5.1 Besonderheiten und kritische Bemerkungen zu Wirkungen und Wirkmechanismen von Probiotika

Die Zahl an Publikationen wissenschaftlicher Untersuchungen zu Wirkungen und Wirkmechanismen von Probiotika hat in den letzten Jahren exponentiell zugenommen (vgl. Kapitel 2, Abb. 2.3). Hierbei hat sich übereinstimmend herausgestellt, dass Probiotika über ein breit angelegtes, aber individuell unterschiedliches Wirkungsspektrum verfügen, das durch Interaktionen sowohl mit der wirtseigenen Mikroflora als auch mit dem Wirtsorganismus selbst gekennzeichnet ist. Die Vielfalt an Wirkungen und Wirkmechanismen beruht darauf, dass es sich bei Probiotika um lebende Einzeller, die über äußerst vielseitige Stoffwechselleistungen und andere Aktivitäten verfügen, und nicht um chemisch definierte Monosubstanzen handelt.

INFO

Probiotika verfügen – wie jeder andere lebende Mikroorganismus auch – über ein unterschiedlich ausgeprägtes Aktivitätsspektrum. In verschiedenen *In-vitro*- und *In-vivo*-Testsystemen zeigt sich ein für das jeweilige Probiotikum typisches Muster an Wirkungen und Wirkmechanismen.

Probiotische Mikroorganismen besitzen im Unterschied zu chemisch definierten Stoffen eine Vielfalt an genetisch fixierten potenziellen Aktivitäten, die oftmals erst umweltgesteuert exprimiert werden. Dies bedeutet, dass zumindest bei einem Teil der prinzipiell möglichen Wirkungen eines Probiotikums Umweltfaktoren, z. B. die Bedingungen im Magen-Darm-Trakt, mitentscheiden, ob diese Wirkungen zum Tragen kommen oder nicht. In Hinsicht auf die speziellen probiotischen Wirkungen und die ihnen zugrunde liegenden Wirkmechanismen wurden für Probiotika-Kandidatenstämme von verschiedenen Autoren (Dunne et al., 2001; Gibson & Fuller, 2000; Marteau & Shanahan, 2003; Marteau et al., 2004; Reid, 2006; Tuomola et al., 2001) in den letzten Jahren eine Reihe von mikrobiologischen, pharmakologischen und immunmodulatorischen Eigenschaften gefordert (s. Kap. 3, Tab. 3.1), über die diese Stämme verfügen sollten und nach denen bei der Suche neuer Stämme selektioniert werden sollte. Auch nationale (Arbeitsgruppe „Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln“ am ehem. BgVV, Berlin, 2000) und internationale Expertengremien (FAO/WHO, 2001, 2002) haben hierzu Empfehlungen ausgesprochen.

Bislang wurden allerdings nur für wenige probiotisch genutzte Bakterien- oder Hefe-Stämme umfassende *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen zu den Wirkungen und insbesondere zu den zugrunde liegenden Wirkmechanismen publiziert. Viel zu oft scheinen Hersteller oder Vertreiber probiotischer Produkte bis heute nach dem „Me-too“-Prinzip zu agieren und projizieren die für andere Probiotika nachgewiesenen Effekte und Wirkmechanismen auf das eigene, aber nicht untersuchte Produkt (frei nach dem Motto „Wenn das eine Probiotikum diese Wirkung hat, sollte mein Probiotikum auch so wirken“). Die experimentellen wie auch die klinischen Untersuchungen der letzten Jahre mit verschiedenen Probiotika belegen jedoch eindeutig, dass diese einfache (und für den „Trittbrettfahrer“ kostengünstige) Vermutung nicht stimmt. Im Gegensatz zur immer noch weit verbreiteten Meinung, dass die für einen bestimmten *Lactobacillus-acidophilus*-Stamm nachgewiesenen Wirkungen auch für alle anderen *L.-acidophilus*-Stämme gelten müssten, hat sich gezeigt, dass Wirkspektrum und Wirkmechanismen probiotischer Mikroorganismen nicht gattungs- oder speziesspezifisch, sondern vielmehr stammspezifisch sind (Christensen et al., 2002; Gardiner et al., 2002; Haller et al., 2001; Helwig et al., 2006; Maassen et al., 2000; Mao et al., 1997; Nagafuchi et al., 1999; Ouwehand et al., 2001; Wehkamp et al., 2004). In dieser Hinsicht stellt sich die Situation bei den Probiotika nicht wesentlich anders dar als bei bestimmten fakultativ pathogenen Keimarten wie z. B. der Spezies *Escherichia coli*, in der sowohl pathogene als auch kommensale und probiotische Stämme vorkommen. Es ist daher nicht zulässig, die für einen bestimmten probiotischen Stamm einer Bakterien- oder Hefespezies nachgewiesenen Wirkungen ohne Prüfung per Analogieschluß auch für andere Probiotika-Kandidatenstämme derselben Art in Anspruch zu nehmen.

Zu den diversen biologischen Wirkungen von Probiotika liegt mittlerweile eine Fülle von Erkenntnissen aus präklinischen *In-vitro*- wie *In-vi-*

aus: Schulze u. a., Probiotika (ISBN 9783830453567) © 2008 Hippokrates Verlag

vo-Untersuchungen vor (De Roos & Katan, 2000; Dunne et al., 1999, 2001; Gibson & Fuller, 2000; Isolauri et al., 2001; Marteau & Shanahan, 2003; Marteau et al., 2004; Reid, 2006). Demgegenüber steht die Erforschung der molekularen Wirkmechanismen, die den unterschiedlichen Wirkungen zugrunde liegen, noch ganz am Anfang.

Biologische Eigenschaften und Aktivitäten von probiotischen Bakterien- und Hefe-Stämmen, die *in vitro* getestet werden können, und die sich daher auch als Parameter für Screening-Untersuchungen eignen, wurden bereits in Kapitel 4 („Sicherheits- und Qualitätsaspekte von Probiotika") besprochen. Wichtig ist dabei, dass die *in vitro* gewonnenen Daten mit Testanordnungen erzielt werden, die eine Korrelation mit *In-vivo*-Untersuchungen bzw. mit definierten klinischen Indikationen zulassen. Für die Prüfung von Kandidatenstämmen auf probiotische Wirkungen und die Beurteilung von Untersuchungsergebnissen ist es unabdingbar, dass die verwendeten Isolate zuvor mit modernen mikrobiologischen, molekularbiologischen und anderen bioanalytischen Methoden einwandfrei identifiziert, taxonomisch exakt eingeordnet und auch korrekt benannt werden (Hamilton-Miller et al., 1999; Klein et al., 1998; Reuter, 1969, 2001; Tannock, 1999; Tuomola et al., 2001). Dies ist, wie mikrobiologisch-analytische Untersuchungen der letzten Jahre vielfach gezeigt haben, insbesondere bei probiotischen Nahrungsergänzungsmitteln nicht immer der Fall (Hamilton-Miller et al., 1999; Reuter, 2001; Temmerman et al., 2002, 2003).

Nach dem heutigen Stand von Wissenschaft und Technik sind die vielfältigen Wirkungen und Wirkungsweisen probiotischer Mikroorganismen

INFO

Wirkspektrum und Wirkmechanismen von Probiotika sind nicht gattungs- oder artspezifisch, sondern stammspezifisch. Die ungeprüfte Übertragung von Fähigkeiten eines bestimmten probiotischen Bakterien- oder Hefestamms auf einen anderen Stamm gleichen Namens ist unzulässig.

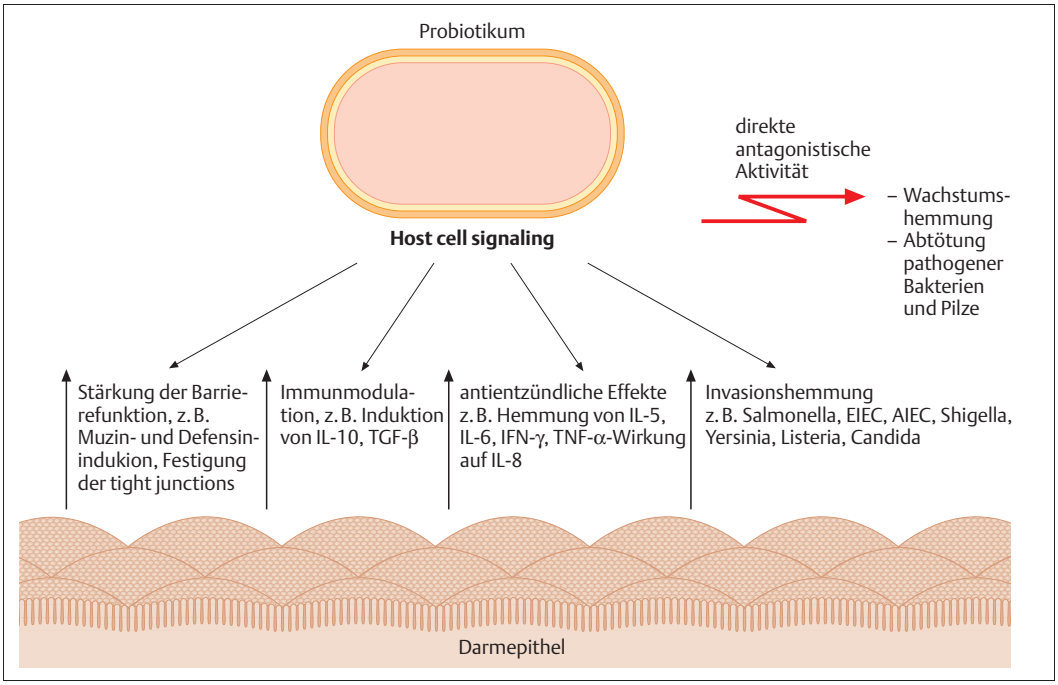

Abb. 5.1 Schematische Darstellung der Wirkungen von Probiotika im Darm und am Darmepithel (IL = Interleukin, TGF = Transforming Growth Factor, IFN = Interferon, TNF = Tumornekrosefaktor, EIEC = enteroinvasive *E. coli*, AIEC = adhärent-invasive *E. coli*).

aus: Schulze u. a., Probiotika (ISBN 9783830453567) © 2008 Hippokrates Verlag

CAVE

Die mikrobiologische Qualität mancher Probiotika, insbesondere auf dem Gebiet der Nahrungsergänzungsmittel, lässt zu wünschen übrig. So wurde in mehreren Untersuchungen von Produkten des europäischen und des US-amerikanischen Marktes festgestellt, dass ungültige Taxons (z. B. „*Lactobacillus sporogenes*“) und Fantasiebezeichnungen sowie zu geringe Lebendkeimzahlen an der Tagesordnung waren. Manche der überprüften Produkte enthielten sogar überhaupt keine lebenden Keime oder waren mit anderen als den deklarierten Mikroorganismen kontaminiert.

sowohl mit klassischen pharmakologischen und mikrobiologischen Methoden (*in vitro* und *in vivo*) als auch mit modernen biochemischen, molekularbiologischen und immunpharmakologischen Methoden nachzuweisen.

Schwerpunkte bei der Erforschung von Wirkungen und Wirkmechanismen probiotischer Mikroorganismen-Stämme sind:

- Untersuchungen zu antagonistischen/antimikrobiellen Effekten gegen pathogene und potenziell pathogene Keime,
- Untersuchungen zur Beeinflussung der Mikroökologie des Gastrointestinaltrakts bzw. der Mikroökologie von Vagina und Urogenitaltrakt,
- Untersuchungen zur Stärkung bzw. Regeneration der epithelialen Barrierefunktion,
- Untersuchungen zur Beeinflussung der lokalen Infektabwehr und der systemischen Immunität.

Eine zusammenfassende Darstellung der vielfältigen Wirkungen von Probiotika, die bislang für einige definierte Bakterienstämme wie z. B. *Lactobacillus rhamnosus* GG und *E. coli* Nissle 1917 entdeckt worden sind, ist in Abb. 5.1 zu finden. Die aktuelle Forschung konzentriert sich zurzeit auf die Aufklärung der molekularen Wirkungen und Wirkmechanismen der Interaktionen zwischen bestimmten Probiotika und den Epithelzellen („Host cell signaling“).

5.2 Antimikrobielle Wirkungen

Antimikrobielle Wirkungen kommen durch antagonistische Effekte von Probiotika gegen pathogene oder potenziell pathogene Mikroorganismen zustande. Diese können auf direkten antimikrobiellen Interaktionen („to fight the bad with the good“) oder auf indirekten mikroökologischen oder immunmodulatorischen Wirkungen bzw. auf kommunikativen Interaktionen mit den Epithelzellen beruhen (Altenhoefer et al., 2004; Barbes & Boris, 1999; Famularo et al., 2001; Naidu et al., 1999; Otte & Podolsky, 2004; Reid et al., 2001; Schlee et al., 2007).

Direkte antimikrobielle Wirkungen, z. B. von probiotischen Laktobazillen, beruhen oftmals allein darauf, dass die Laktobazillen-Stämme große Mengen der keimabtötenden Milchsäure sezernieren. Andere probiotische Mikroorganismen bilden spezifisch wirkende Bakteriozine oder andere antimikrobielle Substanzen (Baba & Schneewind, 1998; Gotteland et al., 2006). Diese Eigenschaften könnten für die Wirksamkeit verschiedener *Lactobacillus*-Stämme bei akuten infektiösen Diarrhöen verantwortlich sein.

Für den Hefestamm *Saccharomyces boulardii* ist beschrieben (Castagliuolo et al., 1996), dass er aufgrund besonderer proteolytischer Aktivitäten in der Lage ist, beispielsweise die Toxine von *Clostridium difficile* zu zerstören. Diese Art der Wirkung bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die klinische Effektivität von *S. boulardii* bei der Form von antibiotikaassoziierter Diarrhö, die durch ein Hochwuchern von *C. difficile* im Darm gekennzeichnet ist.

Von *E. coli* Nissle 1917 ist bekannt (Patzer et al., 2003), dass dieser Stamm zwei verschiedene antagonistisch aktive Mikrozine produziert, die insbesondere gegen nahe verwandte gramnegative Enterobacteriazeen gerichtet sind. Die antibakterielle Wirkung der Mikrozine könnte zur klinischen Wirksamkeit von *E. coli* Nissle 1917 bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beitragen, da hier die starke Besiedlung der Darmschleimhaut mit bestimmten pathogenen bzw. proinflammatorischen Enterobakterien (z. B. enterohämorrhagische *E. coli*, EHEC, adhärent-invasive *E. coli*, AIEC u. a.) akute Entzündungs-

aus: Schulze u. a., Probiotika (ISBN 9783830453567) © 2008 Hippokrates Verlag

schübe auslösen kann. Eine Reduzierung der Schleimhautbesiedlung mit diesen proinflammatorischen Keimen hat demnach zur Folge, dass die Patienten weniger akute Schübe erleiden müssen. Direkte antagonistische Wirkungen von Probiotika lassen sich sowohl unter *In-vitro*-Bedingungen auf festen Nährböden nachweisen (Abb. 5.2) als auch in *In-vivo*-Modellsystemen, z. B. in gnotobiotisch gehaltenen Ferkeln, die gleichzeitig oder sequenziell mit definierten pathogenen und probiotischen Mikroorganismen besiedelt werden (Schulze et al., 1992) (Abb. 5.3).

Die Synthese vieler antimikrobiell wirkender Bakteriozine läuft bei den sie produzierenden Mikroorganismen nicht konstitutiv ab, sondern wird durch verschiedene Umweltreize induziert. Bei diesem Induktionsprozess ist das so genante Quorum sensing von großer Bedeutung. Als Quorum sensing bezeichnet man einen Prozess von interzellulärer Kommunikation zwischen Bakterien, durch den die Mikroorganismen ihre Populationsdichte feststellen, indem sie diffusible, niedermolekulare Signalmoleküle bilden, die die Expression verschiedener Gene regulieren. Im Falle von Mikrobenpopulationen bewirkt Quorum sensing, dass erst ab einer bestimmten Populationsdichte diverse sekundäre Stoffwechselwege induziert werden, z. B. diejenigen, die für die Bildung von

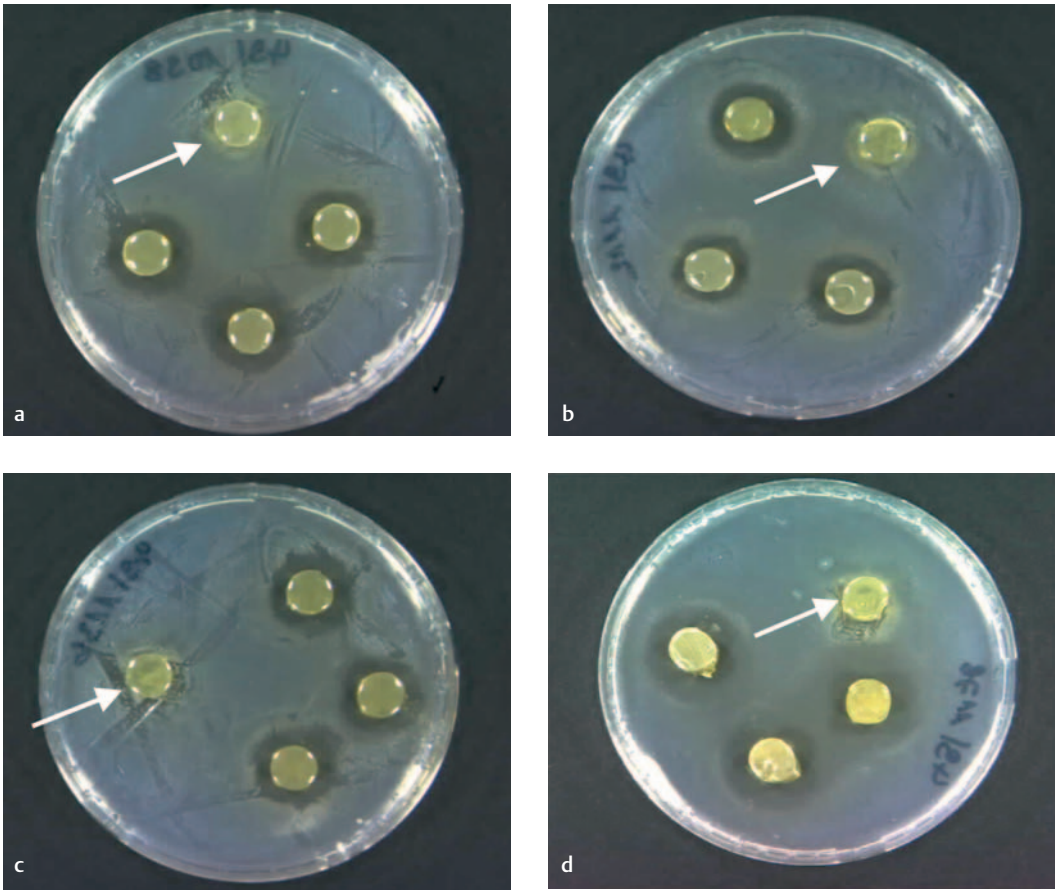

Abb. 5.2a – d Bakterieller Antagonismus-Test *in vitro*. Hemmhofbildung verschiedener *Lactobacillus*-Stämme gegen *Enterococcus faecalis* (**a**: *L. crispatus*, **b**: *L. jensenii*, **c**: *L. gasseri*, **d**: *L. acidophilus*). Eine Suspension von *E. faecalis* wird ganzflächig auf die Nährböden aufgetragen und mit Agarblöckchen, in die die lebenden Laktobazillen eingebettet sind, beschickt. Ein Blöckchen (Pfeil) enthält nur Kulturmedium (= Negativkontrolle). Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C erhält man obige Ergebnisse (Aufnahmen: D. Janosch, T. Grela, Herdecke).

aus: Schulze u. a., Probiotika (ISBN 9783830453567) © 2008 Hippokrates Verlag

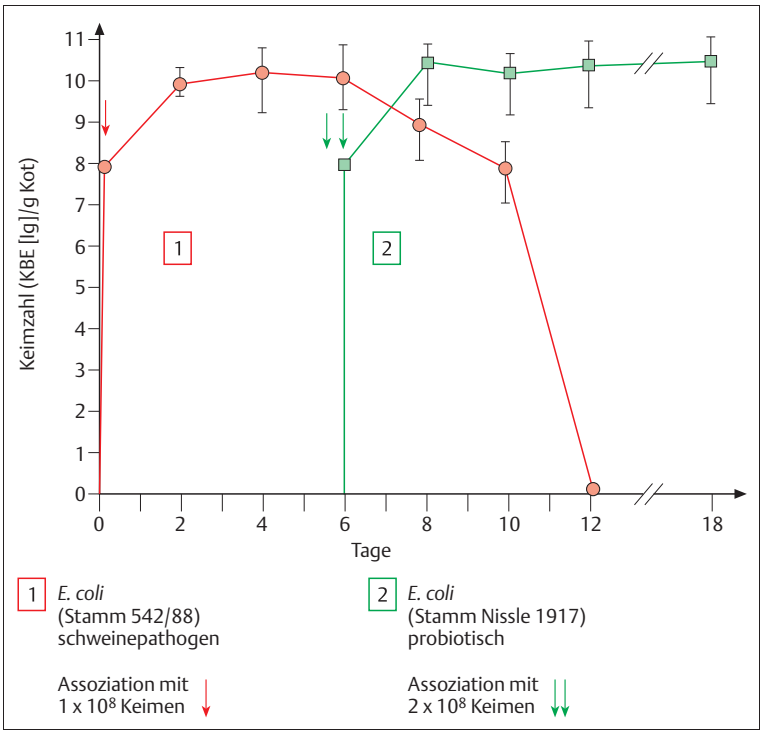

Abb. 5.3 Die antagonistische Wirkung von *E. coli* Stamm Nissle 1917 *in vivo* gegenüber einem für Schweine pathogenen *E.-coli*-Stamm nach oraler Verabreichung an keimfreie Ferkel (sequenzielle Verabreichung: 1 = pathogener Stamm [Ec542/88]; 2 = probiotischer Stamm [EcN]) (nach SCHULZE ET AL., 1992).

Mikrozinen und anderen Bakteriozinen zuständig sind. Außer der Bakteriozine-Produktion werden in verschiedenen Bakterienarten weitere wichtige Prozesse durch Quorum sensing reguliert. Dazu gehören die Bildung anderer Sekundärmetaboliten, Biofilmbildung, Sporulation, Symbiose und Virulenz (WHITEHEAD ET AL., 2001). Bei Bakterien wird das Quorum sensing durch die Sezernierung verschiedenartiger Signalmoleküle, sog. Autoinducer, gesteuert. Bei gramnegativen Bakterien sind dies vor allem diverse N-Acyl-Homoserinlaktone (**Abb. 5.4a**), bei grampositiven Bakterien zumeist verschiedene modifizierte Peptide (**Abb. 5.4b**) (KELLER & SURETTE, 2006; READING & SPERANDIO, 2006; WATERS & BASSLER, 2005).

INFO

Der Begriff Quorum sensing leitet sich ab von einem Prozedere bei Abstimmungen im Senat des alten Roms und bedeutete, dass im Plenum eine Mindestzahl von abstimmungsberechtigten Senatoren anwesend sein musste, um ein Abstimmungsergebnis gültig werden zu lassen.

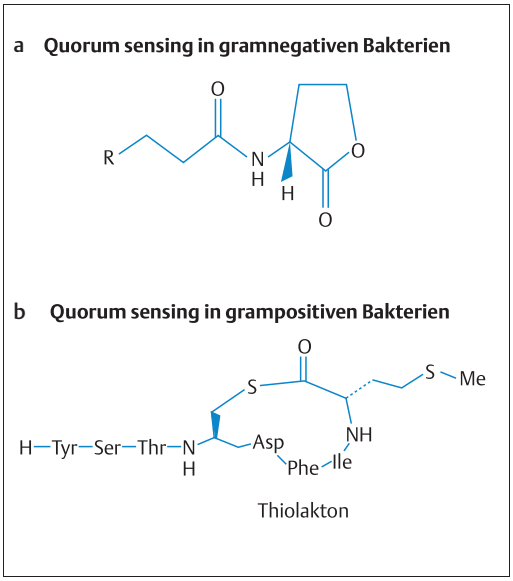

Abb. 5.4 a, b Gramnegative Bakterien verwenden N-Acyl-Homoserin-Laktone als Autoinducer-Signalmoleküle (**a**). Modifizierte Peptide dienen bei grampositiven Bakterien als Signalmoleküle beim Quorum sensing (Beispiel: Peptid mit Thiolakton-Ring) (**b**).

aus: Schulze u. a., Probiotika (ISBN 9783830453567) © 2008 Hippokrates Verlag

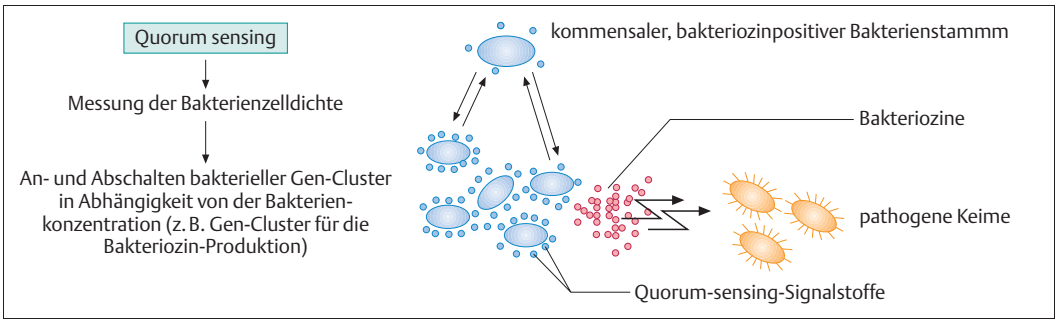

Abb. 5.5 Schematische Darstellung der mikrobiellen Kommunikation kommensaler Bakterien durch Quorum sensing und Interferenz mit enteropathogenen Infektionserregern mittels Bakteriozinproduktion im Ökosystem Darm.

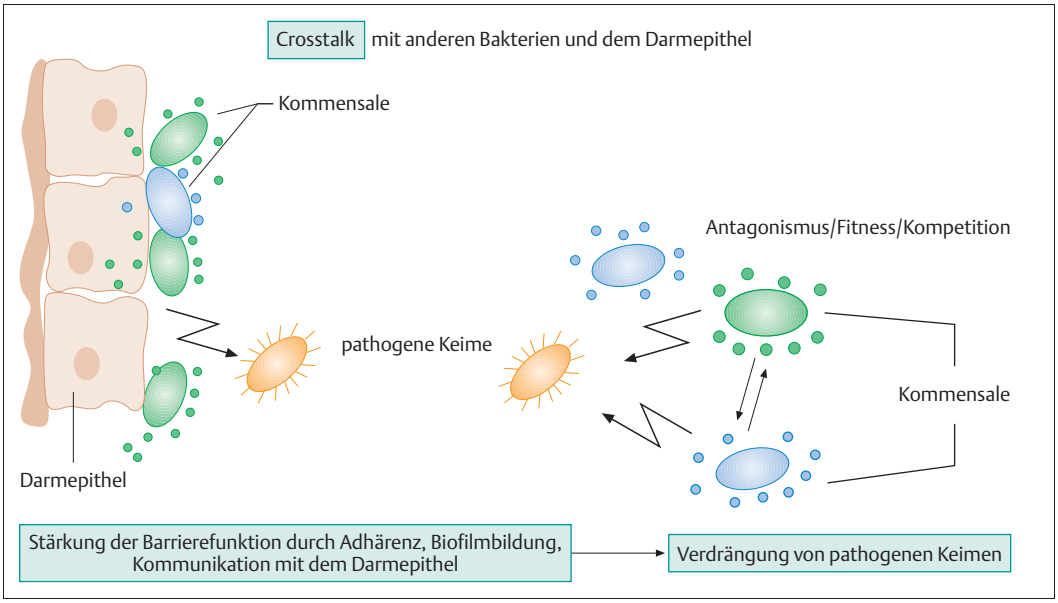

Abb. 5.6 Mikrobielle Kommunikation und Interaktionen mit pathogenen Keimen und den mukosalen Epithelzellen im Ökosystem Darm.

Der Zusammenhang zwischen Quorum sensing und mikrobiellem Antagonismus im Darm ist in Abb. 5.5 und Abb. 5.6 schematisch dargestellt.

Auch die Besiedlung der dem Darmepithel lumenseitig aufgelagerten Mucus-Sperrschicht durch probiotische Bakterienstämme (Kirjavainen et al., 1998) sowie die Besetzung von Haftstellen für pathogene Mikroorganismen bzw. die Verdrängung der Infektionskeime aus ihrer Rezeptorbindung am Epithel werden als antiinfektiöse Wirkmechanismen diskutiert (Coconnier et al., 1992; Gopal et al., 2001; Michail & Abernathy, 2002; Neeser et al., 2000; Osset et al., 2001; Tuomola et al., 1999).

Zu den indirekten antimikrobiellen Wirkungen von Probiotika ist u. a. die Stimulierung der intestinalen Muzin-Genexpression und damit der Darmschleim-Produktion zu rechnen, wodurch die Interaktion pathogener Keime mit ihren Rezeptoren auf den Epithelzellen erschwert wird (Deplancke & Gaskins, 2001; Mack et al., 1999). Durch Einwirkung des Probiotikums auf die Epithelzellen ist beispielsweise auch die (indirekte) Hemmwirkung von *E. coli* Nissle 1917 gegen verschiedene enteroinvasive Keime zu erklären (Altenhöfer et al., 2004; Boudeau et al., 2003; Otte & Podolsky, 2004; Abb. 5.7 und Abb. 5.8).

aus: Schulze u. a., Probiotika (ISBN 9783830453567) © 2008 Hippokrates Verlag