

# The effect of the probiotic *L.plantarum* 299v on the intestinal flora : methodological studies in health and disease

## Citation for published version (APA):

Goossens, D. A. M. (2006). *The effect of the probiotic L.plantarum 299v on the intestinal flora : methodological studies in health and disease*. Universiteit Maastricht.

## Document status and date:

Published: 01/01/2006

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Chapter 8

---

Summary



## Summary

This thesis describes the effects of the probiotic *L. plantarum* 299v on the composition of the faecal and mucosal intestinal flora and faecal metabolites in healthy volunteers as well as in patients with a possibly disturbed intestinal flora.

**Chapter 1** critically reviews the literature about the effects of probiotics in gastrointestinal disorders such as diarrhoea, inflammatory bowel disease, pouchitis, irritable bowel syndrome, lactose malabsorption, *Helicobacter pylori* infection, constipation and colorectal cancer. The composition and functions of the human microflora as well as the environmental factors that might influence this microflora are described. The definition of probiotics and possible modes of actions are also reported. In this chapter, it is postulated that the results of probiotic studies are encouraging although more well-designed placebo-controlled studies with sufficient numbers of clinically well-defined patients are required. More attention should be paid to the onset and duration of probiotic effects, the survival of probiotic strains and the differences between probiotic strains (mono-, versus multispecies). Moreover, the effects of probiotics on the bacterial composition but also on its metabolites need to be studied to get further insight in these possible modes of action.

Finally, this chapter summarizes studies investigating the effects of *L. plantarum* 299v *in vitro*, in animal models and in human trials. It can be concluded that *L. plantarum* 299v is a good candidate to study probiotic effects as this probiotic strain can survive passage through the gastrointestinal tract and is able to adhere to the epithelium via mannose-specific receptors.

In **chapter 2** the effects of *L. plantarum* 299v on the faecal bacterial composition were investigated in healthy volunteers. The bacterial composition was studied by measuring the concentration of bacteria by culture and by measuring metabolic activities such as the enzyme activities ( $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase and azoreductase), the short chain fatty acid concentrations (SCFA), the endotoxin concentrations and the faecal pH. This placebo-controlled study also focused on the onset and the duration of the probiotic effects. In summary, *L. plantarum* 299v increased the lactobacilli concentration significantly but did not have a significant influence on the other faecal bacteria cultured, or on the metabolic activities. The increase in *L. plantarum* 299v concentration was noticed within one week after start of probiotic intake and disappeared within one week after cessation of intake.

**Chapter 3** focuses on the survival of *L. plantarum* 299v through the gastrointestinal tract and describes a placebo-controlled double-blind study with healthy volunteers. These healthy persons took a proton pump inhibitor (pantoprazole) to decrease gastric acidity, or a placebo in addition to *L. plantarum* 299v intake. Decrement of the gastric acidity might result in a better survival of *L. plantarum* 299v resulting in a higher faecal lactobacilli

concentration and changes in the faecal metabolic activity (i.e. SCFA concentrations and pH). However, the increase in the lactobacilli concentration was in the pantoprazole group as high as in the placebo group and no changes in metabolic activity were seen. Lactobacilli cultured from faecal samples were identified as *L. plantarum* 299v by molecular analyses. This study demonstrates a good survival of *L. plantarum* 299v irrespective of the gastric acidity.

In **chapter 4** the results of a placebo-controlled double-blind study including patients who had to undergo a bowel cleansing procedure are presented. This study investigated the effects of the bowel cleansing on the faecal bacterial composition and paid special attention to the eventually beneficial effects of *L. plantarum* 299v in the recolonisation phase after bowel cleansing. The bacterial composition has been studied quantitatively by culture as well as by denaturing gradient gel electrophoresis producing bacterial molecular 'fingerprints' of the dominant faecal flora.

No major changes were observed in the bacterial composition after the bowel cleansing procedure and therefore it was concluded that the intestinal flora is relatively stable. Probiotic intake increased the faecal concentration of lactobacilli significantly but did not influence other bacterial concentrations or the bacterial composition based on culture results and bacterial 'fingerprints'.

As the bacterial composition found in faecal samples may not represent that of the mucosa, a placebo-controlled study was performed to compare the effects of *L. plantarum* 299v on the faecal versus mucosal bacterial composition. Moreover, as probiotic effects may differ along the gastrointestinal tract, biopsies have been collected and compared from colon ascendens and rectum (**chapter 5**). Patients who had to undergo a colonoscopic control for colorectal polyps were included and consumed *L. plantarum* 299v during two weeks prior to colonoscopy. Intake of *L. plantarum* 299v increased the lactobacilli concentration in faecal samples significantly, while *L. plantarum* 299v could be found sporadically in mucosal samples. The low mucosal prevalence of *L. plantarum* 299v, which is in contrast to a previously performed study in Sweden, needs further study to get more insight in the possible modes of action of this probiotic strain. The bacterial composition of rectum biopsies did not differ significantly from colon ascendens biopsies suggesting that in future studies, collection of rectal biopsies only may be sufficient to study effects of probiotics on the mucosal intestinal flora. However, the faecal bacterial composition differed significantly from the mucosal bacterial composition as the mucosal prevalence of several aerobic and anaerobic bacteria was significantly lower compared to that found in faecal samples. In future studies both samples need to be collected.

In **chapter 6** differences in bacterial composition between inactive UC patients on a stable dose of maintenance therapy and healthy volunteers were compared by culture. Moreover, the effects of *L. plantarum* 299v on the

intestinal flora in faecal and mucosal samples as well as on faecal metabolic activities (enzyme activities, endotoxin concentrations and SCFA concentrations) were studied in these patients. As the UC patients had significantly more loose faecal samples, the bacterial concentration was corrected by expressing the concentrations as log CFU/mg protein in faeces. Faecal bacterial concentrations of UC patients were significantly lower compared to those of the healthy controls. These differences may be due to either the disease or the intake of medication.

Besides the significant increase in the lactobacilli concentration in faecal samples after *L. plantarum* 299v intake, no other changes in the bacterial composition of faecal samples or rectal biopsies could be observed based on culture and temporal temperature gel electrophoresis. Nor did *L. plantarum* 299v intake change metabolic products in faecal samples significantly. Remarkably, *Bacteroides* spp. was not present in mucosal samples in the probiotic group while the prevalence was relatively high in the placebo group indicating that probiotic intake might reduce *Bacteroides* spp. prevalence in the mucosa of UC patients, which can be beneficial for these patients. As the intake of *L. plantarum* 299v did not profoundly change the bacterial composition, more studies are warranted to investigate other modes of action of probiotics such as modulating the immune system.

In conclusion, this thesis shows that intake of *L. plantarum* 299v increased the lactobacilli concentration of faecal samples significantly. The clinical consequence of the increase in lactobacilli requires further study. No other changes in the faecal bacterial concentrations or bacterial 'fingerprints' were seen after *L. plantarum* 299v intake. No changes in metabolic activities were measured in faecal samples, or in the bacterial composition of mucosal samples comparing probiotic to placebo group. As *L. plantarum* 299v did not change the intestinal flora in the five studies described in this thesis, the bacterial composition can be regarded as relatively stable. However, this thesis also demonstrates that the bacterial composition of UC patients is significantly different from healthy persons.

The modes of acting of *L. plantarum* 299v in the gastrointestinal tract need further study focusing on the mucosal adherence, the influences on the mucosal metabolic activities and the effects on the immune system.

---

---

## Samenvatting





## Samenvatting

Dit proefschrift beschrijft de effecten van het probioticum *L. plantarum* 299v op de samenstelling van de faecale en mucosale darmflora en faecale metabolieten van gezonde vrijwilligers en patiënten met een mogelijk verstoorde darmflora.

**Hoofdstuk 1** geeft een kritisch overzicht van de literatuur die bekend is over de effecten van probiotica in gastro-intestinale ziekten zoals diarree, inflammatoire darmziekten, pouchitis, prikkelbare darm syndroom, lactose malabsorptie, *Helicobacter pylori* infectie, constipatie en colorectale kanker. De samenstelling en de functies van de humane microflora en de omgevingsfactoren die deze microflora kunnen beïnvloeden, worden beschreven. De definitie van probiotica en de mogelijke werkingsmechanismen daarvan komen ook aan de orde. In dit hoofdstuk wordt geconcludeerd dat de resultaten van probioticum-onderzoek bemoedigend zijn, hoewel meer goed opgezette placebo-gecontroleerde studies met voldoende aantallen goed geselecteerde patiënten noodzakelijk zijn. Daarnaast zou aandacht besteed moeten worden aan de aanvang en duur van probioticum-effecten, de overleving van probioticumstammen en het verschil in effecten van verschillende probioticumstammen (mono-, versus multispecies). Bovendien zouden de effecten van probiotica op de intestinale bacteriële samenstelling, maar ook op de metabolieten bestudeerd dienen te worden om een beter inzicht te krijgen in de mogelijke werkingsmechanismen. Dit hoofdstuk eindigt met een overzicht van *in vitro*, dier-, en humane studies die de effecten van *Lactobacillus plantarum* 299v beschrijven. Er wordt geconcludeerd dat *L. plantarum* 299v een goede kandidaat kan zijn om probioticum-effecten te bestuderen aangezien deze probioticumstam passage door het maagdarmkanaal kan overleven en in staat is om te hechten aan het epitheel via mannose-specifieke receptoren.

**Hoofdstuk 2** beschrijft de effecten van *L. plantarum* 299v op de faecale bacteriële samenstelling van gezonde vrijwilligers. De bacteriële samenstelling is onderzocht door de concentraties van bacteriën vast te stellen met behulp van kweek en door de metabole activiteit te bepalen aan de hand van enzymactiviteiten ( $\beta$ -glucosidase,  $\beta$ -glucuronidase en azoreductase), alsmede concentraties van korte keten vetzuren (KKVZ) en endotoxinen en de pH in faeces. In deze placebo-gecontroleerde studie is tevens de aanvang en de duur van de effecten van het probioticum onderzocht. Samenvattend kan gezegd worden dat *L. plantarum* 299v de concentratie van lactobacilli significant laat stijgen, maar geen significant effect heeft op de overige bacteriën gekweekt in de faecesmonsters, noch op de metabole activiteiten. De stijging van de concentratie van *L. plantarum* 299v was reeds zichtbaar binnen een week na de start van probioticum inname en verdween binnen een week nadat gestopt was met het probioticum.

---

**Hoofdstuk 3** richt zich op de overleving van *L. plantarum* 299v in het maagdarmkanaal en beschrijft een placebo-gecontroleerde studie met gezonde vrijwilligers. Deze gezonde personen namen een maagzuurremmer (pantoprazol) in om de zuurgraad in de maag te laten dalen, of een placebo naast de inname van *L. plantarum* 299v. Daling van de zuurgraad in de maag zou kunnen leiden tot een betere overleving van *L. plantarum* 299v, wat weer resulteert in een hogere concentratie van lactobacilli in de faecesmonsters en veranderingen in de metabole activiteiten (zoals KKVZ-concentraties en pH). De stijging in de concentratie van lactobacilli was echter in the pantoprazol-groep even hoog als in de placebo-groep en veranderingen in de metabole activiteiten werden niet waargenomen. Lactobacilli gekweekt uit de faecesmonsters werden geïdentificeerd als *L. plantarum* 299v met behulp van moleculaire technieken. Deze studie toont een goede overleving aan van *L. plantarum* 299v, onafhankelijk van de zuurgraad in de maag.

**Hoofdstuk 4** presenteert de resultaten van een placebo-gecontroleerde dubbel-blinde studie, waarin patiënten werden geïncubeerd die een lavage dienden te ondergaan. Deze studie onderzocht de effecten van deze lavage op de bacteriesamenstelling in de faeces en onderzocht of toediening van *L. plantarum* 299v de herkolonisatie na lavage gunstig kon beïnvloeden. De bacteriesamenstelling is kwantitatief bestudeerd met behulp van kweek, maar ook met behulp van 'denaturing gradient gel electrophoresis' (DGGE), waarbij bacteriële moleculaire bandenpatronen van de dominante faecale flora worden gemaakt.

Er werden geen significante veranderingen waargenomen in de bacteriële samenstelling na de lavage en zodoende is er geconcludeerd dat de intestinale flora relatief stabiel is. Inname van probiotica verhoogde de faecale concentratie van lactobacilli significant, maar beïnvloedde de andere bacteriële concentraties of samenstelling niet.

Aangezien de bacteriële samenstelling gemeten in de faeces zou kunnen verschillen van de samenstelling gemeten in de mucosa, is een placebo-gecontroleerde studie uitgevoerd waarin de effecten van *L. plantarum* 299v op zowel de faecale als de mucosale bacteriesamenstelling werden bestudeerd (**hoofdstuk 5**). Aangezien de effecten van probiotica op verschillende plaatsen in het maagdarmkanaal zouden kunnen variëren, zijn biotopen verzameld en vergeleken in zowel colon ascendens als rectum. Patiënten die een colonoscopie dienden te ondergaan ter controle voor colorectale poliepen, werden geïncubeerd en namen *L. plantarum* 299v gedurende twee weken vóór de colonoscopie. Door de inname van *L. plantarum* 299v steeg de concentratie van de lactobacilli in de faeces significant, terwijl *L. plantarum* 299v slechts sporadisch in de mucosale biotopen geïdentificeerd kon worden. De lage prevalentie van *L. plantarum* 299v in de mucosa is niet in lijn met eerder onderzoek uitgevoerd in Zweden, en zal verder onderzocht dienen te worden om meer inzicht te krijgen in de mogelijke werkingsmechanismen van deze probioticumstam.

De bacteriële samenstelling van de rectumbiopten bepaald middels kweek verschilde niet significant van de samenstelling in biopten van colon ascendens, wat aantoonde dat het verzamelen van alleen rectumbiopten voldoende zou zijn om de effecten van probiotica op de mucosale intestinale flora te bestuderen. De faecale bacteriële samenstelling verschilde wel significant van de mucosale samenstelling aangezien de prevalentie van verscheidene aërobe en anaërobe bacteriën in de mucosa significant lager was dan de prevalentie in de faeces. In toekomstige studies zullen beide monsters verzameld dienen te worden.

In hoofdstuk 6 is de bacteriële samenstelling van de faeces van patiënten met colitis ulcerosa (CU) in een inactieve fase en op een stabiele onderhoudsdosering vergeleken met die van gezonde vrijwilligers met behulp van kweek. Vervolgens is in de CU patiënten het effect bestudeerd van *L. plantarum* 299v op de intestinale flora in de faeces en in de mucosa evenals op metabole activiteiten gemeten in faecesmonsters (enzymactiviteit, endotoxinen concentraties, KKVZ-concentraties). Omdat de CU patiënten minder consistente faeces hadden, werden de bacteriële concentraties gecorrigeerd voor verdunning en uitgedrukt in log kolonie vormende eenheden per mg eiwit in de faeces.

Faecale bacteriële concentraties gemeten in de CU patiënten waren significant lager in vergelijking met de concentraties gemeten in gezonde vrijwilligers. Deze verschillen kunnen veroorzaakt zijn door de ziekte of door de inname van medicijnen.

Naast de significante stijging in de concentratie van lactobacilli in de faecesmonsters, werden geen andere verschillen gemeten in de bacteriële samenstelling van faeces of biopten na de inname van *L. plantarum* 299v. Deze resultaten zijn gebaseerd op zowel kweek als op moleculaire technieken. Ook veranderde de inname van *L. plantarum* 299v de metabole activiteiten in de faeces niet.

Opvallend is dat *Bacteroides* spp. niet aanwezig waren in de mucosale monsters van de CU patiënten in de probioticum-groep, terwijl de prevalentie relatief hoog was in de placebo-groep. Dat zou erop kunnen duiden dat *L. plantarum* 299v de prevalentie van *Bacteroides* spp. in de mucosa van CU patiënten kan verlagen, wat gunstig kan zijn voor deze patiënten. Aangezien de inname van *L. plantarum* 299v geen duidelijke verandering laat zien in de bacteriële samenstelling, zijn meer studies nodig om mogelijk andere werkingsmechanismen van probiotica, zoals het beïnvloeden van het immuunsysteem, te bestuderen.

Dit proefschrift toont dat de inname van *L. plantarum* 299v de concentratie van lactobacilli in faeces van gezonde vrijwilligers als ook van mensen van wie de darmflora mogelijk verstoord is, significant verhoogt. De klinische relevantie van deze stijging dient echter nader onderzocht te worden. Inname van *L. plantarum* 299v toont geen andere veranderingen in de bacteriële concentraties of in de bacteriële bandenpatronen, gemeten in de

---

faecesmonsters. Bij vergelijking van de probioticum-groep met de placebo-groep werden er ook geen veranderingen gemeten in de metabole activiteiten in de faecesmonsters, of in de bacteriële samenstelling gemeten in de mucosa. Aangezien *L. plantarum* 299v de intestinale flora niet lijkt te veranderen, zoals is aangetoond in de vijf onderzoeken beschreven in dit proefschrift, kan de bacteriële samenstelling als relatief stabiel worden beschouwd. Dit proefschrift toont echter een significant verschil in de bacteriële samenstelling indien CU patiënten worden vergeleken met gezonde personen.

Het werkingsmechanisme van *L. plantarum* 299v in het maagdarmkanaal dient verder onderzocht te worden, waarbij aandacht besteed zou moeten worden aan de hechting van de probioticumstam aan de mucosa, de invloed op de metabole activiteiten in de mucosa en de effecten op het immuunsysteem.