

# Synbiotická terapie ovlivňuje u pacientů s chronickým onemocněním ledvin složení střevního mikrobiomu a produkci uremických toxinů

Rossi M, Bekker P, Morrison M, et al. Synbiotics Easing Renal Failure by Improving Gut Microbiology (SYNERGY): A Randomized Trial. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11:223–231.

**P**acienti s chronickým onemocněním ledvin (CKD) mají významně zvýšené kardiovaskulární riziko a jejich riziko úmrtí na kardiovaskulární onemocnění je až dvacetkrát vyšší než riziko, že dospějí do terminálního selhání ledvin. Tradiční kardiovaskulární rizikové faktory vysvětlují zvýšené kardiovaskulární riziko pacientů s CKD jen částečně, s progredující renální insuficiencí narůstá význam potenciálně modifikovatelných netradičních rizikových faktorů (Stenvinkel et al., 2008), mezi které patří i uremické toxiny, zejména indoxyl sulfát (IS) a para-cresylsulfát (PCS) (Meijers et al., 2011). Tyto toxiny jsou výhradně produkovány střevní flórou v tlustém střevě, její složení (tzv. střevní mikrobiom) je u pacientů s CKD změněno. Indoxyl sulfát a para-cresyl sulfát mohou přispívat i k progresi CKD (Aronov et al., 2011).

Složení střevního mikrobiomu, a tím i produkci indoxyl sulfátu a PCS lze teoreticky ovlivnit prebiotiky, probiotiky nebo tzv. střevními absorbenty (Schulman, et al., 2015), žádný z těchto postupů dosud neprokázal účinnost v randomizované kontrolované studii. Recentně publikovaný systematický přehled ale ukázal u pacientů s CKD potenciální účinnost kombinace prebiotik a probiotik (synbiotická léčba) na střevní dysbiózu a produkci indoxyl sulfátu a PCS (Rossi et al., 2012). Studie zařazené do přehledu však měly mnoho nedostatků, včetně velké heterogenity ohledně použité prebiotické a probiotické léčby, omezené kontroly příjmu potravy, a obvykle nezahrnovaly sledování vlivu léčby na střevní mikrobiom.

Komentovaná randomizovaná kontrolovaná studie (SYNERGY) sledovala vliv synbiotické (kombinované prebiotické a probiotické) léčby na střevní mikrobiom a koncentrace uremických toxinů produkovaných střevními mikroby, tedy indoxyl sulfátu a PCS. Cílem studie bylo prokázat, že lze tímto způsobem ovlivnit složení střevní mikroflóry a produkci uvedených uremických toxinů s potenciálním vlivem na kardiovaskulární riziko a riziko progresu CKD.

Do studie byli zařazeni dosud nedialyzovaní pacienti s chronickým onemocněním ledvin ve fázi CKD 4–5 (odhadovaná glomerulární filtrace, eGF 10–30 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>) starší 18 let. Relativně úzké rozmezí eGF bylo zvoleno proto, že u pacientů s takto po-

kročilou renální insuficiencí lze očekávat vysokou produkci uremických toxinů. Do studie nebyli zařazeni pacienti po transplantaci ledvin, pacienti po ozáření nebo resekci střeva, pacienti léčení v posledním měsíci před zahájením studie prebiotiky nebo probiotiky, pacienti se syndromem dráždivého střeva, Crohnovou chorobou nebo ulcerózní kolitidou, pacienti s vysokou pravděpodobností nutnosti dialýzy nebo transplantace do šesti měsíců od zahájení studie a pacienti s výraznými známkami malnutrice nebo změnou imunosupresivní léčby v posledních šesti měsících.

Pacienti byli randomizováni k šestitýdennímu cyklu placebem kontrolované synbiotické léčby následovanému čtyřtýdenní vymývací periodou a dalším šestitýdenním cyklem s překřížením léčebného postupu (pacienti vstupně na placebo byli léčeni synbiotickou léčbou a pacienti vstupně na synbiotické léčbě dostávali placebo). Všichni pacienti byli edukováni a sledováni kvalifikovaným dietologem a během dvou týdnů před randomizací (v úvodní „run-in“ fázi) u nich byla zavedena a kontrolována dietní doporučení pro pacienty s pokročilým CKD. Pacienti byli instruováni, aby během studie měli stabilní dietní příjem se zvláštním zaměřením na stabilní příjem vlákniny. Před každým odběrem krve dostávali standardní večeři následovanou lačněním až do krevního odběru.

Prebiotická komponenta synbiotické léčby se skládala z kombinace vysokomolekulárního inulinu a oligosacharidů obsahujících fruktózu (ve formě prášku), probiotická komponenta obsahovala devět různých kmenů laktobacilů, bifidobakterií a streptokoků (ve formě kapslí). Podávaná dávka prebiotik (7,5 g prášku) i probiotik (jedna kapsle) byla po třech týdnech zdvojnásobena.

Primárním sledovaným ukazatelem byla sérová koncentrace indoxyl sulfátu. Sekundárními sledovanými parametry byly sérové koncentrace PCS, složení střevní mikroflóry, eGF, albuminurie, močová exkrece KIM-1 (kidney injury molecule-1, markeru poškození tubulů), sérové koncentrace vybraných cytokinů (IL-1b, IL-6, IL-10 a TNF $\alpha$ ), markerů oxidačního stresu (sérové koncentrace F2-izoprostanů a glutathion peroxidázy), sérové koncentrace LPS (lipopolysacharidu), pacienty hodnocený zdravotní stav, skóre gastrointestinálních symptomů a příjem potravy. V prespecifikované analýze byl také sledován vliv podávání antibiotik na účinky synbiotické diety.

Analýza střevního mikrobiomu (stanovení 16S RNA a izolace a sekvenace DNA) byla provedena na vzorcích stolice skladovaných při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Adherence byla sledována standardním způsobem (kalkulace kapslí a vážení prášku – non-adherence znamenala neuzítí více než 20 % kapslí). Adherence k doporučené dietě byla kontrolována analýzou jídelníčku a příjem bílkovin byl navíc kontrolován podle vylučování urey do moči.

Z 37 pacientů (průměrný věk  $69 \pm 10$  let, 57 % mužů, průměrná odhadovaná glomerulární filtrace  $24 \pm 8$  ml/min/1,73 m $^2$ ) ukončilo studii 31 pacientů. Synbiotická léčba nesnížila významně sérové koncentrace indoxyl sulfátu ( $-2$   $\mu\text{mol/l}$ , 95% interval spolehlivosti  $-5$   $\mu\text{mol/l}$  až  $1$   $\mu\text{mol/l}$ ), ale snížila významně sérové koncentrace PCS ( $-14$   $\mu\text{mol/l}$ , 95% interval spolehlivosti  $-27$   $\mu\text{mol/l}$  až  $-2$   $\mu\text{mol/l}$ ). Pokles byl výraznější a jak u indoxyl sulfátu ( $-5$   $\mu\text{mol/l}$ ), tak u PCS ( $-25$   $\mu\text{mol/l}$ ) statisticky významný u pacientů, kteří neužívali antibiotika. Synbiotická léčba také změnila složení střevního mikrobiomu s přírůstkem bifidobakterií a s úbytkem ruminokoků. Ostatní sekundární sledované ukazatele se až na nárůst albuminurie u pacientů léčených synbiotickou dietou o 38 mg/24 h ( $p = 0,03$ ) významně nezměnily.

V průběhu synbiotické léčby sérové koncentrace PCS (ale nikoli indoxyl sulfátu) dále pomalu klesaly ( $p = 0,002$ ). Vliv synbiotické léčby na sérové koncentrace PCS a indoxyl sulfátu nezávisel

na jejich vstupních koncentracích ani na změnách renální funkce, příjmu vlákniny a bílkovin nebo na pořadí léčby (synbiotická léčba vs. placebo). Účinek léčby nepřetržoval po jejím vysazení, dlouhodobý účinek by tedy vyžadoval její dlouhodobou aplikaci.

Synbiotická léčba významně zvýšila albuminurii o 38 mg/24 h, ale nevedla k významným změnám eGF, močové exkrece KIM-1 ani sérových koncentrací prozánětlivých cytokinů (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 a TNF $\alpha$ ), markerů oxidačního stresu (F2-izoprostanů a glutathion peroxidázy), sérového endotoxinu (LPS), ani k významným změnám pacienty uváděné kvality života (SF-36), gastrointestinálních symptomů nebo příjmu kalorií, bílkovin či vlákniny.

Studium mikrobiomu bylo realizováno u 20 pacientů s kompletními vzorky stolice (vstupně a po příslušných intervencích). Byly identifikovány rodiny celkem 39 bakteriálních a archebakteriálních čeledí, dominovaly *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* a *Rumicoccaceae* (74 různých druhů). Rozdíly vyvolané léčbou byly pozorovány zejména u méně běžných kmenů bakterií. Nejvýraznějším účinkem synbiotické léčby byl zvýšený výskyt rodu *Bifidobacterium* (3,2 %;  $p = 0,003$ ), který byl u léčených pacientů pětikrát častější než u pacientů užívajících placebo. Vzestup relativního zastoupení bifidobakterií přitom nesouvisel se vstupním zastoupením bifidobakterií u jednotlivých pacientů. Změna relativního zastoupení bifidobakterií negativně korelovala s volnými sérovými koncentracemi PCS i indoxyl sulfátu S ( $p = 0,01$ ). Relativní zvýšení zastoupení bifidobakterií přetrvávalo jen po dobu podávání synbiotické léčby. Malý relativní vzestup rodu *Lactobacillus* po synbiotické léčbě nebyl statisticky významný. Dále byl pozorován statisticky významný vzestup blíže neklasifikovaných druhů čeledě *Lachnospiraceae* ( $p = 0,01$ ). Relativní vzestup zastoupení druhu *Faecalibacterium* po synbiotické léčbě byl pozorován pouze u pacientů, kteří nebyli léčeni antibiotiky ( $p = 0,04$ ). Paralelně došlo u pacientů užívajících synbiotickou léčbu k poklesu relativního zastoupení klostridií a specifitější bakterií čeledi *Ruminococcaceae* ( $p = 0,01$ ).

## ■ KOMENTÁŘ

**Prof. MUDr. Vladimír Tesař, DrSc.**

*Mikrobiální flóra v trávicím systému hraje významnou roli nejen v metabolismu, ale i v ochraně organismu proti patogenům. Renální selhání a s ním spojené terapeutické intervence ovlivňují složení mikrobiální flóry. Vyšší koncentrace urey v tělesných tekutinách proniká do trávicího systému, je metabolizována bakteriemi produkujícími ureázu na amoniak, který ve formě hydroxidu amonného výrazně zvyšuje intraluminální pH. Luminální tekutina pacientů s pokročilým chronickým selháním ledvin také obsahuje vyšší koncentrace oxalátů a kyseliny močové. Složení bakterií se u pacientů s chronickou renální insuficiencí tedy posouvá od bakterií metabolizujících zejména špatně stravitelné sacharidy k bakteriím metabolizujícím tyto nově přítomné substráty.*

*Změny složení intraluminální tekutiny a mikrobiomu jsou vyvolány i kalium šetřící dietou (nižší obsah ovoce a zeleniny, a tím i vlákniny). Střevní mikrobiom ovlivňují i běžně podávané vazače fosfátů a vazače kalia. Ke změnám složení střevní mikroflóry přispívá i u chronické renální insuficience často přítomná zácpa (Vaziri, 2016). Výsledkem těchto změn je dysbiotický stav charakterizovaný nárůstem zastoupení bakterií, které disponují ureázou, urikázou a enzymy vytvářejícími p-cresol a indol, a naopak sníženým zastoupením bakterií, které metabolizují mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Wong et al., 2014). Amoniak a hydroxid amonný navíc přispívají k narušení střevní bariéry, jejímž následkem je u pacientů s chronickou renální insuficiencí často přítomná endotoxémie, která přispívá k mikrozánetu charakterizujícímu pacienty s chronickou*

renální insuficienci. Střevní absorbenty snižují endotoxémii a současně i známky systémového mikrozánehu.

V komentované studii synbiotická léčba neovlivnila významně primární cílový ukazatel (sérové koncentrace indoxyl sulfátu), ale vedla k významnému poklesu jiného významného uremického toxinu PCS a změnila složení střevního mikrobiomu (zvýšené zastoupení bifidobakterií a snížené zastoupení ruminokoků). Pokud byli hodnoceni jen pacienti, kteří nebyli v průběhu studie léčeni antibiotiky, byl pokles indoxyl sulfátu i PCS výrazně větší a v obou případech statisticky významný (22 %, resp. 28 %). Léčba byla velmi dobře tolerována a na rozdíl od jiných způsobů léčby nevedla k vzestupu nežádoucích účinků hlášených pacienty. Výsledky randomizované studie SYNERGY tak podporují nálezy nedávné metaanalýzy (Rossi et al., 2014), která ukázala významný vliv suplementace na koncentraci indoxyl sulfátu v séru u dialyzovaných pacientů a na koncentraci PCS v moči i u zdravých osob. Jak již bylo zdůrazněno, studie zahrnuté do metaanalýzy byly ale velmi heterogenní z hlediska druhu a dávky prebiotik a probiotik a jen málo z nich sledovalo vliv antibiotik podávaných v průběhu intervence.

Studii SYNERGY lze srovnávat se dvěma předchozími synbiotickými terapeutickými intervencemi, s kontrolovanou studií u dosud nedialyzovaných pacientů (Guida et al., 2014) a nekontrolovanou studií u pacientů léčených hemodialýzou (Nakabayashi et al., 2011). V obou studiích byl pozorován již po 30 dnech, resp. po 14 dnech výraznější pokles PCS (o 21  $\mu\text{mol/l}$ , resp. 26,8  $\mu\text{mol/l}$ ) než ve studii SYNERGY (jen o 14  $\mu\text{mol/l}$ ). Pokles koncentrací PCS byl ale v předchozích studiích podobný jako u pacientů ve studii SYNERGY neléčených antibiotiky (o 25  $\mu\text{mol/l}$ ).

Třiletá longitudinální studie u 72 predialyzovaných pacientů ukázala, že každý vzestup sérové koncentrace PCS o 5  $\mu\text{mol/l}$  je asociován s rizikem vzniku kardiovaskulárních příhod vyšším o 12 % a rizikem progresu do terminálního selhání ledvin vyšším o 17 % (Lin et al., 2014). Ve velké kohortě 499 pacientů (Meijers et al., 2010) byla sérová koncentrace PCS asociována s kardiovaskulárními příhodami nezávisle na vstupní eGF a na framinghamských rizikových faktorech (HR 1,39).

Ve studiích s perorálními absorbenty bylo 45%, resp. 30% snížení sérové koncentrace indoxyl sulfátu spojeno s významným zmírněním endotelové dysfunkce a se zpomalením progresu renální insuficience (Owada et al., 1997). Experimentální studie ukázaly, že indoxyl sulfát poškozuje tubulární epitelové buňky a cévní endotelové buňky v závislosti na podané dávce.

Statisticky významný vzestup albuminurie pozorovaný ve studii SYNERGY u pacientů užívajících synbiotickou léčbu pravděpodobně není klinicky významný a neměl vztah ke koncentracím sledovaných uremických toxinů. Další studie zaměřené na mechanismus a význam vzestupu albuminurie při synbiotické léčbě jsou ale nutné.

Snížení sérových koncentrací PCS souviselo ve studii SYNERGY zejména se zvýšeným zastoupením bifidobakterií ve střevním mikrobiomu. Bifidobakterie zřejmě regulují růst bakteriálních druhů, které mají vyšší enzymatické kapacity k produkci indoxyl sulfátu a PCS, zejména klostridií a ruminokoků, jejichž zastoupení při synbiotické léčbě klesá. Schopnost probiotik snižovat sérové koncentrace PCS a indoxyl sulfátu zřejmě závisí na jejich obsahu bifidobakterií a na jejich účincích.

Hlavní předností studie SYNERGY proti předchozím studiím je to, že byla randomizovaná, dvojitě zaslepená a zkřížená, takže (při velkých interindividuálních variacích střevního mikrobiomu) mohl být každý pacient sám sobě kontrolou. Velkou předností je také maximální snaha o kontrolu diety sledovaných pacientů. Hlavními nedostatky této studie jsou relativně malý počet pacientů, krátká doba sledování a použití jen biochemických cílových ukazatelů místo kli-

nicky významných parametrů, jakými jsou výskyt kardiovaskulárních příhod a progresu chronické renální insuficience.

Je tedy zřejmé, že po této malé a krátkodobé studii by měla následovat dostatečně rozsáhlá a dlouhodobá studie (pravděpodobně s větším zastoupením prebiotické komponenty) s „tvrdými“ cílovými parametry (progrese renální insuficience, kardiovaskulární příhody).

#### Literatura

- Aronov PA, Luo FJ, Plummer NS, et al. Colonic contribution to uremic solutes. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1769–1776.
- Guida B, Germano R, Tirio R, et al. Effect of short-term synbiotic treatment of plasma p-cresol levels in patients with chronic renal failure: a randomised clinical trial. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2014;24:1043–1049.
- Lin CJ, Pan CF, Chuang CK, et al. P-cresyl sulfate is a valuable predictor of clinical outcomes in pre-ESRD patients. *Biomed Res Int*. 2014;2014:526932.
- Meijers BK, Claes K, Bammens B, et al. p-Cresol and cardiovascular risk in mild-to-moderate kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5:1182–1189.
- Meijers BK, Evenepoel P. The gut-kidney axis: indoxyl sulfate, p-cresyl sulfate and CKD progression. *Nephrol Dial Transplant* 2011;26:759–761.
- Nakabayashi I, Nakamura M, Kawakami K, et al. Effects of synbiotic treatment on serum level of p-cresol in haemodialysis patients: a preliminary study. *Nephrol Dial Transplant* 2011;6:1094–1098.
- Owada A, Nakao M, Koike J, et al. Effects of oral adsorbent AST-120 on the progression of chronic renal failure: a randomized controlled study. *Kidney Int Suppl* 1997;63:S188–S190.
- Rossi M, Klein, Johnson DW, Campbell KL. Pre-, pro-, and synbiotics: do they have a role in reducing uremic toxins? A systematic review and meta-analysis. *Int J Nephrol* 2012;2012:673631.
- Rossi M, Johnson DW, Morrison M, et al. SYNbiotics Easing Renal failure by improving Gut microbiology (SYNERGY): A protocol of placebo-controlled randomised cross-over trial. *BMC Nephrol* 2014;15:106.
- Schulman G, Berl T, Beck GJ, et al. Randomized placebo-controlled EPPIC trials of AST-120 in CKD. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:1732–1746.
- Stenvinkel P, Carrero JJ, Axelsson J, et al. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: How do new pieces fit into the uremic puzzle? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:505–521.
- Vaziri ND. Effect of synbiotic therapy on gut-derived uremic toxins and the intestinal microbiome in patients with CKD. *Clin J Am Soc Nephrol* 2016;11:199–201.
- Wong LJ, H'ng PS, Wong SY, et al. Termite digestomes as a potential source of symbiotic microbiota for lignocelluloses degradation: a review. *Pak J Biol Sci* 2014;17:956–963.