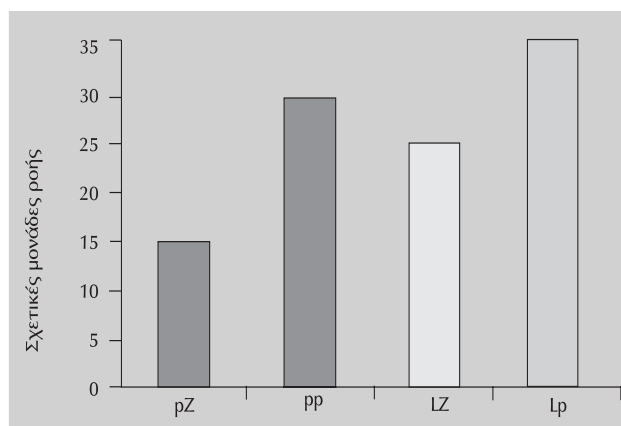
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Μικροκυκλοφορία εντερικού βλεννογόνου. Η μέτρηση της βλεννογονίας μικροκυκλοφορίας με LASER Doppler (σε σχετικές μονάδες ροής) έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση ($P=0,0001$) στις ομάδες με άσπτη περιτονίτιδα, είτε είχαν λάβει (LZ, $24,3 \pm 3,33$) είτε όχι (pZ, $17,1 \pm 3,24$) προβιοτικά, σε σχέση με την ομάδα pp (δηλαδή, όχι προβιοτικά-όχι Zymosan, $31,2 \pm 2,61$) (πίν. 2). Ωστόσο, υπήρξε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά ($P=0,0001$) μεταξύ των ομάδων LZ και pZ, όπως και μεταξύ των μαρτύρων που έλαβαν (Lp, $34,8 \pm 1,61$) ή δεν έλαβαν (pp) προβιοτικά ($P=0,015$). Αυτό σημαίνει ότι ο *L. reuteri* αυξάνει τόσο πολύ τη μικροκυκλοφορία, ώστε ακόμη και όταν αυτή μειωθεί λόγω περιτονίτιδας να παραμένει αρκετά υψηλή, προκειμένου να μην ισχαιμεί ο εντερικός βλεννογόνος (εικ. 1).

Πάχος προσκολλημένου στρώματος βλέννας. Η μέτρηση του πάχους της προσκολλημένης στον εντερικό βλεννογόνο βλέννας (σε μm) έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση ($P=0,0001$) στις ομάδες με άσπτη περιτονίτιδα, είτε έλαβαν (LZ, $85 \pm 3,74$) είτε όχι (pZ, $65,5 \pm 3,59$) προβιοτικά, σε σχέση με την ομάδα pp (όχι προβιοτικά-όχι Zymosan, $113,2 \pm 3,26$) (πίν. 3). Στις ομάδες αυτές (LZ και pZ) παρατηρήθηκε, εκτός από τη μεί-

Πίνακας 2. Μικροκυκλοφορία εντερικού βλεννογόνου

Ομάδες	Σχετικές μονάδες ροής
pZ	$17,1 \pm 3,24$
pp	$31,2 \pm 2,61$
LZ	$24,3 \pm 3,33$
Lp	$34,8 \pm 1,61$



Εικόνα 1. Μικροκυκλοφορία εντερικού βλεννογόνου.

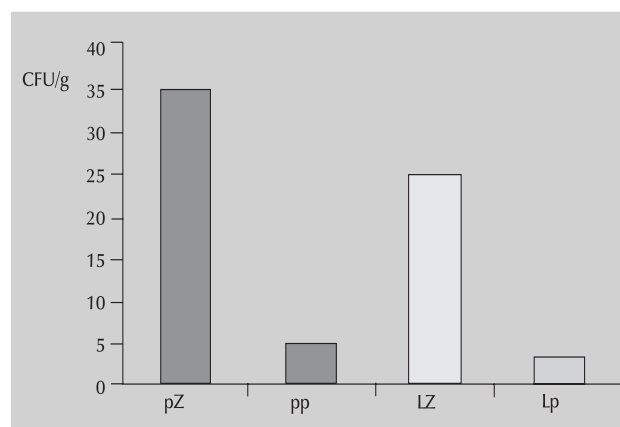
ωση του πάχους, και κατακερματισμός της στιβάδας της βλέννας, που ήταν σαφώς πιο έντονος στην ομάδα pZ. Ωστόσο, υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά (P=0,0001) μεταξύ των ομάδων LZ και pZ, όπως επίσης και μεταξύ των μαρτύρων που έλαβαν (Lp, 122,6±4,92) ή δεν έλαβαν (pp) προβιοτικά (P=0,001). Αυτό και πάλι σημαίνει ότι ο *L. reuteri* αυξάνει τόσο πολύ το πάχος της προσκολλημένης βλέννας, ώστε ακόμη και όταν αυτή μειωθεί και κατακερματιστεί λόγω περιτονίτιδας, να παραμένει σε ικανό πάχος, ώστε να παρέχει προστασία στο βλεννογόνο (εικ. 2).

Βακτηριακή μετακίνηση. Η ταυτοποίηση των βακτηρίων του τυφλού έδειξε ότι η φυσιολογική χλωρίδα του επίμους περιλαμβάνει *E. coli*, εντεροκόκκους, βακτηριοειδή, *Enterobacter cloacae* και *Bacillus cereus*. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των βακτηρίων *E. coli* (σε CFU/g ιστού), που μετακινήθηκαν στους μεσεντέριους λεμφαδένες, ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος (P=0,0001) στις ομάδες που υπέστησαν άσπτη περιτονίτιδα, είτε είχαν λάβει προβιοτικά (LZ, 27,5±3,97) είτε όχι (pZ, 36,6±5,89), σε σχέση με την ομάδα pp (όχι προβιοτικά-όχι Zymosan, 5,7±2,83) (πίν 4). Ωστόσο, υπήρξε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά (P=0,001) μεταξύ των ομάδων LZ και pZ, όπως και μεταξύ των μαρτύρων που έλαβαν (Lp, 3,5±1,26) ή δεν έλαβαν

(pp) προβιοτικά (P=0,0001). Φαίνεται, δηλαδή, ότι ο *L. reuteri* ουσιαστικά ομαλοποιεί την εντερική χλωρίδα, ώστε σε καταστάσεις που θα ευνοούσαν τη μετακίνηση βακτηρίων προς τους μεσεντέριους λεμφαδένες, η μετακίνηση αυτή να είναι μικρότερης κλίμακας (εικ. 3).

Πίνακας 4. Βακτηριακή μετακίνηση.

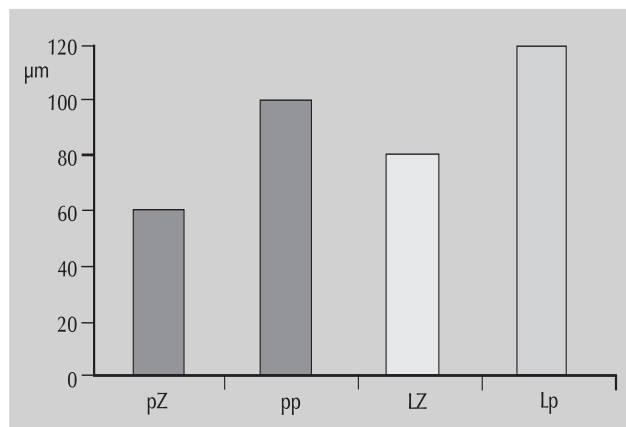
Ομάδες	
pZ	36,6 ± 5,89
pp	5,7 ± 2,83
LZ	27,5 ± 3,97
Lp	3,5 ± 1,26



Εικόνα 3. Βακτηριακή μετακίνηση.

Πίνακας 3. Πάχος βλέννας.

Ομάδες	
pZ	65,5 ± 3,59
pp	113,2 ± 3,26
LZ	85,0 ± 3,74
Lp	122,6 ± 4,92



Εικόνα 2. Πάχος βλέννας.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα διάφορα είδη των λακτοβακίλων αποτελούν σημαντικά συστατικά της φυσιολογικής εντερικής χλωρίδας.¹⁶ Είναι γνωστό ότι εκκρίνουν *in vitro* αντιμικροβιακούς παράγοντες, που αναστέλλουν τα δυνητικά παθογόνα μικρόβια, όπως τη σαλμονέλα, το κλωστηρίδιο και στελέχη του *E. coli*,^{3,4,17} και γι' αυτό έχουν δοκιμαστεί ως συμπληρωματική θεραπεία για την αντιμετώπιση της οξείας διάρροιας των παιδιών, των ταξιδιωτών και τη μετά χρήση αντιβιοτικών.¹⁸⁻²¹

Ο *Lactobacillus reuteri*, κορηγούμενος σε επίμους, φάνηκε αφενός να μειώνει τη βαρύτητα της κολίτιδας από ακετοξικό οξύ²² και μεθοτρεξάτη⁹ και αφετέρου να ελαττώνει τη βακτηριακή μετακίνηση και τα επίπεδα της ενδοτοξίνης στο πλάσμα, στο μοντέλο αυτό.⁹ Ακόμη, βρέθηκε ότι μπορεί να αυξήσει την IgA στο έντερο, η οποία αποτελεί σημαντικό παράγοντα της βλεννογονίας

άμυνας,^{9,23} ενώ έχει την ικανότητα να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο και να αναπτύσσει αποικίες.²⁴

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το εμπορικά διαθέσιμο στέλεχος του *L. reuteri* SD2112, που προήλθε από μια θηλάζουσα Περουβιανή των Άνδεων και δεν έχει υποστεί γενετική τροποποίηση. Σε κλινική δοκιμή φάνηκε ότι, επιπλέον, καταστέλλει και το *Staphylococcus aureus*, ενισχύοντας την άμυνα του οργανισμού και προστατεύοντας τους βλεννογόνους.²⁵

Η εντερική βλέννα, και μάλιστα αυτή που είναι προσκολλημένη στο βλεννογόνο, θεωρείται ένας από τους σημαντικότερους αμυντικούς παράγοντες που συνιστούν το βλεννογόνο εντερικό φραγμό, αφού δεσμεύει τα παθογόνα βακτήρια και έτσι παρεμποδίζει την προσκόλλησή τους στα επιθηλιακά κύτταρα, διαδικασία απαραίτητη για τη διείσδυση και μετακίνησή τους στα διάφορα όργανα.²⁶⁻²⁸ Από την άλλη πλευρά, είναι πλέον ευρέως αποδεκτό ότι η μείωση της προσφοράς αίματος στις κορυφές των εντερικών λαχνών, φαινόμενο που συμβαίνει πολύ εύκολα λόγω της ιδιόμορφης κατασκευής του τριχοειδικού αγγειακού πλέγματός τους, οδηγεί, άμεσα, σε βλάβη των επιθηλιακών κυττάρων, διάσπαση των στερών συνδέσεων μεταξύ τους και βακτηριακή μετακίνηση.^{13,29} Για το λόγο αυτό, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήσαμε τις παραμέτρους πάχος της προσκολλημένης στον εντερικό βλεννογόνο βλέννας και μικροκυκλοφορία ως δύο πρωτεύοντα στοιχεία της ακεραιότητας του βλεννογόνιου εντερικού φραγμού, ενώ το αποτέλεσμα της προληπτικής δράσης του *L. reuteri* εκτιμήθηκε, ποσοτικά, με τη διαπίστωση μετακίνησης βακτηρίων στους μεσεντέριους λεμφαδένες.

Στο πειραματικό μοντέλο άσηπτης περιτονίτιδας, που χρησιμοποιήθηκε, επιβεβαιώθηκε η βακτηριακή μετακίνηση στην ομάδα που έλαβε Zymosan (pZ), σε σχέση με τους μάρτυρες, (pp). Όπως και βιβλιογραφικά αναφέρεται, η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση του Zymosan οδηγεί σε άσηπτη φλεγμονή, με συστηματική υπόταση, υψηλές συγκεντρώσεις NO στο περιτόναιο και το πλάσμα, παραγωγή εξιδρώματος, αύξηση της δραστηριότητας της κυκλο-οξυγενάσης,³⁰ ενεργοποίηση των πολυμορφοκυττάρων και παραγωγή ελευθέρων ριζών, καθώς και λιπιδική υπεροξειδωση στο πλάσμα, το έντερο και τους πνεύμονες,³¹ φαινόμενα που προκαλούν μετακίνηση βακτηρίων από τη 2η ώρα στο 90% των μεσεντέριων λεμφαδένων και πολυοργανική ανεπάρκεια σε 18 ώρες.¹⁰⁻¹²

Η προληπτική χορήγηση του *L. reuteri*, επί 5ημέρο, φάνηκε ότι μείωσε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των μετακινηθέντων βακτηρίων στην ομάδα LZ έναντι της

ομάδας pZ, όπως συνέβη και με άλλα στελέχη, σε διαφορετικά πειραματικά μοντέλα.^{3,32} Η μείωση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί, εκτός των άλλων, βιβλιογραφικά αναφερομένων, και στην ενίσχυση του βλεννογόνιου εντερικού φραγμού, με την παραγωγή βλεννών. Οι βλέννες, ως γνωστό, είναι γλυκοπρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους, που εκκρίνονται από τα επιθηλιακά κύτταρα²⁶ και αφενός προάγουν τον αποικισμό των βακτηρίων προσφερόμενες ως θρεπτικό υπόστρωμα και θέση στήριξης γι' αυτά και αφετέρου παρεμποδίζουν την άμεση προσκόλλησή τους στο επιθήλιο.²⁷ Σύμφωνα με τις πρόσφατες *in vitro* μελέτες των Mack et al,³³ η προσκόλληση των βακτηρίων πιστεύεται ότι γίνεται μέσω σχηματισμού δεσμών με την υπάρχουσα βλέννα. Όπως φάνηκε σε κυτταροκαλλιέργειες, τα προβιοτικά προάγουν την παραγωγή βλέννας, ωθώντας τα εντεροκύτταρα να επάγουν μεγαλύτερες ποσότητες mRNA, κυρίως της MUC3 βλεννίνης, η οποία κυριαρχεί στο λεπτό έντερο. Η υπερπαραγόμενη βλέννα μπορεί να προλάβει την προσκόλληση των εντεροπαθογόνων, είτε δρώντας ως στερεό εμπόδιο, είτε μέσω μηχανισμών ανταγωνιστικής αναστολής των σημείων προσκόλλησής τους πάνω στη βλέννα,²² η οποία μιμείται, μορφολογικά, τα σημεία υποδοχής και προσκόλλησης των βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα.³²⁻³⁴

Αυτά τα *in vitro* και *ex vivo* ευρήματα επιβεβαιώθηκαν και στην παρούσα μελέτη. Έτσι, βρέθηκε ότι στην ομάδα που έλαβε προληπτικά *L. reuteri* αυξήθηκε σημαντικά το πάχος του στρώματος της προσκολλημένης στον εντερικό βλεννογόνο βλέννας, όπως αυτό υπολογίστηκε με την καθιερωμένη τεχνική της μικροσκοπικής άμεσου παρασκευάσματος.^{15,35} Παρά δε τη διαπίστωση σημαντικής μείωσης και κατακερματισμού της βλέννας σε αρκετά σημεία του εντερικού βλεννογόνου, στις ομάδες LZ και pZ (περιτονίτιδα με ή χωρίς προφύλαξη με *L. reuteri*), στην ομάδα με προφύλαξη (LZ) το πάχος της βλέννας ήταν στατιστικά μεγαλύτερο απ' ό,τι στην ομάδα pZ, αν και μικρότερο απ' ό,τι στην ομάδα ελέγχου (Lp). Αυτό σημαίνει ότι ο *L. reuteri* αυξάνει τόσο την προσκολλημένη βλέννα, ώστε ακόμη και αν αυτή καταστραφεί από κάποιο βλαπτικό παράγοντα, να παραμένει αρκετή για τη διατήρηση της ακεραιότητας του εντερικού φραγμού.

Στο πειραματικό μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε, η χορήγηση Zymosan οδήγησε και σε εντερική ισχαιμία, η οποία αφεαυτής διευκολύνει τη βακτηριακή μετακίνηση, πέρα από οποιονδήποτε άλλο χυμικό μηχανισμό πρόκλησής της, λόγω της άσηπτης φλεγμονής. Η εντερική αυτή ισχαιμία θα μπορούσε να ερμηνεύσει και τη μειω-

μένη ποσότητα βλέννας στην ομάδα pZ. Αντίθετα, στην ομάδα Lp, όπου χορηγήθηκε ο *L. reuteri* ως προληπτική αγωγή, υπήρξε σημαντική αύξηση της μικροκυκλοφορίας στον εντερικό βλεννογόνο σε σχέση με την ομάδα pp, ενώ στην ομάδα LZ οι τιμές ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερες σε σχέση με την ομάδα pZ. Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι στα πειραματόζωα που λαμβάνουν *L. reuteri* υπάρχει μια σημαντική αύξηση της μικροκυκλοφορίας, η οποία, προφανώς, συνδέεται και με την ανάλογη αύξηση της βλέννας. Το εύρημα αυτό της αύξησης της μικροκυκλοφορίας είναι συμβατό με τη γνώση ότι κάποια είδη λακτοβακίλλου καταβολίζουν την αργινίνη των τροφών προς κιτρουλίνη με παραγωγή NO,³ που αποτελεί γνωστό ρυθμιστή του αγγειακού τόνου στον πεπτικό σωλήνα, αλλά και προαγωγό της βλεννογόνιας άμυνας, αφού μεταξύ των δράσεών του συμπεριλαμβάνονται η αύξηση της βλενωδούς έκκρισης από τα κύτταρα του επιθηλίου και η αγγειοδιαστολή, σε επίπεδο τριχοειδών, στο βλεννογόνο.^{36,37}

Κατά τον Bengmark,²³ οι προσκολλημένοι στην εντερική βλέννα λακτοβάκιλλοι παράγουν NO, τοπικά, επί του βλεννογόνου, το οποίο δρα άμεσα και εξουδετερώνει την ενδοτοξίνη που εκλύεται από την *E. coli* του εντερικού περιεχομένου. Αυτή η τοπική παραγωγή ερμηνεύει και την επάρκεια δράσης του, αν και έχει βραχύ χρόνο ημίσειας ζωής. Παρά την εκτενή έρευνα σχετικά

με το NO, υπάρχουν ακόμη κενά και αντικρουόμενες απόψεις. Έτσι, οι Holma et al²² υποστηρίζουν ότι κάποια στελέχη λακτοβακίλων μειώνουν την υπέρμετρη παραγωγή NO που προκαλείται από τα κύτταρα του περιτοναίου, αλλά και του πάσχοντος εντέρου, σε πειραματική κολίτιδα, μέσω μηχανισμού μείωσης της παραγωγής της iNOs πρωτεΐνης και με αυτόν τον τρόπο ελαττώνουν τη φλεγμονή.^{38,39}

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της έρευνάς μας επιτρέπουν να υποστηρίξουμε ότι στο μοντέλο αυτό του επίμυος με άσηπτη περιτονίτιδα από Zymosan, η προληπτική χορήγηση του *L. reuteri* βελτιώνει την ισορροπία της εντερικής χλωρίδας και προάγει τον εντερικό αμυντικό φραγμό, αυξάνοντας τη μικροκυκλοφορία του βλεννογόνου καθώς και το πάχος της προσκολλημένης σε αυτόν βλέννας, με τελικό αποτέλεσμα τη μείωση της βακτηριακής μετακίνησης. Αν τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής αναπαραχθούν πειραματικά, αλλά κυρίως κλινικά, η προληπτική χορήγηση προβιοτικών θα αποκτήσει επιστημονική βάση σε καταστάσεις που προκαλούν βακτηριακή μετακίνηση.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστούμε την κυρία Ελένη Τσιακίρη, ιατρό μικροβιολόγο, για τον ποσοτικό προσδιορισμό των βακτηρίων.

ABSTRACT

The influence of probiotics on bacterial translocation

G. METAXAS, K. KOTZAMPASSI, D. PARAMYTHIOTIS, A. ZATAGIAS, E. ELEFTHERIADIS
*1st Propedeutic Surgical Clinic, Department of Surgery,
 University of Thessaloniki, Medical School, Thessaloniki, Greece*
Archives of Hellenic Medicine 2002, 19(6):652-659

OBJECTIVE Probiotics are non-pathogenic microorganisms which, upon ingestion, exert a beneficial effect by maintaining the intestinal microfloral balance and the integrity of the host. They modify the microflora ecology of the gut, prevent adhesion of pathogenic bacteria, enhance the production of antimicrobial substances and stimulate the host immune defense. Since commensal flora and mucosal barrier comprise the principal structures responsible for bacterial translocation, this study was designed to investigate whether *Lactobacillus reuteri* would be effective in reducing bacterial translocation in Zymosan-induced non-septic peritonitis in the rat, by means of increasing enteric mucosal microcirculation and adherent mucus gel thickness. **METHOD** Eighty male Wistar rats received either *L. reuteri* (10⁷ CFU/day) or placebo for 5 days in drinking water. On day 5, half the rats of each group were subjected to intraperitoneal (IP) injection of Zymosan (500 mg/kg body weight) for induction of non-septic peritonitis, while the remaining received IP normal saline. Enteric mucosal microcirculation and adherent mucus gel thickness were assessed 18 hours later and the mesenteric lymph nodes were processed under aseptic conditions for evaluation of bacterial translocation. **RESULTS** Enteric mucosal microcirculation and adherent mucus gel thickness exhibited a significant reduction in the Zymosan-induced peritonitis groups of

rats, whether pretreated or not by *L. reuteri*. However, the reduction was statistically not so prominent in the probiotics-pretreated rats and this group of rats exhibited a statistically significantly less amount of translocated bacteria in relation to the placebo-treated Zymosan group. **CONCLUSIONS** In this Zymosan-induced peritonitis model, *L. reuteri* pretreatment seems to enhance enteric mucosal barrier strength by means of increasing enteric mucosal microcirculation and adherent mucus gel thickness and thus reducing bacterial translocation.

Key words: Adherent mucus gel thickness, Bacterial translocation, Enteric mucosal barrier, Microcirculation, Peritonitis, Probiotics, Zymosan

Βιβλιογραφία

1. WELLS CL. Colonization and translocation of intestinal bacterial flora. *Transplant Proc* 1996, 28:2653–2656
2. BENGMARK S, GIANOTTI L. Nutritional support to prevent and treat multiple organ failure. *World J Surg* 1996, 20:474–481
3. ADAWI D, KASRAVI FB, MOLIN G, JEPPSSON B. Effect of *Lactobacillus* supplementation with and without arginine on liver damage and bacterial translocation in an acute liver injury model in the rat. *Hepatology* 1997, 25:642–647
4. FULLER R. Probiotics in human medicine. *Gut* 1991, 32:439–442
5. SHU Q, GILL HS. A dietary probiotic (*Bifidobacterium lactis* HN019) reduces the severity of *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 2001, 189:147–152
6. O'SULLIVAN GC. Probiotics. *Br J Surg* 2001, 88:161–162
7. MANGIANTE G, COLUCCI G, CANEPARI P, BASSI C, NICOLI N, CASARIL A ET AL. *Lactobacillus plantarum* reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis. *Dig Surg* 2001, 18:47–50
8. MAO Y, NOBAEK S, ADAWI D, MOLIN G, JEPPSSON B. Comparison of the effects of different strains of *Lactobacillus* in reducing bacterial translocation on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Dig Surg* 1997, 14:284–291
9. MAO Y, NOBAEK S, KASRAVI B, ADAWI D, STENRAM U, MOLIN G ET AL. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996, 111:334–344
10. ELEFTHERIADIS E, KOTZAMPASSI K, HELIADIS N, HERODOTOU A, HATJOPOULOU E, PETRIDOU E ET AL. The implication of nitric oxide in the process of bacterial translocation. *Int Surg* 2000, 85:23–26
11. CUZZOCREA S, McDONALD MC, MAZZON E, FILIPE HM, CENTORRINO T, LEPORE V ET AL. Beneficial effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on the multiple organ failure induced by Zymosan in the rat. *Crit Care Med* 2001, 29:102–111
12. MAINOUS MR, TSO P, BERG RD, DEITCH EA. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. *Arch Surg* 1991, 126:33–37
13. SANDZEN B, BLOM H, DAHLGREN S. Gastric mucus gel layer thickness measured by direct light microscopy. An experimental study in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1988, 23:1160–1164
14. ELEFTHERIADIS E, KOTZAMPASSI K, PAPANOTAS K, HELIADIS N, SARRIS K. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg* 1996, 20:11–16
15. McFADDIN JF. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1980
16. SIMON GL, GORBACH SL. Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984, 86:174–193
17. SILVA M, JACOBUS NV, DENEKE C, GORBACH SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 1987, 31:1231–1233
18. KAILA M, ISOLAURI E, SOPPI E, VIRTANEN E, LAINE S, ARVILOMMI H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992, 32:141–144
19. OKSANEN PJ, SALMINEN S, SAXELIN M, HAMALAINEN P, IHANTOLA-VORMISTO A, MUURASNIEMI-ISOVIITA L ET AL. Prevention of travelers' diarrhoea by *Lactobacillus* GG. *Ann Med* 1990, 22:53–56
20. SIITONEN S, VAPAATALO H, SALMINEN S, GORDIN A, SAXELIN M, WIKBERG R ET AL. Effect of *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med* 1990, 22:57–59
21. SHORNIKOVA AV, CASAS IA, MYKKANEN H, SALO E, VESIKARI T. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 1997, 16:1103–1107
22. HOLMA R, SALMENPERA P, LOHI J, VAPAATALO H, KORPELA R. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus reuteri* R2LC on acetic acid-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2001, 36:630–635
23. BENGMARK S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 1998, 42:2–7
24. MOLIN G, ANDERSSON R, AHRNE S, LONNER C, MARKLINDER I, JOHANSSON ML ET AL. Effect of fermented oatmeal soup on the cholesterol level and the *Lactobacillus* colonization of rat intestinal mucosa. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1992, 61:167–173
25. SINKIEWICZ G, CASAS I, THORBALL J. Inhibition of common pathogens by the probiotic *Lactobacillus reuteri*. *Clin Nutr* 2001, 20(Suppl 3):66–67
26. FORSTNER JF, FORSTNER GG. Gastrointestinal mucus. In: Johnson LR (ed) *Physiology of the gastrointestinal tract*. 3rd ed. Raven Press, New York, 1994:1255–1283
27. APOSTOLOU E, KIRJAVAINEN PV, SAXELIN M, RAUTELIN H, VALTONEN V, SALMINEN SJ ET AL. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001, 3:35–39
28. MADSEN K, CORNISH A, SOPER P, McKAIGNEY C, JIJON H, YACHIMEC C ET AL. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001, 121:580–591

29. SUN Z, WANG X, DENG X, BORJESSON A, WALLEN R, HALLBERG E ET AL. Phagocytic and intestinal endothelial and epithelial barrier function during the early stage of small intestinal ischemia and reperfusion injury. *Shock* 2000, 13:209–216
30. CUZZOCREA S, FILIPPELLI A, ZINGARELLI B, FALCIANI M, CAPUTI AP, ROSSI F. Role of nitric oxide in a non-septic shock model induced by Zymosan in the rat. *Shock* 1997, 7:351–357
31. CUZZOCREA S, ZINGARELLI B, COSTANTINO G, SOTTILE A, TETI D, CAPUTI AP. Protective effect of poly(ADP-ribose) synthetase inhibition on multiple organ failure after Zymosan-induced peritonitis in the rat. *Crit Care Med* 1999, 27:1517–1523
32. MATTAR AF, DRONGOWSKI RA, CORAN AG, HARMON CM. Effect of probiotics on enterocyte bacterial translocation *in vitro*. *Pediatr Surg Int* 2001, 17:265–268
33. MACK DR, MICHAIL S, WEI S, McDOUGALL L, HOLLINGSWORTH MA. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence *in vitro* by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol* 1999, 276:G941–G950
34. KERSS S, ALLEN A, GARNER A. A simple method for measuring thickness of the mucus gel layer adherent to rat, frog and human gastric mucosa: influence of feeding, prostaglandin, N-acetylcysteine and other agents. *Clin Sci (Lond)* 1982, 63:187–195
35. ANONYMOUS. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr* 2001, 73:1124–1130
36. WALLACE JL, MILLER MJ. Nitric oxide in mucosal defense: a little goes a long way. *Gastroenterology* 2000, 119:512–520
37. HUA TC, MOOCHHALA SM. Role of nitric oxide in hemorrhagic shock-induced bacterial translocation. *J Surg Res* 2000, 93:247–256
38. TEJADA-SIMON MV, USTUNOL Z, PESTKA JJ. *Ex vivo* effects of *Lactobacilli*, *Streptococci*, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. *J Food Prot* 1999, 62:162–169
39. PERNER A, RASK-MADSEN J. Review article: the potential role of nitric oxide in chronic inflammatory bowel disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 1999, 13:135–144

Corresponding author:

K. Kotzampassi, 45 Agiou Dimitriou street, GR-546 32 Thessaloniki, Greece, e-mail: elemakis@med.auth.gr

.....