



I test in vitro consentono una migliore comprensione degli effetti terapeutici dei ceppi probiotici commercializzati

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

Il microbioma intestinale è unico per ogni persona e ha un impatto fondamentale sulla salute. I probiotici somministrati per via orale vengono utilizzati per prevenire e/o trattare disturbi gastrointestinali (GI) e mostrano inoltre un potenziale nel trattamento delle condizioni non gastrointestinali. Gli studi in vitro consentono una migliore comprensione delle proprietà biologiche dei microrganismi utilizzati a scopo terapeutico e degli effetti positivi che possono avere in vivo.

Due studi in vitro hanno testato le proprietà di nove ceppi microbici consolidati isolati da preparazioni commerciali (vedere **Tab. 1**) [1, 2]. A causa della complessità del tratto gastrointestinale, i singoli risultati in vitro non possono spiegare in modo definitivo gli effetti fisiologici. Forniscono tuttavia informazioni importanti per la ricerca clinica e per la comprensione degli effetti in vivo.

I probiotici e la loro stabilità nel fluido intestinale simulato

I ceppi probiotici studiati esercitano i loro effetti positivi nell'intestino, ed è per questo motivo che è rilevante la stabilità delle cellule in condizioni intestinali simulate (vedere **Tab. 1**). Degna di nota è la capacità dei diversi ceppi di *B. clausii* (*Bacillus clausii* OC, NR, SIN, T) di moltiplicarsi dopo una diminuzione iniziale della conta cellulare in assenza di fonti di nutrienti nel fluido intestinale simulato (*B. clausii* SIN: diminuzione dopo 2 h rispetto a t_0 [$p < 0,05$], e di proliferare dopo 8 ore di incubazione rispetto a 4 ore [$p < 0,05$]). Dopo 8 ore si verifica solo una leggera riduzione di 0,240 log rispetto a t_0 . La tolleranza di *B. clausii* e *B. coagulans* alle condizioni intestinali simulate è ben documentata considerando la loro capacità di formare spore rispetto ai ceppi non sporigeni solitamente presenti nei prodotti commerciali [1].

I probiotici e il loro legame con le cellule ospiti

I microrganismi probiotici possono competere con i patogeni per i siti di legame della mucosa e quindi contrastare le infezioni causate da microrganismi patogeni. Per questo effetto è necessaria l'adesione al muco gastrointestinale. L'incubazione dei microbi su agar contenente mucine porcine è un metodo consolidato per studiare questo comportamento di legame.

Le piastre di agar contenenti mucina e le piastre di agar prive di mucina per il controllo negativo sono state inoculate con la sospensione batterica. Le piastre sono state quindi incubate a 37 °C sia in condizioni aerobiche che anaerobiche ed è stato determinato il numero di cellule (UFC [unità formanti colonie]) per pozzetto inoculato. Nei ceppi di *B. clausii*, *B. coagulans* e *B. breve*, le UFC/pozzetto ottenute dopo l'incubazione delle mucine sia in condizioni aerobiche che anaerobiche erano significativamente più elevate rispetto ai controlli negativi (da $p < 0,05$ a $p < 0,001$). *L. reuteri* aderiva alle mucine solo in condizioni anaerobiche ($p < 0,001$), mentre *S. boulardii* solo in condizioni aerobiche ($p < 0,01$) [1].

I probiotici per l'intolleranza al lattosio

I probiotici possono produrre enzimi che degradano gli alimenti, come la β -galattosidasi, che possono supportare la digestione, ad esempio nelle persone con intolleranza al lattosio, riducendo potenzialmente i sintomi relativi al sistema digerente. Tutti i ceppi di *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. breve* e *L. reuteri* sono stati in grado di produrre una quantità significativamente maggiore di β -galattosidasi rispetto al controllo negativo (da $p < 0,01$ a $p < 0,001$) [1].

I probiotici per lo stress ossidativo

A causa dei numerosi processi metabolici all'interno delle cellule, un accumulo di specie reattive dell'ossigeno (ROS) può causare effetti tossici. I probiotici che producono anti-ossidanti come la catalasi (CAT) e la superossido dismutasi (SOD) possono essere utili nel ridurre lo stress ossidativo. Tutti i ceppi testati hanno mostrato la capacità di produrre CAT e SOD [1].

I probiotici per la carenza vitaminica

È stato dimostrato che i probiotici producono principalmente vitamine del gruppo B che potrebbero essere utili per mantenere l'eubiosi intestinale e affrontare alcune forme di carenza. I microrganismi probiotici in grado di secernere riboflavina (vitamina B₂) potrebbero compensare una carenza di vitamina B₂ dell'ospite. La carenza di riboflavina è spesso dovuta a una dieta priva di prodotti ricchi di riboflavina ed è la carenza vitaminica più comune nei paesi in via di sviluppo. *B. clausii*, *B. coagulans* e *L. rhamnosus* sono stati in grado di produrre riboflavina ($p < 0,001$ rispetto al controllo negativo) [1].

I probiotici a supporto dell'equilibrio fisiologico attraverso gli acidi grassi a catena corta (SCFA)

Durante la fermentazione microbica dei carboidrati complessi

nell'intestino umano vengono prodotti SCFA. È confermato il collegamento tra la carenza di SCFA e l'insorgenza di diverse malattie, nonché gli effetti curativi dei probiotici, che possono contrastare la carenza di SCFA.

Acido acetico: regolazione del metabolismo lipidico e del peso corporeo. Tutti e nove i ceppi probiotici testati sono stati in grado di secernere acido acetico [2].

Acido propionico: miglioramento della funzione di barriera, dell'integrità intestinale, dell'omeostasi del glucosio e dei lipidi.

I quattro ceppi di *B. clausii*, così come *S. boulardii*, hanno secreto acido propionico. *B. coagulans*, *B. breve*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* non hanno secreto acido propionico [2].

Tab. 1. Panoramica delle proprietà in vitro di ciascun ceppo microbico

Ceppo batterico	Sopravvivenza nel fluido intestinale	Legame con le mucine (aerobico)	Legame con le mucine (anaerobico)	Produzione di β -galattosidasi	Produzione di catalasi e superossido dismutasi	Produzione di riboflavina	Produzione di SCFA: acido acetico	Produzione di SCFA: acido propionico	Produzione di SCFA: acido butirrico
<i>Bacillus clausii</i> NR	+ ¹	+	+	+	+ ⁴	+	+	+ ⁶	+
<i>Bacillus clausii</i> OC	+ ¹	+	+	+	+ ⁴	+	+	+ ⁶	+
<i>Bacillus clausii</i> SIN	+ ¹	+	+	+	+	+	+	+ ⁶	+
<i>Bacillus clausii</i> T	+ ¹	+	+	+	+ ⁴	+	++ ⁵	++ ⁶	+
<i>Bacillus coagulans</i> ATCC 7050	+ ¹	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Bifidobacterium breve</i> DSM 16604	- ¹	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>Limosilactobacillus reuteri</i> DSM 17938	+ ¹	-	+	+	+	-	++ ⁵	-	+
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> ATCC 53103	+ ¹	- ²	- ²	- ³	+	+	+	-	-
<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745	+ ¹	+	-	- ³	+	-	+	+ ⁶	+

¹ I ceppi batterici di *B. clausii* NR, OC, SIN e T, nonché *B. coagulans*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* e *S. cerevisiae* sono sopravvissuti in condizioni intestinali simulate fino a 480 minuti, mentre nel caso di *B. breve* nessuna cellula vivente era rilevabile dopo 6 ore.

² *L. rhamnosus non* è stato in grado di legarsi alle mucine sia in condizioni aerobiche che anaerobiche ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, rispettivamente).

³ *L. rhamnosus* e *S. boulardii* non hanno prodotto β -galattosidasi.

⁴ *B. clausii* OC ha mostrato un'attività di SOD più elevata rispetto a NR e T ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, rispettivamente).

⁵ *B. clausii* T e *L. reuteri* sono stati i più forti produttori di acido acetico.

⁶ *B. clausii* T ha prodotto le concentrazioni più elevate di acido propionico, che differivano significativamente da quelle di *B. clausii* NR ($p = 0,0374$), *B. clausii* SIN ($p = 0,0112$) e *S. boulardii* ($p = 0,0007$).

Acido butirrico: miglioramento della funzione di barriera e dell'integrità intestinale, fonte di energia per le cellule epiteliali intestinali.

I quattro ceppi di *B. clausii* hanno mostrato una secrezione comparabile, superiore a quella di *L. reuteri* e *S. boulardii* [2].

Riepilogo

Una comprensione più approfondita dei meccanismi probiotici può consentire un'applicazione più selettiva ai pazienti dei trattamenti basati sul microbiota. Studi futuri basati su questi aspetti potrebbero chiarire quali potenziali ulteriori aree terapeutiche possano essere sfruttate a beneficio dei pazienti.

Letteratura

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.

Conflitto di interessi: P. Pellegrino, M. C. Uboldi e M. III Perez sono dipendenti di Sanofi. D. Marquez era dipendente di Sanofi al momento della presentazione, e al momento dell'accettazione e della pubblicazione è dipendente di Boehringer Ingelheim.

Dichiarazioni: Medical writing e pubblicazione finanziati da Sanofi.

Informazioni sul manoscritto:

Inoltrato il: 21.09.2023

Accettato il: 09.02.2024

Pubblicato il: 11.03.2024