

**Wirkungen von Probiotika bei Gesunden und Patienten mit atopischer
Dermatitis - Ergebnisse aus Humaninterventionsstudien**



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

*vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena*

*von Diplom-Trophologin Andrea Rößler (geb. Klein)
geboren am 10.06.1976 in Friedrichroda*

Gutachter

Prof. Dr. G. Jahreis, Jena

Prof. Dr. H. Krammer, Mannheim

PD Dr. R. Schubert, Jena

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.10.2008

*Meinen Söhnen
Richard und Arthur*

Inhalt

<i>Tabellen</i>	<i>IV</i>
<i>Abbildungen</i>	<i>VI</i>
<i>Abkürzungen</i>	<i>VIII</i>
1 Einleitung und Zielstellung	1
2 Theoretische Grundlagen	3
2.1 Begriffsbestimmung und Anforderungen an Probiotika	3
2.1.1 Definition.....	3
2.1.2 Selektionskriterien.....	3
2.2 Mikrobiota und Immunsystem	5
2.2.1 Entwicklung und Zusammensetzung der Mikrobiota.....	5
2.2.2 Funktionen der Bakterien des Gastrointestinaltrakts.....	7
2.2.3 Einfluss von probiotischen Bakterien auf die Funktionen der Mikrobiota.....	8
2.2.4 Das darmassoziierte Immunsystem.....	10
2.2.5 Weitere Kommunikationswege zwischen Bakterien und Immunsystem.....	12
2.3 Probiotische Wirkungen	13
2.3.1 Immunsystem.....	13
2.3.2 Cholesterolfstoffwechsel.....	14
2.3.3 Antigenotoxische Effekte.....	15
2.4 Probiotika und atopische Dermatitis	16
2.4.1 Ursachen und Entstehung der atopischen Dermatitis.....	16
2.4.2 Indikationen für die Anwendung von Probiotika.....	17
2.4.3 Einsatz von Probiotika bei weiteren Erkrankungen.....	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Humanstudie I	21
3.1.1 Charakterisierung des Joghurts.....	21
3.1.2 Studienteilnehmer.....	21
3.1.3 Studiendesign.....	21
3.1.4 Probenmanagement.....	22
3.1.4.1 Serum.....	22
3.1.4.2 Stuhl.....	23

3.1.4.3	Faeceswasser	23
3.1.4.4	Urin.....	23
3.2	Humanstudie II.....	23
3.2.1	Charakterisierung des Joghurtgetränks.....	23
3.2.2	Studienteilnehmer.....	24
3.2.3	Studiendesign	24
3.2.4	SCORAD.....	25
3.2.5	Probenmanagement	26
3.3	Analytik	26
3.3.1	Nährstoffe.....	26
3.3.1.1	Trockensubstanz und Asche	26
3.3.1.2	Protein.....	26
3.3.1.3	Fett.....	26
3.3.2	Stuhl	27
3.3.2.1	pH-Wert.....	27
3.3.2.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	27
3.3.2.3	Quantitative Real-Time PCR.....	29
3.3.2.4	Flüchtige Fettsäuren	31
3.3.2.5	Comet Assay.....	32
3.3.3	Urin.....	33
3.3.4	Blut.....	34
3.3.4.1	Serumlipide.....	34
3.3.4.2	Immunologische Parameter	34
3.4	Statistik.....	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Humanstudie I.....	38
4.1.1	Nährstoffaufnahme und -ausscheidung.....	38
4.1.2	Nachweis von <i>L. acidophilus</i> und <i>B. lactis</i> im Stuhl.....	39
4.1.3	Ausscheidung der flüchtigen Fettsäuren	40
4.1.4	Cyto- und Genotoxizität des Faeceswassers.....	41
4.1.5	Serumlipide	42
4.1.6	Immunologische Parameter.....	43
4.1.6.1	Zelluläre Immunabwehr.....	43
4.1.6.2	Phagocytische Aktivität und oxidativer Burst	44
4.2	Humanstudie II.....	45

4.2.1	Auswertung der Ernährungsprotokolle	45
4.2.2	Nachweis der probiotischen Kulturen im Stuhl.....	46
4.2.2.1	<i>L. paracasei</i> mittels FISH.....	46
4.2.2.2	<i>L. paracasei</i> , <i>L. acidophilus</i> und <i>B. lactis</i> mittels qRT-PCR.....	47
4.2.3	Flüchtige Fettsäuren und pH-Wert im Stuhl	49
4.2.4	Cyto- und genotoxische Untersuchungen mit Faeceswasser.....	50
4.2.5	Konzentrationen der Serumlipide.....	52
4.2.6	SCORAD.....	53
4.2.7	Immunologische Parameter im Blut.....	54
4.2.7.1	Parameter der zellulären Immunabwehr	54
4.2.7.2	Phagozytoseaktivität und oxidativer Burst	57
4.2.7.3	Cytokine.....	58
4.2.7.4	ECP, CRP, MDC, und sE-Selectin	58
4.2.7.5	Immunglobulin E.....	59
5	<i>Diskussion</i>	61
5.1	Nährstoffzufuhr und -exkretion	61
5.2	Detektion der probiotischen Kulturen im Stuhl	61
5.3	Probiotika und die Konzentration flüchtiger Fettsäuren.....	70
5.4	Probiotika und Genotoxizität	72
5.5	Einfluss der Probiotika auf den Cholesterolmetabolismus.....	76
5.6	Einflussnahme auf das Hautbild bei atopischer Dermatitis	78
5.7	Wirkungen der Probiotika auf das Immunsystem	81
5.7.1	Zelluläre Immunabwehr	82
5.7.2	Humorale Immunabwehr.....	88
6	<i>Zusammenfassung</i>	93
7	<i>Summary</i>	97
	<i>Literatur</i>	XI
	<i>Anhang</i>	XLIII

Selbständigkeitserklärung

Publikationen

Curriculum vitae

Danksagung

Tabellen

Tab. 2-1:	<i>Klinische Wirkungen von Probiotika bei atopischer Dermatitis</i>	19
Tab. 3-1:	<i>Daten der verwendeten Oligonucleotidsonden</i>	28
Tab. 3-2:	<i>Technische Daten der Filtersätze</i>	29
Tab. 3-3:	<i>Übersicht der Temperaturprogramme für die qRT-PCR</i>	31
Tab. 3-4:	<i>Gaschromatographische Bedingungen für die Bestimmung flüchtiger Fettsäuren im Stuhl</i>	32
Tab. 4-1:	<i>Mittlere Nährstoffaufnahme während der standardisierten Kost</i>	38
Tab. 4-2:	<i>Parameter der faecalen Ausscheidung</i>	38
Tab. 4-3:	<i>Parameter der renalen Ausscheidung</i>	39
Tab. 4-4:	<i>Prozentuale Anteile von <i>L. acidophilus</i> und <i>B. lactis</i> an den Gesamtbakterien im Stuhl</i>	39
Tab. 4-5:	<i>Konzentration flüchtiger Fettsäuren im Stuhl [$\mu\text{mol/g}$]</i>	40
Tab. 4-6:	<i>Genotoxizität im Faeceswasser</i>	42
Tab. 4-7:	<i>Konzentrationen der Serumlipide [mmol/l] und deren Verhältnisse</i>	42
Tab. 4-8:	<i>Leukocytenfraktionen im Blut [% der Leukocyten]</i>	43
Tab. 4-9:	<i>Einfluss von <i>L. acidophilus</i> 74-2 und <i>B. lactis</i> 420 auf die Expression verschiedener Lymphocytenoberflächenmarker im Plasma</i>	43
Tab. 4-10:	<i>Energie- und Nährstoffaufnahme während Humanstudie II</i>	45
Tab. 4-11:	<i>Prozentuale Anteile von <i>L. paracasei</i> an den Gesamtbakterien im Stuhl</i>	46
Tab. 4-12:	<i>Quantifizierung der probiotischen Kulturen <i>L. paracasei</i>, <i>L. acidophilus</i> und <i>B. lactis</i> sowie Gesamtzahl der Bakterien im Stuhl [kbE/g]</i>	48
Tab. 4-13:	<i>Konzentration flüchtiger Fettsäuren im Stuhl [$\mu\text{mol/g}$]</i>	50
Tab. 4-14:	<i>pH-Werte im Stuhl</i>	50
Tab. 4-15:	<i>Genotoxizität im Faeceswasser</i>	51
Tab. 4-16:	<i>Cholesterol- und Triacylglycerolkonzentrationen im Serum [mmol/l]</i>	52
Tab. 4-17:	<i>Verhältnisse der Serumlipide</i>	52
Tab. 4-18:	<i>Einfluss der Supplementation auf das Ausmaß, die Intensität und subjektive Symptome der atopischen Dermatitis</i>	53
Tab. 4-19:	<i>Leukozytenfraktionen im Blut [% der Leukocyten]</i>	55
Tab. 4-20:	<i>Einfluss von <i>L. paracasei</i> Lpc-37, <i>L. acidophilus</i> 74-2 und <i>B. lactis</i> 420 auf die Expression verschiedener Lymphocytenoberflächenmarker</i>	55
Tab. 4-21:	<i>Phagocytose- und Burstaktivität der Monocyten und neutrophilen Granulocyten [mittlere Fluoreszenzintensität]</i>	57

<i>Tab. 4-22: Konzentrationen von IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und IL-16 im Serum [pg/ml] in Abhängigkeit von der Intervention mit L. paracasei Lpc-37, L. acidophilus 74-2 und B. lactis 420</i>	<i>58</i>
<i>Tab. 4-23: Serumkonzentrationen von ECP, MDC und sE-Selectin</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 4-24: IgE-Konzentration im Serum der gesunden Probanden und Patienten mit atopischer Dermatitis [kU/l]</i>	<i>59</i>
<i>Tab. 5-1: Übersicht zu den Anteilen von Bifidobakterien und Lactobacillen [% EUB338] im Stuhl gesunder Erwachsener</i>	<i>62</i>
<i>Tab. 5-2: Gehalte probiotischer Bakterien in den Faeces nach vorangegangener Supplementation.....</i>	<i>67</i>
<i>Tab. 5-3: Studien zum Einfluss probiotischer Bakterien auf die Konzentration flüchtiger Fettsäuren im Stuhl</i>	<i>72</i>
<i>Tab. 5-4: Humanstudien zur Evaluation der Wirkung probiotischer Bakterien auf den Cholesterolspiegel im Serum</i>	<i>78</i>
<i>Tab. A-1: Ein- und Ausschlusskriterien für die gesunden Probanden.....</i>	<i>XLIII</i>
<i>Tab. A-2: Ein- und Ausschlusskriterien für Patienten mit atopischer Dermatitis</i>	<i>XLIV</i>
<i>Tab. A-3: CD-Nomenklatur und Referenzbereiche.....</i>	<i>XLVI</i>

Abbildungen

<i>Abb. 2-1: Zusammensetzung der Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt beim erwachsenen Menschen</i>	<i>6</i>
<i>Abb. 2-2: Mechanismen probiotischer Aktivitäten</i>	<i>9</i>
<i>Abb. 2-3: Aufbau des GALT und Wege der Antigenaufnahme im Darm.....</i>	<i>11</i>
<i>Abb. 2-4: Entwicklung des T_{H1}- bzw. T_{H2}-typischen Phänotyps.....</i>	<i>17</i>
<i>Abb. 3-1: Studiendesign Humanstudie I</i>	<i>22</i>
<i>Abb. 3-2: Studiendesign Humanstudie II</i>	<i>25</i>
<i>Abb. 3-3: Mikroskopische Aufnahmen der Bakterien im Stuhl nach der Färbung mit DAPI (A) und das gleiche Sichtfeld (B) aufgenommen mit dem spezifischen Filter für Cy3 nach der Hybridisierung mit der Sonde EUB338.....</i>	<i>29</i>
<i>Abb. 4-1: Einfluss der Intervention mit probiotischem Joghurt auf die individuellen Anteile von L. acidophilus und B. lactis an den Gesamtbakterien im Stuhl....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 4-2: Vitalität der HT29c-Zellen vor und nach der Inkubation mit Faeceswasser aus der Probiotika- und Placebophase.....</i>	<i>41</i>
<i>Abb. 4-3: Einfluss von L. acidophilus 74-2 und B. lactis 420 auf die Anteile phagozytose- und burstaktiver Granulocyten und Monocyten</i>	<i>44</i>
<i>Abb. 4-4: Prozentualer Anteil der Hauptnährstoffe an der Gesamtenergieaufnahme</i>	<i>45</i>
<i>Abb. 4-5: Einfluss der Intervention mit dem probiotischen Joghurtgetränk auf die individuellen Anteile von L. paracasei an den Gesamtbakterien im Stuhl</i>	<i>47</i>
<i>Abb. 4-6: Prozentuale Anteile von L. paracasei, L. acidophilus und B. lactis an der Gesamtkeimzahl im Stuhl detektiert mittels qRT-PCR</i>	<i>49</i>
<i>Abb. 4-7: Einfluss der Inkubation mit Faeceswasser auf die Vitalität der HT29c-Zellen</i>	<i>51</i>
<i>Abb. 4-9: Veränderung des Hautbildes nach acht Wochen in Abhängigkeit von der Intervention.....</i>	<i>53</i>
<i>Abb. 4-8: Entwicklung des SCORAD bei den Patienten.....</i>	<i>54</i>
<i>Abb. 4-10: Einfluss von L. paracasei Lpc-37, L. acidophilus 74-2 und B. lactis 420 auf die Expression von CD4⁺ und CD8⁺ sowie deren Verhältnis</i>	<i>56</i>
<i>Abb. 4-11: Einfluss der Intervention mit L. paracasei Lpc-37, L. acidophilus 74-2 und B. lactis 420 auf den Anteil phagozytierender bzw. oxidierender Monocyten und Granulocyten bei (A) den gesunden Teilnehmern und (B) den Patienten</i>	<i>57</i>

<i>Abb. 4-12: Serum-IgE-Konzentrationen im Studienverlauf bei IgE-assoziiierter AD und nicht-IgE-assoziiierter AD.....</i>	<i>60</i>
<i>Abb. 5-1: Einfluss der Supplementationsfolge auf die faecalen Anteile von L. acidophilus und B. lactis.....</i>	<i>64</i>
<i>Abb. 5-2: Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von IL-16 und MDC im Serum bei Patienten mit leichter bis moderater AD.....</i>	<i>91</i>
<i>Abb. A-1: SCORAD-Erfassungsbogen</i>	<i>XLV</i>

Abkürzungen

AD	Atopische Dermatitis
BIA	Bioelektrische Impedanzanalyse
BMI	Body Mass Index
CD	Cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CpG-DNA	Cytosin-phosphatidyl-Guanin Desoxyribonukleinsäure
Cy3	Sulphoindocyanin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECP	Eosinophiles cationisches Protein
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EUB	Eubacteria Sonde
FACS	Fluorescent Analysing Cell Sorting
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FW	Faeceswasser
GALT	gut-associated lymphoid tissue (darmassoziiertes lymphatisches Gewebe)
HDL	High density lipoprotein
HDL-C	HDL-Cholesterol
HL	Hypercholesterolämiker
HLA-DR	Humaner Leukocyten Antikörper
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kbE	Kolonie-bildende Einheiten
Lba	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Sonde
LDL	Low density lipoprotein
LDL-C	LDL-Cholesterol
LW420c+2	<i>Bifidobacterium lactis</i> Sonde
MDC	Macrophagen-derived Chemokin
MHC	Major Histokompatibilitäts-Komplex
MLK	Mesenteriale Lymphknoten
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

NK	Natürliche Killerzellen
NL	Normolipidämiker
NOD	Nucleotid-bindende Oligomerisation-Domäne
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (periphere mononukleäre Blutzellen)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
PP	PEYERSche Plaques
PRR	Pattern recognition receptor
qRT-PCR	quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RPMI	Roswell Park Memorial Institut (Flüssigmedium)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
SCFA	Short-chain fatty acids, kurzkettige Fettsäuren
SCORAD	Scoring Atopic Dermatitis
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
sIgA	sekretorisches Immunglobulin A
TAG	Triacylglycerol
TC	Total cholesterol (Gesamt-Cholesterol)
TI	Tail Intensity
T _H 1	Helferzellen vom Typ 1
T _H 2	Helferzellen vom Typ 2
TLR	Toll-like Rezeptor
T _{Reg}	Regulatorische T-Zellen
VDLUFA	Verband deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten
Wo	Wochen

1 Einleitung und Zielstellung

„The dependence of the intestinal microbes on the food makes it possible to adopt measures to modify the flora in our bodies and to replace the harmful microbes by useful microbes” [METCHNIKOFF 1907].

Die Geschichte der gesundheitsfördernden Eigenschaften von fermentierten Milchprodukten lässt sich über 1000 Jahre zurückverfolgen. So wird in einer persischen Version des Alten Testaments (Genesis 18:8) beschrieben, dass Abraham seine Fruchtbarkeit und sein langes Leben dem regelmäßigen Verzehr von Joghurt zu verdanken hatte [SCHREZENMEIR & DE VRESE 2001]. Zu Beginn des 20. Jh. referierte der russische Nobelpreisträger E. Metchnikoff in seinem Werk "The prolongation of life" von dem positiven Einfluss milchsäureproduzierender Bakterien auf die Gesundheit [METCHNIKOFF 1907].

Im Unterschied zu herkömmlichen Joghurtkulturen weisen probiotische Bakterien Resistenzen gegenüber Magen- und Gallensäuren und den Verdauungsenzymen auf. Demzufolge erreichen die Probiotika den Intestinaltrakt als primäres Zielorgan aktiv und in ausreichender Konzentration, um dort durch die Modulierung metabolischer, physiologischer und immunologischer Prozesse potentielle, gesundheitsfördernde Effekte zu vermitteln. Am häufigsten werden Vertreter der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium* einzeln oder in Kombination in probiotischen Produkten eingesetzt. Klinische Studien haben gezeigt, dass durch den Einsatz von Probiotika bei gesunden Probanden, in Stresssituationen, oder bei verschiedenen Krankheitsbildern wie z. B. Diarrhöen, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Atopischer Dermatitis (AD) oder Erkältungskrankheiten positive Effekte erzielt werden konnten [GOLDIN & GORBACH 2008, SUOMALAINEN et al. 2006, OLIVARES et al. 2006a, MARCOS et al. 2004, EWASCHUK & DIELEMAN 2006, VILJANEN et al. 2005b, WESTON et al. 2005, DE VRESE et al. 2005a].

Die Inzidenz der AD hat in den letzten Jahrzehnten sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen drastisch zugenommen [GALLI et al. 2003]. Neben der genetischen Disposition werden die verbesserten hygienischen Bedingungen in den Industrieländern und der daraus resultierende, verminderte Kontakt mit Mikroorganismen („Hygiene-Hypothese“) als mögliche Ursache für die steigende Prävalenz diskutiert [FLOHR et al. 2005, RAUTAVA et al. 2004]. In diesem Kontext rücken die probiotischen Bakterien in den Blickpunkt des Interesses, um als „nützliche“ Mikroorganismen der mangelnden Stimulation des Immunsystems entgegenzuwirken. Ferner existieren Hinweise, dass sich die Mikrobiota von Kin-

dern mit AD und von der Mikrobiota gesunder Kinder hinsichtlich ihrer Gehalte an Lactobacillen und Bifidobakterien unterscheidet [WATANABE et al. 2003]. Während eine Reihe klinischer Studien belegt, dass die regelmäßige Aufnahme von Probiotika präventiv auf das Auftreten einer AD bei Kindern mit erhöhtem Risiko wirkt bzw. die Symptome kindlicher AD deutlich verbessert [KALLIOMÄKI et al. 2003, RAUTAVA et al. 2002, WESTON et al. 2005], ist die Studienlage zur therapeutischen Wirkung von probiotischen Bakterien im Erwachsenenalter ungenügend.

Probiotische Eigenschaften werden stammspezifisch vermittelt. Deswegen ist es erforderlich, Effekte für jedes Bakterium einzeln bzw. Kombinationen mehrerer Bakterien in placebokontrollierten Doppelblindstudien zu untersuchen [BGVV 2000]. Vergleichende Untersuchungen einzelner bzw. von Kombinationen probiotischer Bakterien zeigten in Tierversuchen deutlichere Effekte als die Einzelstämme, insbesondere hinsichtlich der Stimulation des Immunsystems [LANNING et al. 2000, KELLY et al. 2005]. Aus diesem Grund wurden auch in der vorliegenden Arbeit zwei bzw. drei Stämme für die Studien ausgewählt. Die Stämme *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 wurden aufgrund ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit gegen *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* sowie der guten Adhäsionseigenschaften von *B. lactis* 420 eingesetzt [OUWEHAND et al. 1999b]. Für die zweite Studie wurde diese Kombination mit *L. paracasei* ergänzt, da für diese Species viel versprechende Ergebnisse bezüglich der Modulation des Immunsystems existieren [MALDONADO GALDEANO & PERDIGÓN 2006, PARRA et al. 2004a, JAHREIS et al. 2002].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, erstmals die Wirkung von *Lactobacillus acidophilus* 74-2, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DGCC 420 (*B. lactis* 420) und *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 in Kombination, unter besonderer Berücksichtigung des Immunsystems, beim Menschen zu untersuchen. Einen weiteren Schwerpunkt stellte der Nachweis der verabreichten Probiotika im Stuhl mit molekularbiologischen Methoden dar, um Aussagen über deren Kolonisationsfähigkeiten treffen zu können. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde auf die Wirkung der probiotischen Bakterien bei Probanden mit unterschiedlichem Immunstatus fokussiert. Die Probandengruppe umfasste erwachsene Patienten mit einer leichten bis moderaten Ausprägung der AD und gesunde Teilnehmer als Kontrolle. Das primäre Ziel dieser Studie bestand darin, die Modifikation des Immunsystems in Abhängigkeit vom jeweiligen Immunstatus nachzuweisen und die Ausprägung der AD durch die Probiotika zu mildern. Außerdem sollte geklärt werden, inwieweit durch die Supplementation die metabolische Aktivität der Mikrobiota, die Genotoxizität des Faeceswassers und der Cholesterolfstoffwechsel beeinflusst werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Begriffsbestimmung und Anforderungen an Probiotika

2.1.1 Definition

Der Begriff „Probiotika“ ist griechischer Herkunft und bedeutet „*pro bios* – für das Leben“. Bis dato existieren zahlreiche Definitionen. Im englischen Sprachraum wird FULLER [1989] am häufigsten zitiert:

„Probiotics are the microbial feed supplements, which beneficially affect the host by improving its intestinal microbial balance.“

Die Arbeitsgruppe „Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln“ am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) hat folgende Definition festgelegt, die im wesentlichen mit der von Fuller übereinstimmt, jedoch den Aspekt der wirksamen Dosis mit einbezieht [BGVV 2000]:

„Probiotika sind definierte lebende Mikroorganismen, die in ausreichender Menge in aktiver Form in den Darm gelangen und hierbei positive gesundheitliche Wirkungen erzielen.“

2.1.2 Selektionskriterien

Um probiotische Stämme mit potenziellen gesundheitsfördernden Eigenschaften von herkömmlichen Bakterienstämmen unterscheiden zu können, sind Selektionskriterien notwendig. Folgende Anforderungen werden an probiotische Mikroorganismen gestellt [OUWEHAND et al. 1999a, BGVV 2000, FAO/WHO 2002]:

Genaue taxonomische Identifizierung

Die Eigenschaften probiotischer Mikroorganismen sind stammspezifisch. Eine exakte Identifikation eines Stammes setzt die Klassifizierung hinsichtlich Gattung und Species voraus. Dies ist notwendig, um potentielle gesundheitsfördernde Effekte eindeutig zuzuordnen sowie zum Nachweis der probiotischen Kulturen. Der Nachweis sollte mit gut validierten Methoden erfolgen, die sowohl auf phänotypischen (morphologischen, physiologischen und biochemischen) Merkmalen als auch auf Untersuchungen mit molekularbiologischen Methoden (z. B. Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE), DNA-DNA-Hybridisierung, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)) basieren [FAO/WHO 2002].

Apathogen, nicht toxisch

Die gesundheitliche Unbedenklichkeit für die Anwendung von probiotischen Bakterien in Lebensmitteln muss gewährleistet sein. Aus diesem Grund muss jeder Stamm vor dem

Einsatz in Nahrungsmitteln eine Unbedenklichkeitsprüfung durchlaufen, die folgende Parameter beinhaltet (Auswahl): Ausschluss von übertragbaren Antibiotikaresistenzen, der Bildung biogener Amine, der Aktivierung von Procancerogenen, der Aktivierung der Thrombocytenaggregation, von Mucinabbau sowie von hämolytischen Aktivitäten.

Bisher sind keine Infektionen bekannt, die auf den Verzehr von Lactobacillen oder Bifidobakterien mit Lebensmitteln zurückzuführen waren [BGVV 2000].

Magen- und Gallensäurenresistenz

Die Stabilität gegenüber Magen- und Gallensäuren sowie den Verdauungsenzymen ist *per definitionem* eine Grundvoraussetzung für das Überleben der Magen-Darm-Passage. Die probiotischen Kulturen müssen den Darm als Zielorgan in aktiver Form und in ausreichender Konzentration erreichen, um ihre Wirkungen entfalten zu können. Es existieren jedoch einige Hinweise, dass auch nicht-vitale Zellen probiotische Effekte vor allem auf das Immunsystem ausüben können. Hervorgerufen werden diese Wirkungen durch Zellkomponenten wie DNA bzw. Zellwandbestandteile [TAKAHASHI et al. 2006, HIROSE et al. 2006].

Adhäsion an die Mucosaoberfläche

Als wesentliche Voraussetzung für die Wirkungen probiotischer Mikroorganismen gilt die Fähigkeit der Adhäsion an den Mucus des Darms bzw. an die darunter liegenden Darmepithelzellen und die daraus resultierende vorübergehende Kolonisation. Speziell für die Ausübung möglicher immunmodulatorischer Effekte spielt die Interaktion der probiotischen Mikroorganismen mit den Zellen des gastrointestinalen Immunsystems (gut-associated lymphoid tissue - GALT) eine entscheidende Rolle. Gute Adhäsionseigenschaften können in einem verlängerten Aufenthalt der Probiotika im Darm resultieren. Dies kann sich günstig auf das Wachstum und die Stoffwechselaktivität der probiotischen Bakterien auswirken. Die Belegung von Bindungsstellen bzw. Rezeptoren kann das Eindringen von Pathogenen, Viren und Toxinen in die Mucosazellen hemmen und somit die Barrierefunktion der Mucosa unterstützen [OUWEHAND et al. 2001, SALMINEN et al. 2005]

Produktion antimikrobieller Substanzen

Die Produktion antimikrobieller Substanzen (Bacteriocine, organische Säuren, Wasserstoffperoxid) durch Probiotika begünstigt deren Wachstum im Darm und inhibiert parallel die Vermehrung potentiell pathogener Mikroorganismen [DUNNE et al. 2001].

Dokumentation der Wirksamkeit und Sicherheit

Die Durchführung randomisierter, doppelblinder, placebokontrollierter Humanstudien mit genau definierten Studienzielen ist notwendig, um gesundheitsfördernde Wirkungen einzelner probiotischer Stämme oder deren Kombination im Endprodukt (z. B. Joghurt, Getränk) zu dokumentieren. Die Publikation der Ergebnisse soll in wissenschaftlichen, von Experten begutachteten Zeitschriften erfolgen [BGVV 2000].

Erhalt der probiotischen Eigenschaften während der Produktion und Lagerung

Damit die probiotischen Eigenschaften der Mikroorganismen erhalten bleiben, muss deren Überlebensfähigkeit während des Produktionsprozesses und der Lagerhaltung gewährleistet sein. Zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums müssen die probiotischen Kulturen in der als wirksam beschriebenen Konzentration nachweisbar sein.

Diese Anforderungen erfüllen vor allem Vertreter der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*. Breite Anwendung in probiotischen Produkten finden derzeit *L. casei*, *L. paracasei*, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *B. lactis* und *B. bifidum* sowie *S. cerevisiae* und *S. boulardi* [MONTROSE & FLOCH 2005, WENG & WALKER 2006, SALMINEN et al. 2006, GOLDIN & GORBACH 2008]. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten probiotischen Stämme *L. acidophilus* 74-2, *B. lactis* 420 und *L. paracasei* Lpc-37 entsprechen diesen Kriterien [ALANDER et al. 2001].

2.2 Mikrobiota und Immunsystem

Die mikrobielle Besiedlung des Gastrointestinaltrakts trägt entscheidend zur Ausbildung der spezifischen und unspezifischen Immunantwort des darmassoziierten Immunsystems bei. Probiotische Wirkungsmechanismen basieren u. a. auf der Modulation der intestinalen Mikrobiota.

2.2.1 Entwicklung und Zusammensetzung der Mikrobiota

Über 400 verschiedene, kultivierbare Species kolonisieren den menschlichen Darm, wobei ca. 99 % der gesamten Population auf 30 - 40 Species entfallen [GILL & GUARNER 2004, GUARNER 2006]. Aufgrund ihrer metabolischen Aktivität und der kontinuierlichen Interaktion mit dem Darmepithel, dem mucosalen Immunsystem und dem enterischen Nervensystem sind sie in der Lage, physiologische Wirkungen zu vermitteln.

Die Ausbildung der Mikrobiota beginnt *post partum*, wobei Unterschiede in Abhängigkeit von der Ernährungsform des Säuglings zu verzeichnen sind. Während die Mikrobiota ge-

stillter Säuglinge von Bifidobakterien dominiert wird, weisen Formula-ernährte Säuglinge mit *Bacteroides*, *Clostridium* und *Streptococcus ssp.* eine komplexere Zusammensetzung der Mikrobiota auf. Mit der Umstellung auf normale Kost adaptiert sich die kindliche Mikrobiota allmählich an die des Erwachsenen [SALMINEN et al. 1998]. Die bakterielle Zusammensetzung des Darms verändert sich mit zunehmendem Alter. Untersuchungen der Mikrobiota älterer Bevölkerungsgruppen ergaben reduzierte Anteile an Bifidobakterien und einen Anstieg der Keimzahlen von Lactobacillen und Clostridien. [MUELLER et al. 2006, MITSUOKA et al. 1974].

Die mikrobielle Besiedlung des menschlichen Gastrointestinaltrakts variiert in den einzelnen Segmenten hinsichtlich der Keimzahl und der Zusammensetzung. Während der Magen und das Duodenum aufgrund des niedrigen pH-Werts von 2 - 4 und der kurzen Retentionszeit des Speisebreis sehr dünn besiedelt sind, nehmen die Konzentration und die Vielfalt der Mikroorganismen im Jejunum und Ileum stetig zu (Abb. 2-1). Im Colon ist die Mikroorganismenvielfalt mit 400 - 500 Arten und einer Konzentration von 10^{11} – 10^{12} kbE/g am höchsten. Im Magen und im oberen Dünndarm kommen hauptsächlich säure- und sauerstofftolerante Arten der Gattungen *Lactobacillus* und *Streptococcus* vor, während im Colon strikte Anaerobier wie *Bacteroides*, *Bifidobacterium* und *Eubacterium* sowie fakultative Anaerobier, z. B. *Lactobacillus ssp.*, *Streptococcus ssp.*, *Enterobacteriaceae* und Hefen dominieren [HOLZAPFEL et al. 1998, GUARNER 2006].

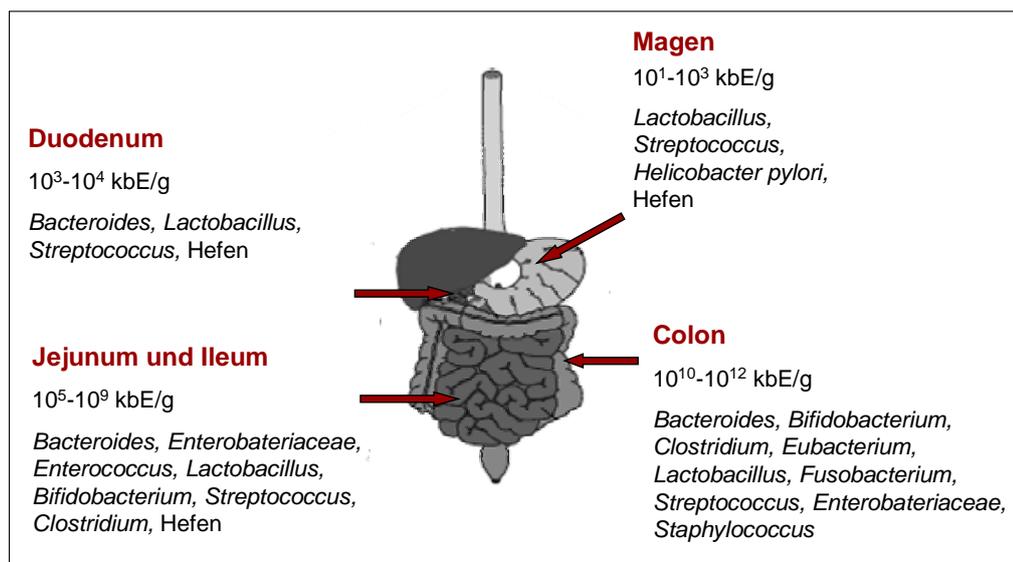


Abb. 2-1: Zusammensetzung der Mikrobiota im Gastrointestinaltrakt beim erwachsenen Menschen [modifiziert nach ISOLAURI et al. 2004]

Die Mikrobiota entwickelt sich in Abhängigkeit von den individuellen Lebens- und Umweltbedingungen (z. B. Zusammensetzung der maternalen Mikrobiota, Ernährung) und genetischen Faktoren [KIRJAVAINEN & GIBSON 1999]. Als Ergebnis besitzt jedes Individuum eine einzigartige Mikrobiota. So konnten auch bei homozygoten Zwillingen Unterschiede in der Zusammensetzung der Mikrobiota nachgewiesen werden [ISOLAURI et al. 2004, ZOETENDAL et al. 2001].

2.2.2 Funktionen der Bakterien des Gastrointestinaltrakts

Versuchstiere, die unter keimfreien Bedingungen aufgezogenen worden sind, weisen im Vergleich zu herkömmlich aufgewachsen Tieren anatomische und physiologische Aberrationen in verschiedenen Organen und Geweben auf. Diese Abweichungen verdeutlichen die Essentialität einer metabolisch aktiven Mikrobiota für eine normale Entwicklung [MACDONALD & MONTELEONE 2005, TANNOCK et al. 2001, FALK et al. 1998]. Die Mikroorganismen des Gastrointestinaltrakts erfüllen vielfältige physiologische Funktionen, die sich wie folgt unterteilen lassen [GUARNER 2006]:

Metabolische Funktionen

Die Stoffwechselaktivität der Bakterien erstreckt sich im proximalen Colon überwiegend auf die Fermentation unverdaulicher Kohlenhydrate wie Ballaststoffe, resistente Stärke und Oligosaccharide. Als wichtigste bakterielle Fermentationsprodukte entstehen die kurzkettigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat, neben geringen Mengen Valeriat und Caproat. Lactat, Succinat und Ethanol werden als Zwischenprodukte der Fermentation durch Darmbakterien weiter abgebaut [MACFARLANE & MACFARLANE 2003].

Im distalen Colon erfolgt überwiegend die Fermentation von Peptiden und Proteinen (z. B. endogenes Protein aus dem Mucus bzw. Enzymen, unverdautes Nahrungsprotein). Spezifische Fermentationsprodukte für den Proteinabbau sind die verzweigt-kettigen Fettsäuren *iso*-Valeriat und *iso*-Butyrat. Gleichzeitig entstehen Ammoniak, Amine, Phenole, Indole und Thiole als potentiell toxische Substanzen [MACFARLANE et al. 1986, SMITH & MACFARLANE 1996, MACFARLANE & MACFARLANE 1995].

Desweiteren sind bestimmte Bakteriengruppen, darunter Enterobakterien und Bifidobakterien in der Lage Vitamine wie z. B. Vitamin K, Folsäure, Biotin und Thiamin zu synthetisieren. Insgesamt lässt sich die metabolische Aktivität der Mikrobiota mit der Leber, als Zentralorgan des Stoffwechsels, vergleichen [ISOLAURI et al. 2004].

Trophische Funktionen

Die Darmbakterien tragen aufgrund ihrer Stoffwechselprodukte maßgeblich zur Proliferation und Differenzierung der Colonepithelzellen bei [GUARNER & MALAGELADA 2003]. Die von ihnen metabolisierten kurzkettigen Fettsäuren stellen die wichtigste Energiequelle für die Versorgung der Epithelzellen dar, wobei Butyrat als Hauptenergielieferant für die Colonepithelzellen dient [BROUNS et al. 2002]. *In vitro*-Studien mit humanen Colonkrebszelllinien zeigten, dass Butyrat in der Lage ist, die Zellproliferation in Krebszellen zu hemmen und deren Differenzierung zu induzieren [HAGUE et al. 1996]. Insofern ist Butyrat hinsichtlich der Prävention von Colonkrebs von besonderer Bedeutung.

Die Präsenz einer aktiven Mikrobiota ist essentiell für die Entwicklung und Reifung des Immunsystems. Steril aufgezogene Tiere besitzen im Vergleich zu herkömmlichen Tieren eine geringere Lymphocytenzahl in der *Lamina propria* und im Epithel, niedrige Immunglobulin-Konzentrationen im Serum sowie eine Vielzahl anatomischer Abweichungen (z. B. kleinere PEYERSche Plaques, geringere Organgewichte, verminderte Enzymaktivitäten). Werden sterile Tiere in Kontakt mit Bakterien gebracht, so ist ein rapider Anstieg von Lymphocyten und Ig-produzierender Zellen in der *Lamina propria* sowie steigende Ig-Konzentrationen im Serum zu verzeichnen [FAGARASAN et al. 2002, TANNOCK 2001, FALK et al. 1998].

Barrierefunktion

Die entlang des Intestinaltrakts angesiedelten Bakterien sind entscheidend an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion gegenüber eindringenden Pathogenen beteiligt. Ein als „Kolonisationsresistenz“ bezeichneter Mechanismus sorgt dafür, dass exogen eingebrachte Mikroorganismen den Darm nicht dauerhaft besiedeln [ADLERBERTH et al. 2000, LIEVIN et al. 2000].

2.2.3 Einfluss von probiotischen Bakterien auf die Funktionen der Mikrobiota

Probiotische Mikroorganismen können einen wichtigen Beitrag zur Unterstützung dieser Funktionen der residenten Mikrobiota leisten. Indem sie um epitheliale Bindungsstellen und um Nährstoffe konkurrieren, können sie das Wachstum und die Invasion von Pathogenen unterdrücken (Abb. 2-2). Durch die Sekretion antimikrobieller Substanzen wie Bacteriocine und organische Säuren sind probiotische Bakterien in der Lage, ungünstige Lebensbedingungen für pathogene Bakterien zu schaffen und somit einer Invasion entgegenzuwirken [EWASCHUK & DIELEMANN 2006]. Durch die probiotische Kultur *B. infantis* konnte das Wachstum von *Bacteroides vulgatus*, dessen Auftreten im Zusammenhang mit

der Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen diskutiert wird, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gehemmt werden [SHIBA et al. 2003]. Die Gabe von *L. acidophilus* La5 und *B. lactis* Bb-12 vier Wochen vor einer Antibiotikabehandlung zur Bekämpfung von *H. pylori* zeigte eine signifikant bessere Vernichtungsrate für *H. pylori* als die alleinige Antibiotikabehandlung [SHEU et al. 2006]. Das Probiotikagemisch VSL#3[®] (bestehend aus 8 Kulturen) inhibierte die Invasion von *Salmonella dublin* in T-84-Zellen [MADSEN et al. 2001]. Ferner wurde gezeigt, dass VSL#3[®] *in vitro* und *in vivo* die Umwandlung von Linolsäure in konjugierte Linolsäure induziert, die potentiell antiinflammatorische und anticancerogene Eigenschaften besitzt [EWASCHUK et al. 2006].

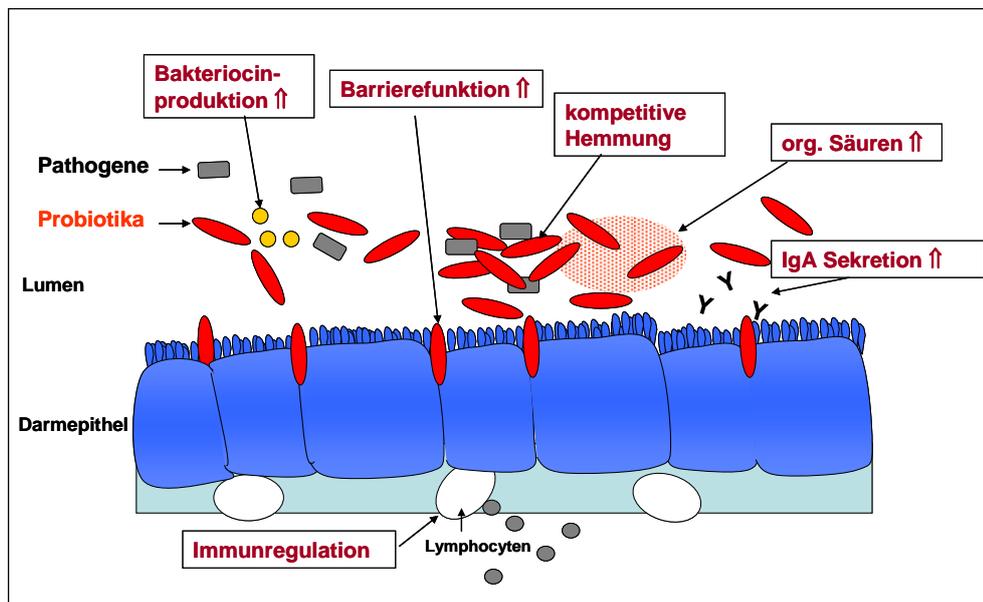


Abb. 2-2: Mechanismen probiotischer Aktivitäten [modifiziert nach Ewaschuk & Dieleman 2006]

Probiotika tragen aufgrund verschiedener Mechanismen zur Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion bei. Für einige Lactobacillen-Species, z. B. *L. plantarum* und *L. rhamnosus*, wurde eine erhöhte mRNA-Expression des MUC3 Mucin-Gens und eine damit verbundene verstärkte extrazelluläre Mucinproduktion beobachtet. Die gleichen Stämme führten *in vitro* zu einer verminderten Adhäsion von enteropathogenem *E. coli* [MACK et al. 1999, MACK et al. 2003]. *L. rhamnosus* GG zeigte eine Verbesserung der Barrierefunktion durch die Hemmung der Apoptose in Epithelzellen sowie eine erhöhte Enterocytenzahl in gnotobiotischen Ratten [YAN & POLK 2002, BANASAZ et al. 2002]. *S. thermophilus* und *L. acidophilus* konnten der Invasion von *E. coli* in die Epithelzellen vorbeugen, indem sie eine gesteigerte Phosphorylierung der integralen Membranproteine Actinin und Occludin in den „tight junctions“ induzierten [RESTA-LENERT & BARRETT 2003].

2.2.4 Das darmassoziierte Immunsystem

Der Gastrointestinaltrakt repräsentiert mit circa 400 m² die größte Grenzfläche zwischen Umwelt und Organismus. In diesem Bereich findet ein ständiger Kontakt mit einer Vielzahl an Mikroorganismen und Antigenen aus der Nahrung statt, die die Präsenz immunologischer Abwehrmechanismen erforderlich machen. Der Gastrointestinaltrakt enthält mit mehr als 10⁶ Lymphocyten/g Gewebe die größte Ansammlung an lymphatischen Zellen im Organismus. Darüber hinaus werden über 60 % der täglich produzierten Immunglobuline in den Gastrointestinaltrakt sekretiert [BRANDTZAEG et al. 1989].

Das darmassoziierte lymphatische Gewebe (GALT) ist Träger der gastrointestinalen Immunabwehr und Teil des mucosalen Immunsystems. Ein wesentlicher Unterschied zum systemischen Immunsystem besteht in der anatomischen Aufteilung des GALT in Induktions- und Effektorregionen. Die Induktion der Immunantwort erfolgt in den organisierten lymphatischen Geweben der PEYERSchen Plaques (PP), den mesenterialen Lymphknoten (MLK) sowie kleineren isolierten Lymphfollikeln im Darmepithel (Abb. 2-3). Zur Effektorregion zählen die diffus verteilten Lymphocyten in der *Lamina propria* und im Epithel [MACDONALD & MONTELEONE 2005, MOWAT 2003].

Die PP enthalten überwiegend B- und T-Lymphocyten (CD19⁺, CD3⁺), aktivierte T-Zellen (CD3⁺HLA-DR⁺), dendritische Zellen und MHC-Klasse-II-exprimierende Makrophagen. Im diffus verteilten Lymphgewebe weisen die Lymphocyten eine unterschiedliche Verteilung auf. Intraepithelial kommen zu 80 - 90 % CD8⁺-T-Lymphocyten vor, während in der *Lamina propria* überwiegend CD4⁺-T-Lymphocyten exprimiert werden. Die *Lamina propria* ist zusätzlich mit B-Gedächtnis- und Immunglobulin(Ig)-produzierenden B-Plasmazellen ausgestattet [MACDONALD 2003, ISOLAURI et al. 2001, BRANDTZAEG 1995].

Circa 80 % der im Ileum und Colon gebildeten Immunglobuline zählen zur Klasse der IgA-Antikörper [MACDONALD 2003]. Im Gegensatz zum Serum-IgA (Monomer) besteht das sekretorische IgA (sIgA) im Intestinaltrakt aus 2 IgA-Molekülen (Dimer), die durch eine *joining chain* (J-Kette) verbunden sind sowie einer sekretorischen Komponente, welche das Immunglobulin vor proteolytischen Enzymen im Darm schützt. Somit bildet sIgA einen guten Schutzmechanismus für die mucosalen Oberflächen. Die Synthese des sIgA erfolgt unabhängig von der Serum-IgA-Bildung. Da sIgA im Darm Bestandteil des mucosalen Immunsystems ist, kann eine im GALT ausgelöste Immunantwort auch die Immunreaktion in anderen Geweben des mucosalen Immunsystems, wie z. B. dem Bronchial- oder Urogenitaltrakt sowie Brust- und Speicheldrüsen, beeinflussen [ISOLAURI et al. 2001].

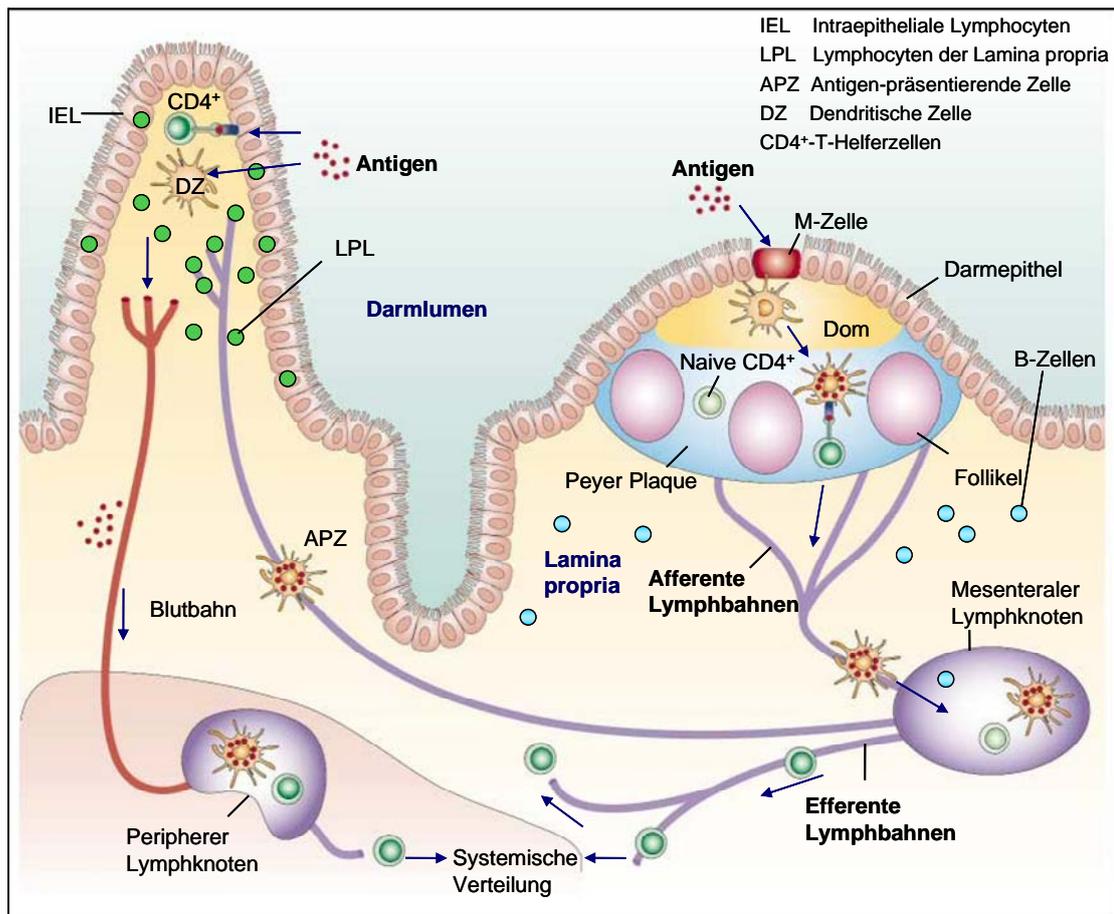


Abb. 2-3: Aufbau des GALT und Wege der Antigenaufnahme im Darm (modifiziert nach MOWAT 2003)

Die Antigenaufnahme erfolgt durch spezialisierte M-Zellen (microfold cells), die im Gegensatz zu den herkömmlichen Enterocyten keine Bürstensaummembran besitzen und nicht von einer Mucusschicht bedeckt sind. Stattdessen weist deren Oberfläche charakteristische kleine Einfaltungen (microfolds) auf, um mit der dadurch vergrößerten Oberfläche die Antigenaufnahme zu erleichtern [MOWAT 2003]. Dendritische Zellen der *Lamina propria* sind zusätzlich in der Lage durch ihre zahlreichen plasmatischen Ausläufer direkt mit Antigenen aus dem Darmlumen in Wechselwirkung zu treten. Dazu exprimieren sie spezifische Membranproteine, welche die Öffnung der *tight junctions* bewirken, ohne jedoch die Barrierefunktion zu beeinträchtigen [RESCIGNO et al. 2001].

Die M-Zellen sind in der epithelialen Schicht über den PP lokalisiert. Sie transportieren durch Endocytose aufgenommene Antigene in die subepitheliale Dom-Region der PP, wo sie über MHC-Klasse-II-positive, dendritische Zellen den unreifen B- und T-Lymphocyten präsentiert werden (Abb. 2-3). Die aktivierten B- und T-Lymphocyten gelangen über die Lymphbahnen zu den mesenteralen Lymphknoten, wo sie weiterer Differenzierung unterliegen und primäre Immunreaktionen induzieren, bevor sie über efferente Lymphbahnen

und den *Ductus thoracicus* in die Blutbahn migrieren [MACDONALD 2003, NEWBERRY & LORENZ 2005]. Die in den PP aktivierten T- und B-Lymphocyten exprimieren zum Teil ein spezifisches Integrin $\alpha_4\beta_7$. Der Ligand MADCAM-1 des Integrins wird darmspezifisch auf den Endothelzellen exprimiert, so dass über diese Bindung die Wiederaufnahme der differenzierten Lymphocyten in die *Lamina propria* ermöglicht wird (*gut homing*). Chemokine, die von den Darmepithelzellen produziert werden, unterstützen diesen Prozess [CAMPBELL et al. 2003].

Die Funktionen des darmassoziierten Immunsystems bestehen darin, einerseits das Eindringen potentieller Antigene aus dem Darmlumen zu verhindern (Immunexklusion) und intestinale Pathogene zu eliminieren (Immunexklusion). Andererseits soll keine Immunreaktion gegenüber herkömmlichen Nahrungsmittel- und Umweltantigenen sowie gegenüber den Bakterien der residenten Mikrobiota erfolgen (orale Toleranz) [ISOLAURI et al. 2001, EWASCHUK & DIELEMAN 2006].

2.2.5 Weitere Kommunikationswege zwischen Bakterien und Immunsystem

Neben der Interaktion mit den immunkompetenten Zellen des GALT können immunologische Effekte über die Erkennung charakteristischer bakterieller und viraler Antigenstrukturen (PAMP's - pathogen-associated molecular patterns) von spezifischen Muster-Erkennungs-Rezeptoren (PRR's - pattern recognition receptors) als Teil des angeborenen Immunsystems vermittelt werden [CUMMINGS et al. 2004].

Es werden zwei Arten von Rezeptoren unterschieden, die Toll-like Rezeptoren (TLR), und Nucleotid-bindende Oligomerisations-Domäne (NOD) Proteine. TLR's sind transmembrane Rezeptoren, die auf verschiedenen Zelltypen (z. B. dendritischen Zellen, Makrophagen, B-Zellen) entlang des Intestinaltrakts zu finden sind. Sie spielen eine Schlüsselrolle bei der Erkennung bakterieller Oberflächenstrukturen und der Kontrolle der adaptiven Immunantwort. Jeder Rezeptor TLR1 bis TLR9 ist verantwortlich für die Erkennung spezifischer bakterieller Komponenten: TLR2 identifiziert bakterielle Strukturen, wie Peptidoglykane und Lipoteichonsäure, TLR4 erkennt z. B. Lipopolysaccharide als charakteristischen Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, TLR5 registriert Flagellin, TLR1, TLR2 und TLR6 erkennen Lipoproteine, während TLR9 CpG-DNA (Cytosin-phosphatidyl-Guanin DNA) bindet. Bei letzterem handelt es sich um nicht methylierte immunstimulatorische DNA-Sequenzen bakterieller oder viraler Herkunft [HEYMAN & HEUVELIN 2006].

Die NOD-Proteine (NOD1 und NOD2) sind intrazelluläre Rezeptoren, die zwischen sehr gering abweichenden Muropeptid-Strukturen bakterieller Peptidoglykane unterscheiden können und somit bei der Erkennung und Verhinderung bakterieller Invasionen eine Rolle

spielen. [JANEWAY & MEDZHITOV 2002, MACDONALD & MONTELEONE 2005, NIESS & REINECKER 2006]. Die TLR's und NOD's werden von verschiedenen Zelltypen entlang des Gastrointestinaltrakts exprimiert [PHILPOTT & GIRARDIN 2004, OTTE et al. 2004]. Sie tragen durch die Erkennung spezifischer molekularer Oberflächenstrukturen pathogener Mikroorganismen und der Induktion der Sekretion pro- und antiinflammatorischer Cytokine und Chemokine via NF- κ B-Weg oder IRF8-Weg entscheidend zur Erhaltung der oralen Toleranz bei [CARIO 2005, HEYMAN & HEUVELIN 2006].

2.3 Probiotische Wirkungen

2.3.1 Immunsystem

Zahlreiche Untersuchungen dokumentieren die immunmodulierenden Eigenschaften probiotischer Mikroorganismen *in vitro* und *in vivo*. Die beschriebenen Effekte betreffen sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunabwehr.

In vitro-Untersuchungen mit dendritischen Zellen zeigten eine gesteigerte Sekretion des antiinflammatorisch wirkenden Cytokins IL-10 durch verschiedene probiotische Lactobacillen-Species sowie durch das Gemisch VSL#3[®] [CHRISTENSEN et al. 2002, DRAKES et al. 2004]. *L. casei* CRL431, *L. helveticus* R389 und *L. acidophilus* CRL730 beeinflussten die Sekretion der Cytokinprofile im Dünndarm von BALB/c-Mäusen *in vitro* und *ex vivo* [PERDIGÓN et al. 2002, MALDONADO GALDEANO & PERDIGÓN 2004, VINDEROLA et al. 2005, MALDONADO GALDEANO & PERDIGÓN 2006]. Die Aufnahme von *L. casei* DN-114001 über 98 Tage resultierte in einer Stärkung der intestinalen Immunabwehr der Mucosa in BALB/c-Mäusen, die vor allem auf einen Anstieg der IgA-produzierenden Zellen sowie der Cytokine TNF- α , IFN- γ , IL-2 und des antiinflammatorisch wirkenden IL-10 zurückzuführen ist [DE MORENO DE LE BLANC et al. 2008].

In verschiedenen Humanstudien wurde durch die regelmäßige Aufnahme von probiotischen Lactobacillen und Bifidobakterien eine Erhöhung der Immunglobulin-Sekretion, der Aktivität der Natürlichen Killerzellen und der Phagozytoseaktivität der Monocyten und Granulocyten verzeichnet [FUKUSHIMA et al. 1998, NAGAO et al. 2000, JAHREIS et al. 2002, PARRA et al. 2004a, RINNE et al. 2005, OGAWA et al. 2006]. *L. reuteri protectis* sowie die Kombination von *B. longum* SP07/3, *L. gasseri* PA16/8 und *B. bifidum* MF20/5 zeigten nach dreimonatiger Einnahme eine Verkürzung der Krankheitsdauer bzw. eine Verminderung der Symptome bei Erkältungskrankheiten [TUBELIUS et al. 2005, DE VRESE et al. 2005a]. *L. rhamnosus* GG und *L. acidophilus* CRL431 induzierten eine Stimulation der

Virus-spezifischen Antikörperproduktion nach einer Poliomyelitis-Impfung bei gesunden Probanden [DE VRESE et al. 2005b].

Aufgrund des altersbedingten Abfalls der Immunfunktionen (Immunoseneszenz) weisen ältere Menschen häufig ein erhöhtes Risiko für infektiöse und nicht-infektiöse Erkrankungen auf. Oft beschriebene Veränderungen betreffen den Abfall der CD3⁺-T-Lymphocyten, eine gesteigerte Sensitivität für die Expression der T_H2-Helferzellen (Abb. 2-4), die verminderte Proliferationsfähigkeit und IL-2-Sekretion der peripheren CD3⁺-T-Lymphocyten sowie eine verminderte Phagocytoseaktivität bzw. eine geringere Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) [LESOURD 1995, LESOURD et al. 1998, SOLANA & MARIANI 2000, WENISCH et al. 2000]. Die Intervention mit *B. lactis* HN019 und *L. rhamnosus* HN001 zeigte für diese Zielgruppe viel versprechende Ergebnisse, indem die Phagocytoseaktivität und die Aktivität der NK-Zellen infolge der Supplementation signifikant anstiegen [ARUNACHALAM et al. 2000, CHIANG et al. 2000, SHEIH et al. 2001, GILL et al. 2001a, GILL et al. 2001b]. Zusätzlich induzierte *B. lactis* HN019 die Expression der CD3⁺-T- und CD4⁺-T-Lymphocyten sowie die Expression der α -Kette des IL2-Rezeptors (CD25⁺) [GILL et al. 2001a].

Obwohl die stimulierenden Wirkungen probiotischer Bakterien auf die humorale und zelluläre Immunabwehr belegt sind, bleibt zu berücksichtigen, dass die Effekte stammspezifisch und dosisabhängig vermittelt werden.

2.3.2 Cholesterolfstoffwechsel

Hohe Cholesterolf- und Triacylglycerolkonzentrationen im Serum gelten als Risikofaktor der Atherogenese und koronarer Herzerkrankungen [GRUNDY et al. 1998]. Ein positiver Einfluss von Milchsäurebakterien auf den Cholesterolfmetabolismus wird diskutiert, seit MANN & SPOERRY [1974] erstmals von der hypocholesterolfämischen Wirkung eines fermentierten Milchgetränks bei dem Stamm der Massai berichteten.

In vitro-Studien demonstrieren die Fähigkeit einiger Lactobacillen-, Lactococcen-, Bifidobakterien- und Hefenstämmen die Cholesterolf-Konzentration in einem mit Cholesterolf und Gallensäuren angereicherten Kulturmedium zu senken. Als potentielle Mechanismen werden die Cholesterolfassimilation, die Inkorporation von Cholesterolf in die bakterielle Zellwand bzw. die Dekonjugation von Gallensäuren diskutiert [GILLILAND et al. 1985, BRASHEARS et al. 1998, KIMOTO et al. 2002, PEREREIRA & GIBSON 2002a, PSOMAS et al. 2003, NOAH et al. 1997, TAHRI et al. 1996, TAHRI et al. 1997, DAMBEKODI & GILLILAND 1998]. Die Dekonjugation von Gallensäuren als Folge der bakteriellen Hydrolase-Aktivität wurde erstmals von KLAVER & VAN DER MEER [1993] beschrieben. Daraus resultierende

freie Gallensäuren werden schlechter reabsorbiert. Dies hat eine erhöhte Ausscheidung der Gallensäuren mit dem Stuhl und Urin zur Folge [PEREREIRA & GIBSON 2002b]. Über den Mechanismus der kompensatorischen Neubildung von Gallensäuren aus Cholesterol in der Leber wird ein positiver Einfluss auf die Cholesterol-Konzentration im Serum diskutiert [DE SMET et al. 1998, BRASHEARS et al. 1998, DITSCHIED et al. 2005]. Die cholesterolsenkende Wirkung ist maßgeblich abhängig von der Wachstumsrate der Bakterien, deren Gallensäurenresistenz und Hydrolaseaktivität [TAHRI et al. 1996, TAHRI et al. 1997, PEREREIRA & GIBSON 2002a]. Aus diesem Grund besitzen probiotische Bakterien im Vergleich zu konventionellen Joghurtkulturen ein höheres cholesterolsenkendes Potential [PEREREIRA & GIBSON 2002a].

Dennoch sind die Untersuchungen über die cholesterolsenkende Wirkung von probiotischen Bakterien beim Menschen widersprüchlich. In normocholesterolämischen Probanden ist entweder kein Effekt oder nur eine geringe Reduktion des Gesamt- und LDL-Cholesterolspiegels zu verzeichnen [DE ROOS et al. 1999, JAHREIS et al. 2002, AGERHOLM-LARSEN et al. 2000, PEREREIRA & GIBSON 2002b]. Die Supplementation bei Hypercholesterolämikern lässt derzeit ebenfalls keine eindeutige Aussage zur cholesterolsenkenden Wirkung von Probiotika beim Menschen zu [BERTOLAMI et al. 1999, DONCHEVA et al. 2002, LEWIS & BURMEISTER 2005].

2.3.3 Antigenotoxische Effekte

Die intestinale Mikrobiota ist aufgrund ihrer Enzymaktivitäten an der Bildung potentiell mutagener und cancerogener Metaboliten im Colon beteiligt. Als relevante Enzyme gelten die β -Glucuronidase, β -Glucosidase, Nitroreduktase sowie die 7α -Dehydroxylase [RAFTER et al. 2004]. Die Veränderung der Mikrobiota durch die Supplementation mit probiotischen Mikroorganismen wird als Möglichkeit erwogen, das Risiko für die Entstehung von Colorkrebs zu senken. Die genauen Mechanismen zur Hemmung der Carcinogenese durch probiotische Bakterien sind noch nicht hinreichend geklärt. In der Diskussion stehen die Veränderung der metabolischen Aktivitäten sowie der Zusammensetzung der Mikrobiota, die Bindung und der Abbau von Carcinogenen, die Bildung antimutagener Verbindungen sowie die Beeinflussung der physikochemischen Bedingungen im Colon [RAFTER 2003].

Experimentelle Daten liefern Hinweise für die tumorprotektiven Eigenschaften probiotischer Bakterien. *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* und *B. longum* zeigten antigenotoxische Wirkungen in Colonzellen von Ratten, indem sie zu einem verminderten Auftreten von Colontumoren und präneoplastischen Läsionen nach chemisch induzierter DNA-

Schädigung führten [POOL-ZOBEL et al. 1996, GOLDIN et al. 1996, ARIMOCHI et al. 1997, SINGH et al. 1997, ROWLAND et al. 1998, WOLLOWSKI et al. 1999].

In Humanstudien wurde durch die Aufnahme verschiedener Lactobacillen und Bifidobakterien die Aktivität krebspromovierender Enzyme im Stuhl reduziert. Die regelmäßige Aufnahme von *L. rhamnosus* bzw. *L. casei* führte zu einer verringerten faecalen Aktivität der β -Glucuronidase und Nitroreduktase bzw. der β -Glucuronidase und β -Glucosidase [LING et al 1994, SPANHAAK et al. 1998]. Die Intervention mit *L. acidophilus* und *B. longum* resultierte in einer verminderten Ausscheidung von mutagenen Substanzen im Urin bzw. in einer verminderten Genotoxizität im Faeceswasser (FW) [HAYATSU & HAYATSU 1993, OBERREUTHER-MOSCHNER et al. 2004].

Diese Resultate sprechen für einen präventiven Einfluss probiotischer Bakterien auf die Carcinogenese. Dennoch existieren derzeit wenig experimentelle Daten aus Humanstudien, die einen direkten Beweis für die Suppression von Colonkrebs durch Probiotika ergeben [CAPURSO et al. 2006].

2.4 Probiotika und atopische Dermatitis

2.4.1 Ursachen und Entstehung der atopischen Dermatitis

Bei der AD, für die synonym auch die Bezeichnungen Neurodermitis, atopisches Ekzem sowie endogenes Ekzem verwendet werden, handelt es sich um eine der am häufigsten auftretenden, chronisch-entzündlichen Hauterkrankungen. Die Inzidenz der AD hat in den letzten zwei Dekaden weltweit sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen stetig zugenommen [ABECK & RING 2002, GALLI et al. 2003]. In Deutschland liegt die Prävalenz gegenwärtig bei Erwachsenen zwischen 2,5 % und 3,4 % und bei Vorschulkindern zwischen 11,3 % und 12,9 % [SCHÄFER 2002].

Die AD weist eine altersabhängige Morphologie und Lokalisation auf. Die klinischen Symptome beinhalten chronisch-rezidivierende, von starkem Juckreiz begleitete Veränderungen auf trockener und lichenifizierter Haut. Ihr liegt eine genetische Disposition zu Grunde, wobei aufgrund des polygenen Vererbungsmusters der genaue Erbgang nicht bekannt ist [WERFEL et al. 2003]. Zum Formenkreis der atopischen Erkrankungen gehören neben der AD die allergische Rhinokonjunktivitis und das Asthma bronchiale [NOVAK & BIEBER 2005]

Die AD stellt eine entzündliche, vorrangig T_H2 -vermittelte Hauterkrankung dar, bei der immunologische Prozesse eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese haben. Die Dysbalance des T_H -Profils zugunsten der T_H2 -Zellen führt zu einer für die Atopie charak-

teristischen Cytokinverteilung (Abb. 2-4). Daraus resultieren die für die Mehrzahl der AD-Patienten typischen immunologischen Besonderheiten wie periphere Eosinophilie und erhöhte Serum-IgE-Spiegel. Ferner werden erniedrigte Serum-Konzentrationen an IFN- γ und eine erhöhte Zahl von IL-4 und IL-5 produzierenden T-Zellen beobachtet [NOVAK & BIEBER 2005].

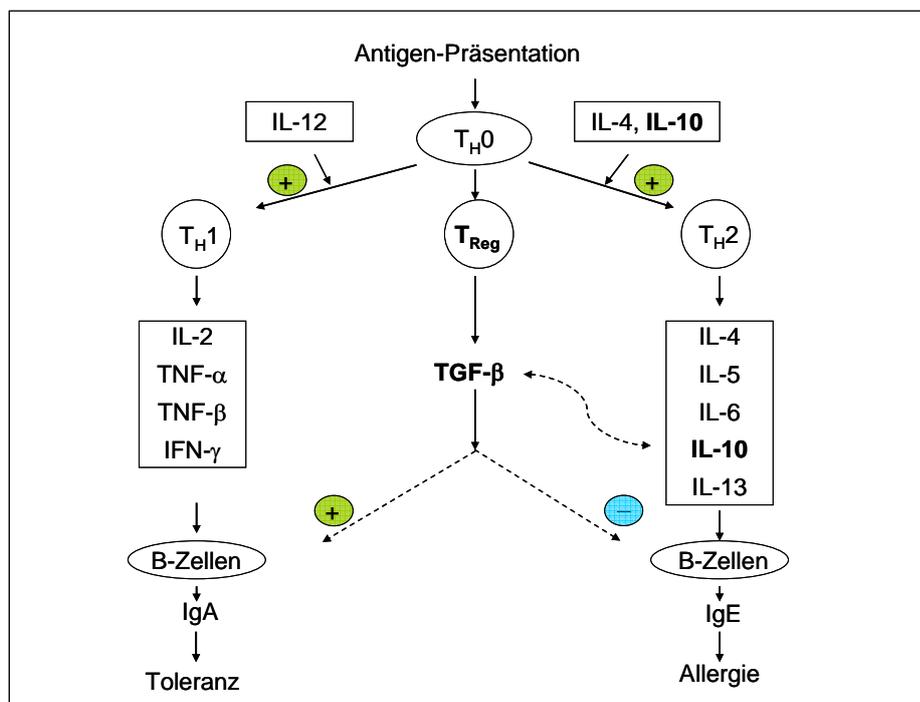


Abb. 2-4: Entwicklung des T_H1- bzw. T_H2-typischen Phänotyps (modifiziert nach RAUTAVA et al. [2004])

Die Cytokine TGF- β und IL-10 spielen bei der Regulation der Immunantwort aufgrund ihrer synergistischen Wirkungsweise eine besondere Rolle. TGF- β begünstigt die Produktion von IL-10, einem T_H2-Cytokin, das jedoch die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber der indigenen Mikrobiota fördert und zudem antiinflammatorisch wirkt [KHOO et al. 1997, SYDORA et al. 2003].

2.4.2 Indikationen für die Anwendung von Probiotika

Für die prä- und postnatale Entwicklung und Reifung des Immunsystems ist eine kontinuierliche Exposition gegenüber mikrobiellen Antigenen, wie sie bevorzugt im Respirations- und Gastrointestinaltrakt stattfindet, essentiell. Die systematische Besiedlung des Intestinaltrakts und vor allem die Zusammensetzung der Mikrobiota des Säuglings in den ersten Tagen nach der Geburt beeinflusst die Ausbildung der Immunreaktionen auf universelle Antigene. Probiotika können in diesem Stadium die sich entwickelnde physiologische Mi-

robiota fördern und somit zur Reifung des intestinalen Immunsystems beitragen [HAUER 2002]. Unterschiede in der Zusammensetzung der neonatalen Mikrobiota werden mit der Entstehung atopischer Erkrankungen assoziiert [KALLIOMÄKI et al. 2001a]. Untersuchungen der Mikrobiota bei Kindern mit AD und Allergien ergaben erniedrigte Konzentrationen an Lactobacillen und Bifidobakterien und erhöhte Keimzahlen für *Staphylococcus aureus* und Enterobakterien im Vergleich zu Gesunden [BJÖRKSTÉN et al. 1999, BJÖRKSTÉN et al. 2001, WATANABE et al. 2003]. Bei Kleinkindern mit AD wird zudem eine erhöhte intestinale Permeabilität beobachtet, die möglicherweise auf eine Schädigung der Mucosa aufgrund lokaler Entzündungsreaktionen zurückzuführen ist [PIKE et al. 1986, CAFARELLI et al. 1993]. Probiotika sind aufgrund ihrer Eigenschaften in der Lage, bestehende Dysbalancen in der mikrobiellen Zusammensetzung auszugleichen und in diesem Zusammenhang die intestinalen Abwehrmechanismen zu verstärken. Es existieren Hinweise, dass sie die gestörte Permeabilität der mucosalen Barriere stabilisieren können [ISOLAURI et al. 1993, GUPTA et al. 2000, ROSENFELDT et al. 2004].

Durch die Interaktion mit den Zellen des GALT und damit verbundener Induktion pro- und antiinflammatorischer Cytokine können probiotische Bakterien das Verhältnis von T_H1-Zellen zu T_H2-Zellen in Richtung der T_H1-Zellen verschieben und somit die T_H2-vermittelte, allergische Immunantwort vermindern [OUWEHAND 2007]. Die Inkubation mit *L. paracasei* bzw. *L. rhamnosus* stimulierte *in vitro* die Sekretion typischer T_H1-Cytokine wie IL-12, IL-18 und IFN- γ in Monocyten und Lymphocyten [HESSLE et al. 1999, MIETTINEN et al. 1998]. Ein anderer Stamm von *L. paracasei* inhibierte *in vitro* die T_H1- und T_H2-Cytokinproduktion bei gleichzeitiger Stimulation der regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}). Die infolgedessen gesteigerte Produktion von TGF- β und IL-10 kann für die Induktion der oralen Toleranz eine entscheidende Rolle spielen [VON DER WEID et al. 2001].

Auch *in vivo* beeinflusst die orale Aufnahme von Probiotika das Cytokinprofil sowie das Ausmaß und den Schweregrad der AD. Im Mittelpunkt stehen hierbei vor allem Säuglinge und Kleinkinder, die eine erhöhte Disposition für die Ausbildung einer AD besitzen. In dieser Zielgruppe konnten in der Mehrzahl positive Effekte durch die Intervention mit Probiotika auf die Prävalenz und Inzidenz der Krankheit sowie eine Verbesserung der Symptome (SCORAD - Scoring Atopic Dermatitis, Zustand des Hautbilds) gezeigt werden, obwohl die Cytokinmuster im Sinne einer T_H1-dominierenden Immunitätslage nicht in allen Studien eindeutig beeinflusst wurden (Tab. 2-1).

Tab. 2-1: Klinische Wirkungen von Probiotika bei atopischer Dermatitis

Probiotischer Stamm	Zielgruppe	Effekt	Referenz
<i>L. rhamnosus</i> GG	Kleinkinder mit AD Ø 21 Monate n = 9	IL-10 ↑ sIgA in Faces ↔	PESSI et al. 2000
(1) <i>B. lactis</i> Bb12 (2) <i>L. rhamnosus</i> GG	Kleinkinder mit AD Ø 4,6 Monate n = 27	SCORAD ↓ (1&2) sCD4 ⁺ ↓ (1&2) EPX im Urin ↓ (1&2) TGF-β ↓ (1)	ISOLAURI et al. 2000
<i>L. rhamnosus</i> 19070-2 und <i>L. reuteri</i> DSM 122460	Kinder Ø 5 Jahre n = 43	ECP ↓ IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-10, ↔ SCORAD ↔	ROSENFELDT et al. 2003
(1) <i>L. rhamnosus</i> GG (2) Mix: <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> LC705, <i>B. breve</i> Bbi99, <i>P. freudenreichii</i> JS	Kleinkinder mit AD Ø 6,5 Monate n = 119	IFN-γ ↑ (1) IFN-γ ↔ (2) IL-4 ↑ (2)	POHJAVOURI et al. 2004
(1) <i>L. rhamnosus</i> GG (2) Mix: <i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. rhamnosus</i> LC705, <i>B. breve</i> Bbi99, <i>P. freudenreichii</i>	Kleinkinder mit AD Ø 6,4 Monate n = 230	IL-6 ↑ (1) IL-10 ↑ (2) IL-4, TGF-β ↔ (1&2) SCORAD ↔ (1&2)	VILJANEN et al. 2005a VILJANEN et al. 2005b
<i>L. fermentum</i> VRI-033	Kleinkinder mit AD Ø 10,9 Monate n = 56	SCORAD ↓	WESTON et al. 2005
<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L.</i> <i>rhamnosus</i> LC705, <i>B.</i> <i>breve</i> Bbi99, <i>P. freu-</i> <i>denreichii</i> JS	Neugeborene mit einem Risiko für ato- pische Erkrankung n = 98	CRP ↑ assoziiert mit ↓ Ri- siko für AD im Alter von 6 Monaten und ↓ Risiko für Allergie im Alter von 2 Jahren IL-10 ↑	MARSCHAN et al. 2008

EPX – eosinophiles Protein X; ↔ kein Einfluss; ↑ erhöht; ↓ reduziert

Bis dato existieren sehr wenig Untersuchungen, die sich mit probiotischen Effekten bei der adulten AD beschäftigen, so dass besonders für diese Zielgruppe deutlicher Forschungsbedarf besteht.

2.4.3 Einsatz von Probiotika bei weiteren Erkrankungen

Lactoseintoleranz

Die Lactoseintoleranz basiert entweder auf einem angeborenen Defekt der β-Galactosidase oder einer reduzierten Lactaseaktivität mit zunehmendem Lebensalter. In beiden Fällen kann Lactose nicht bzw. unzureichend gespalten werden. Dies manifestiert sich in gastrointestinalen Symptomen wie Flatulenz, abdominellen Schmerzen und Diarrhö. Eine Linderung der Symptome kann durch den Verzehr von fermentierten und probiotischen

Milchprodukten aufgrund bakterieller β -Galactosidase-Aktivität der lebenden Kulturen erreicht werden. Dieser Effekt wird jedoch nicht ausschließlich durch probiotische Bakterien hervorgerufen, sondern auch von herkömmlichen Milchsäurebakterien [DE VRESE et al. 2001, VIJAYA KUMAR et al. 2005].

Diarrhö

Akute viral und bakteriell bedingte Durchfälle zählen zu den häufigsten Erkrankungen im Kindesalter. Die Verkürzung der Erkrankung und Durchfallhäufigkeit durch Probiotika ist in klinischen Studien bewiesen, wie Meta-Analysen bestätigen [SZAJEWSKA & MRUKOWICZ 2001, VAN NIEL et al. 2002, HUANG et al. 2002].

Eine häufig beschriebene Nebenwirkung der Antibiotikatherapie sind Durchfallerscheinungen, die durch eine Störung des bakteriellen Gleichgewichts im Colon verursacht werden. Ein günstiger Einfluss auf den Krankheitsverlauf konnte bei gleichzeitiger Probiotikagabe (z. B. *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *S. boulardii*) festgestellt werden [D'SOUZA et al. 2002, CREMONINI et al. 2002, MARTEAU et al. 2001]. Dagegen sind zur Prävention von Reisediarrhö keine eindeutigen Aussagen möglich [MARTEAU et al. 2001].

Entzündliche Darmerkrankungen

Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen handelt es sich um multifaktorielle gastrointestinale Funktionsstörungen, in deren Pathogenese die Mikrobiota eine zentrale Rolle spielt. Hinweise dafür liefern Untersuchungen von Stuhl- und Biopsieproben von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, die geringere Anteile an Lactobacillen bzw. Bifidobakterien und erhöhte Konzentrationen von *Bacteroides* spp. ergaben [FABIA et al. 1993, FAVIER et al. 1997, SWIDSINSKY et al. 2002]. Mehrere klinische Studien dokumentierten den erfolgreichen Einsatz von *E. coli* Nissle 1917 und des Probiotika-Mixes VSL#3[®] zur Rezidivprophylaxe bei Colitis ulcerosa und bei chronischer Pouchitis [GIONCHETTI et al. 2000, GIONCHETTI et al. 2003, KRAMMER et al. 2005, MIMURA et al. 2004, KRUIS et al. 2004]. Ferner war die Behandlung von Colitis ulcerosa mit *E. coli* Nissle 1917 genauso effektiv wie die Therapie mit dem Präparat Mesalazin [REMBACKEN et al. 1999, KRUIS et al. 2004].

3 Material und Methoden

3.1 Humanstudie I

3.1.1 Charakterisierung des Joghurts

Der in dieser Humanstudie verabreichte Joghurt enthielt 9,5 % Kohlenhydrate 3,3 % Fett, 4,4 % Protein sowie 1 % Fibrulose[®] F90, ein kurzkettiges Fructooligosaccharid. Das Placeboprodukt wurde mit den Standardjoghurtkulturen *Lactobacillus bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus* hergestellt. Der probiotische Joghurt enthielt zusätzlich die probiotischen Kulturen *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DGCC 420 ($3,0 \times 10^6$ kbE/g) und *Lactobacillus acidophilus* 74-2 ($9,3 \times 10^8$ kbE/g). Beide Stämme zeigten *in vitro* Resistenz gegenüber Magen- und Gallensäuren [ALANDER et al. 2001]. Die Produkte waren hinsichtlich der Nährstoffzusammensetzung und der Sensorik nicht zu unterscheiden.

3.1.2 Studienteilnehmer

Die Studie wurde vor Beginn von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena auf deren Unbedenklichkeit geprüft und genehmigt (Bearb.-Nr. 0607-02/01). Die 26 Probanden (13 Männer, 13 Frauen) im Alter von 25 ± 3 Jahren (20-37 Jahre) und einem durchschnittlichen Body Mass Index von $21,6 \pm 2,0$ kg/m² (18,0-26,0 kg/m²) wurden über den Inhalt und Ablauf der Studie sowie mögliche Risiken aufgeklärt. Voraussetzung für die Teilnahme war die Abgabe einer schriftlichen Einverständniserklärung.

3.1.3 Studiendesign

Die Studie wurde als randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie im Cross-over-Design durchgeführt (Abb. 3-1). In der dreiwöchigen Adaptationsphase verzichteten die Teilnehmer vollständig auf probiotische Lebensmittel. Zur Erfassung der individuellen Energieaufnahme wurde ein siebentägiges Ernährungsprotokoll geführt. Die Daten wurden mit der PC-Software Prodi[®] 4.4 expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland) ausgewertet und dienten als Basis für die Zusammenstellung der standardisierten Kost. Vor Beginn der Intervention wurden die Probanden zufällig auf die Gruppen aufgeteilt. An die Adaptationsphase schlossen sich zwei fünfwöchige Versuchsperioden an, in denen täglich jeweils morgens und abends 150 g des probiotischen Joghurts bzw. des Placebos unter Beibehaltung der üblichen Essgewohnheiten verzehrt wurden. Zu Beginn sowie in der letzten

Woche jeder Periode erhielten die Probanden eine siebentägige standardisierte Kost. In diesem Zeitraum durften ausschließlich die zur Verfügung gestellten Lebensmittel verzehrt werden. Anhand der für jeden Probanden ermittelten Energieaufnahme (Frauen ca. 1800 bzw. 2200 kcal, Männer ca. 2500 kcal) wurden die einzelnen Portionen abgewogen und täglich geliefert. Nicht verzehrte oder nicht verzehrbare Nahrungsbestandteile (Obstkerne, -schalen) wurden zurückgewogen und somit der tatsächliche Verzehr erfasst. Die ersten zwei Tage der Standardkost dienten dem Ausschluss von Überlagerungseffekten durch vorab verzehrte Lebensmittel. In den folgenden fünf Tagen wurden Stuhl und Urin quantitativ gesammelt. Am letzten Tag jeder Sammelperiode erfolgte morgens eine Nüchternblutentnahme. Die Stuhlprobe von diesem Tag diente der Gewinnung von FW und dem Nachweis der probiotischen Kulturen im Stuhl. Zur Bestimmung der Körperkonstitution erfolgte zu Beginn sowie am Ende der Studie eine Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA).

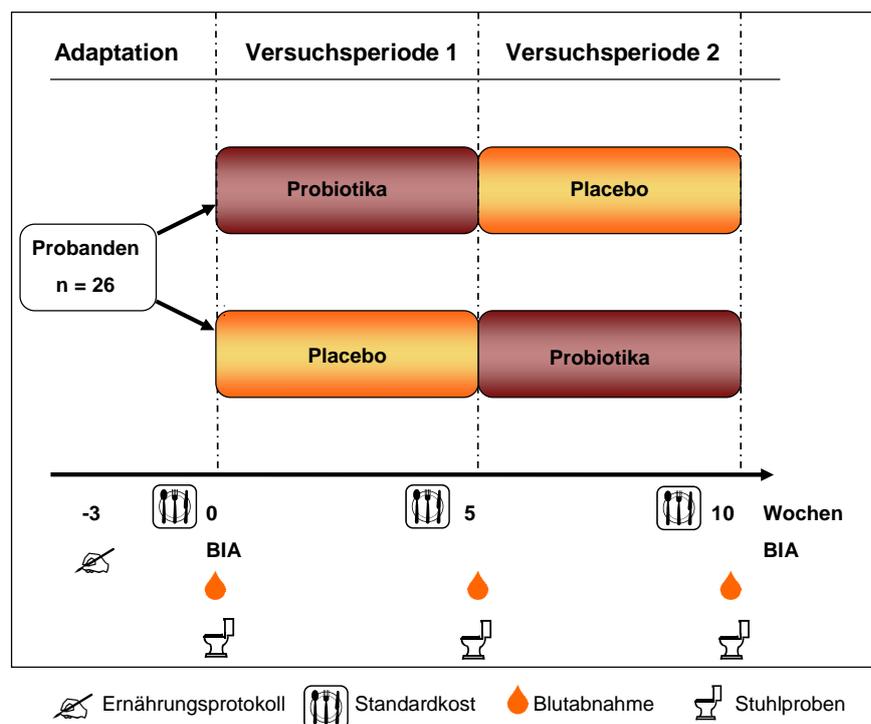


Abb. 3-1: Studiendesign Humanstudie I

3.1.4 Probenmanagement

3.1.4.1 Serum

Am letzten Tag jeder Versuchsperiode erfolgte eine Nüchtern-Blutabnahme aus der Vena mediana cubiti. Nach einer Koagulationszeit von 30 min wurde das Blut zur Serumgewinnung 15 min bei 1600 x g zentrifugiert, 3 x 1ml Serum abgenommen und bei -80 °C bis zur

Analyse aufbewahrt. Eine zweite Lithium-Heparin-beschichtete Monovette zur Bestimmung der immunologischen Parameter wurde sofort analysiert (siehe Kapitel 3.3.4.2).

3.1.4.2 Stuhl

Während der Sammelphasen setzten die Probanden den Stuhl in eine Plastiktüte ab, die sich in gut verschließbaren Kunststoffgefäßen befand. Der Stuhl wurde innerhalb kürzester Zeit nach dem Absetzen an jedem Sammeltag gewogen und bei -20 °C aufbewahrt. Am Ende der Studie wurden die Tagesportionen von jeder Versuchsperiode aufgetaut und mit einem Handrührgerät homogenisiert. Ein Teil des Homogenisats wurde bei -20 °C eingefroren und ein weiterer Teil wurde gefriergetrocknet, gemahlen (1 mm) und bei -20 °C gelagert.

3.1.4.3 Faeceswasser

Zur Gewinnung des FW wurden ca. 10 g des frischen Stuhls in Ultrazentrifugentubes überführt und 4 Stunden bei 21.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde quantitativ abgenommen, je 1 ml in Cryoröhrchen überführt und bei -80°C bis zur Analyse gelagert.

3.1.4.4 Urin

Die Sammlung des 24h-Urins erfolgte in Polyethylenflaschen (Volumen 2,5 l). Nach jedem Sammeltag wurde der Urin gewogen und 1 % der Urinmenge in Monovetten à 10 ml abgefüllt und bei -20 °C gelagert. Am Ende der Studie wurden die täglich gesammelten Urinmengen innerhalb der Versuchsperiode gemischt und 50 ml je Proband und Phase in Monovetten bei -20 °C bis zur Analyse eingefroren.

3.2 Humanstudie II

3.2.1 Charakterisierung des Joghurtgetränks

Das untersuchte Joghurtgetränk enthielt 12,7 % Kohlenhydrate, 0,1 % Fett, 2,9 % Protein und 0,8 % Oligofruktose. Die Herstellung des Placebos erfolgte mit der Standardkultur *Streptococcus thermophilus*. Das probiotische Joghurtgetränk enthielt zusätzlich die probiotischen Kulturen *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 ($3,9 \times 10^8$ kbE/g), *Lactobacillus acidophilus* 74-2 ($2,9 \times 10^4$ kbE/g) und *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DGCC 420 ($5,9 \times 10^4$ kbE/g). Die beiden Produkte waren optisch und sensorisch nicht zu unterscheiden.

3.2.2 Studienteilnehmer

Für die Humanstudie wurde das positive Votum der Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena erteilt (Bearb.-Nr. 1452-11/04). Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war eine mündliche und schriftliche Aufklärung über die Studie mit nachfolgender, schriftlicher Einverständniserklärung der Probanden.

Vor Beginn der Studie erfolgte zur Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien (Tab. A-1, Tab. A-2) eine ärztliche Untersuchung von allen Studienteilnehmern in der Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Diese umfasste die Ermittlung des Hautzustands mit dem Erlanger Atopiescore nach Diepgen [DIEPGEN et al. 1996] sowie mit dem SCORing Atopic Dermatitis (SCORAD) [STADLER 1993] und einem Skin-Prick-Test zum Ausschluss einer Typ1-Sensibilisierung gegenüber Kuhmilch. An der Studie nahmen 15 gesunde Probanden (10 Frauen und 5 Männer) im Alter von 24 ± 3 Jahren (20-30 Jahre) und 15 Patienten (12 Frauen und 3 Männer) im Alter von 23 ± 3 Jahren (19-31 Jahre) teil. Der durchschnittliche BMI betrug für die Gesunden $21,7 \pm 2,9$ kg/m² (18,3-28,3 kg/m²), für die Patienten $22,0 \pm 2,9$ kg/m² (18,4-30,9 kg/m²).

3.2.3 Studiendesign

Die Humanstudie II wurde ebenfalls gemäß dem Modell einer placebokontrollierten Doppelblindstudie im Cross-over-Design durchgeführt (Abb. 3-2). Während der dreiwöchigen Adaptationsperiode verzichteten die Teilnehmer auf alle probiotischen Lebensmittel. Vor Beginn der Intervention wurden die gesunden Probanden und die Patienten auf zwei Gruppen randomisiert. Es folgten zwei achtwöchige Interventionsperioden, in denen täglich entweder 2 x 100 ml des probiotischen Produkts oder des Placebos aufgenommen wurden. Nach einer zweiwöchigen Wash-out-Phase wechselte die Intervention (Cross-over) und die entsprechenden Produkte wurden weitere acht Wochen verzehrt. Die Studienteilnehmer führten zu Beginn der Studie sowie am Ende jeder Interventionsperiode ein fünftägiges Ernährungsprotokoll zur Erfassung der individuellen Nährstoffaufnahme unter Beibehaltung ihrer alltäglichen Ernährungsgewohnheiten. Die Daten wurden mit der PC-Software Prodi® 4.4 expert (Nutri-Science GmbH, Hausach, Deutschland) ausgewertet. In der Adaptationsphase sowie am Ende jeder Versuchsperiode erfolgten die Abgabe einer Stuhlprobe sowie eine Blutabnahme. Bei den Patienten erfolgte zusätzlich eine ärztliche Untersuchung des Gesundheitszustandes und des Hautbildes im vier- bzw. zweiwöchigem Rhythmus

(Abb. 3-2). Zur Überwachung der Körperkonstitution erfolgte zu Beginn und am Ende der Studie eine Bioelektrische Impedanzanalyse (BIA).

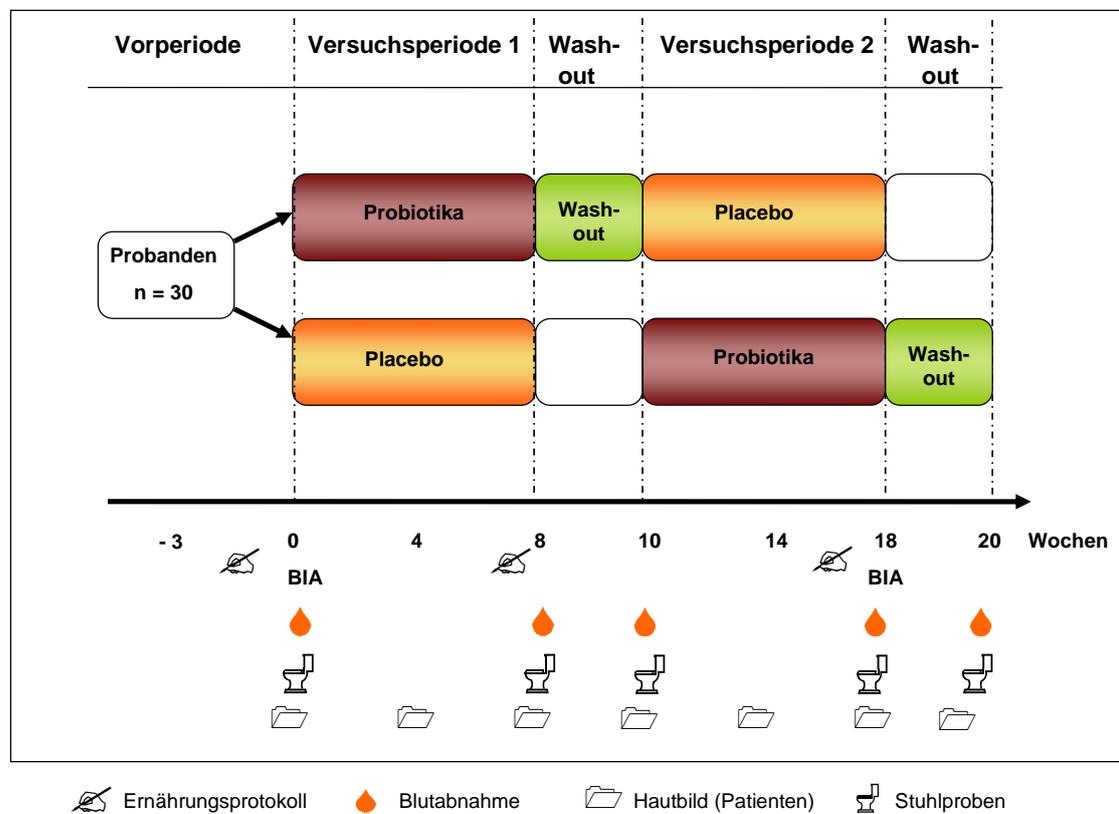


Abb. 3-2: Studiendesign Humanstudie II

3.2.4 SCORAD

Die Diagnose über den Schweregrad der atopischen Dermatitis erfolgte in regelmäßigen Abständen durch einen Prüfarzt in der Klinik für Dermatologie und dermatologische Allergologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die Beurteilung basierte auf dem klinischen SCORAD, der von der European Task Force on Atopic Dermatitis im Jahr 1993 als standardisierte Methode zur Beurteilung des Hautzustands eingeführt wurde [STADLER 1993]. In die Berechnung des SCORAD wurden verschiedene objektive und subjektive Parameter der Hautaffektion bei AD einbezogen:

Die Messung der betroffenen Hautoberfläche erfolgte mit der Neuner-Regel. Nach dieser Regel werden die Körperregionen in elf Abschnitte unterteilt, die jeweils 9 % der Gesamtkörperfläche betragen. Für die Hautoberfläche im Schambereich verbleibt 1 %. Als Merkmale wurden die Trockenheit der Haut, Erythem, Ödem- und Krustenbildung sowie Exkorationen und Lichenifikation hinsichtlich der Intensität auf einer Skala von 0 - 3 erfasst.

Subjektive Symptome wie Pruritus (Juckreiz) und Schlaflosigkeit wurden auf einer Skala von 1 - 10 von den Patienten selbst eingetragen (Abb. A-1)

3.2.5 Probenmanagement

Die im Rahmen der Humanstudie II gewonnenen Blut- und Stuhlproben wurden, wie in den Abschnitten 3.1.4.1 bis 3.1.4.3 beschrieben, für die Analysen vorbereitet.

3.3 Analytik

3.3.1 Nährstoffe

Die Trockensubstanz und die Nährstoffe wurden in den verabreichten Lebensmitteln sowie im Stuhl und im Urin bestimmt. Die Analyse der Trockensubstanz und der Nährstoffe erfolgte nach den VDLUFA-Methoden [NAUMANN & BASLER 1976]

3.3.1.1 Trockensubstanz und Asche

Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurden je nach Probenart 4 - 20 g in glasierte Tiegel eingewogen, 24 h bei 103 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und der Rückstand durch Differenzwägung ermittelt.

Die gravimetrische Aschebestimmung erfolgte durch Veraschung der getrockneten Proben 12 h bei 550 °C im Muffelofen.

3.3.1.2 Protein

Die Ermittlung des Gesamtproteingehalts erfolgte über die N-Bestimmung nach Kjeldahl. Nach dem Aufschluss der Proben mit konzentrierter Schwefelsäure unter Zusatz eines Katalysatorgemisches bei 450 °C wurden die tertiären N-Verbindungen in Ammoniumsulfat überführt. Der nach Zulage von 33 %iger Natronlauge freigesetzte Ammoniak wurde mittels Wasserdampfdestillation in eine vorgelegte 0,5 %ige Borsäurelösung überführt. Die N-Bestimmung erfolgte durch Titration mit Salzsäure. Der Gesamtproteingehalt wurde durch Multiplikation des N-Gehaltes mit dem entsprechenden Faktor (6,25 bzw. 6,38 für Milch) berechnet.

3.3.1.3 Fett

Die Bestimmung des Fettgehalts (Etherextrakt) erfolgte nach Soxhlet. Die Proben wurden 30 min mit 4N Salzsäure hydrolysiert und anschließend filtriert. Filter und Filtrerrückstand wurden mit heißem Wasser säurefrei gewaschen und getrocknet. Anschließend erfolgte eine Extraktion mit Petrolether mittels des Extraktionssystems Soxtherm 2000 (Gerhardt

GmbH & Co KG, Königswinter, Deutschland). Der Extrakt wurde 1 h bei 103 °C getrocknet und gravimetrisch bestimmt.

3.3.2 Stuhl

3.3.2.1 pH-Wert

Die Messung der pH-Werte in den Stuhlproben erfolgte unmittelbar nach dem Homogenisieren mit einem Digital-pH-Meter nach vorheriger Eichung (pH-Elektrode Orion 91-72 Sure-Flow[®], Thermo Electron Corp., Karlsruhe, Deutschland).

3.3.2.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Fixierung

Je 1 g frischer Stuhl wurde in 9 ml PBS (Lösung 1: 1,44 g Na₂HPO₄/l, Lösung 2: 0,24 g KH₂PO₄/l, Lösung 1 und 2 mischen und pH 7,4 einstellen, 130 mM NaCl zufügen) gelöst und homogenisiert. Diese Suspension wurde nochmals 1:10 mit PBS verdünnt und 15 min bei 35 x g zentrifugiert, um die Grobbestandteile abzutrennen. Für die Paraformaldehydfixierung wurden 0,5 ml des Überstandes mit 1,5 ml einer 4 %igen Paraformaldehydlösung versetzt und 12 h bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschriff, indem 1 ml der fixierten Zellsuspension mit 1 ml PBS versetzt und 5 min bei 8000 x g zentrifugiert wurde. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml PBS/Ethanol (1:1) resuspendiert und bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt [LANGENDIJK et al. 1995].

Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte in Duplikaten. Zur Vorbereitung wurden je 5 µl der fixierten Probe auf eine Kavität des vorbehandelten (in 1 %iger HCl gewaschen, mit 70 %igem Ethanol gespült) und mit Gelatinelösung (0,075 % Gelatine, 0,01 % CrK(SO₄)₂) beschichteten Objektträgers aufgetragen, getrocknet und anschließend je 3 min in 50 %, 80 % und 100 %igem Ethanol dehydriert. Um eine Verbesserung der Permeabilität der Zellwände zu erreichen, wurden 20 µl Lysozym (10 mg/ml) aufgetragen und 10 min bei 4 °C inkubiert [BEIMFOHR et al. 1993]. Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung mit je 8 µl formamidhaltigen Hybridisierungspuffer (20 % bzw. 35 % Formamid, 0,9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8], 0,01 % SDS) und je 1 µl Cy3-markierten Oligonukleotidsonden (50 ng/µl), die pro Kavität aufgetragen wurden [MANZ et al. 1992]. Die Oligonucleotidsonden wurden von der Firma Jena Bioscience (Jena, Deutschland) synthetisiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff

Cy3 am 5'-Ende markiert. Um das Fluoreszenzsignal für die Sonde LW420c zu verstärken, wurden zwei unmarkierte Helferoligonucleotide H159 und H195 designt und die optimalen Bedingungen durch Prüfen eines Formamidanteils von 0 % bis 80 % im Hybridisierungspuffer für diese Kombination LW420c+2 geschaffen. In Tab. 3-1 sind die im Rahmen der Analysen eingesetzten Sonden beschrieben. Die Hybridisierung erfolgte in einer Puffer-gesättigten Kammer, indem ca. 1,9 ml Hybridisierungspuffer zusammen mit den Objektträgern in Falcon-Tubes gegeben und 15 h bei 46°C hybridisiert wurden.

Tab. 3-1: Daten der verwendeten Oligonucleotidsonden

Sonde	Zielgruppe und -molekül	Sequenz (5' → 3')	Formamid-gehalt (%)	Referenz
EUB 338	<i>Bacteria</i> 16S rRNA	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	AMANN et al. 1990
NON 338	Negativkontrolle	ACTCCTACGGGAGGCAGC	20	WALLNER et al. 1993
Lpara	<i>L. paracasei</i>	GTTCCATGTTGAATCTCGG	20	BLASCO et al. 2003
Lba	<i>L. acidophilus</i> 23S rRNA	TCTTTTCGATGCATCCACA	20	POT et al. 1993 komplementär zum PCR- Primer von KOK et al. 1996
LW420c*	<i>B. lactis</i> 16S rRNA	CGATGGAGCGGAGCATCC	35	KLEIN et al. 2008
H159	<i>B. lactis</i> 16S rRNA	GGTATTACCACCCGTTTC	35	KLEIN et al. 2008
H195	<i>B. lactis</i> 16S rRNA	ATTTCCCACCCCACCATG	35	KLEIN et al. 2008

* verwendet in Kombination mit den Helferoligonukleotiden H159 und H195

Um den Hybridisierungspuffer und ungebundene bzw. Teile unspezifisch gebundener Sonden zu entfernen, erfolgte ein 15-minütiger Waschschrift mit 50 ml Waschpuffer (20 mM Tris-HCl [pH 8], 215 mM NaCl bei 20 % Formamid bzw. 70 mM NaCl bei 35 % Formamid, 5 mM EDTA, 0,01 % SDS) bei 48°C [MANZ et al. 1992]. Im Anschluss wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült, getrocknet und mit 20 µl DAPI (1 µg/ml) pro Kavität für 10 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Die Kavitäten wurden mit destilliertem Wasser gespült, getrocknet und in Vectashield Mounting Medium (Axxora GmbH, Grünberg, Deutschland) eingebettet.

Alle verwendeten Lösungen wurden vor der Anwendung steril (Ø 0,22 µm) filtriert (Millipore Express™ Plus, Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland).

Auswertung

Die mikroskopische Auswertung erfolgte bei 1000-facher Vergrößerung mit Hilfe eines Axiovert 25 CA Mikroskops ausgestattet mit einer HBO 50-Fluoreszenzeinheit und spezifischen Filtersätzen (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland, Tab. 3-2). Die Auswertung der mit EUB338-hybridisierten Proben erfolgte mit der Software AxioVision Vs. 4.3 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland). Die mit den speciesspezifischen Sonden Lpara, Lba und LW420c+2 sowie die mit NON338 hybridisierten Proben wurden manuell ausgewertet. Pro Kavität wurden in mindestens 15 Sichtfeldern durchschnittlich 1500 DAPI-markierte Zellen und die entsprechende Zahl positiv markierter Zellen im Cy3-Kanal ausgezählt und deren prozentualer Anteil an den DAPI-markierten Zellen bestimmt (Abb.3-3).

Tab. 3-2: Technische Daten der Filtersätze

Filtersatz	Anwendung	Anregungsfilter	Strahlenteiler	Sperrfilter
01 (ZEISS)	DAPI	BP 365/12	FT 395	LP 397
20 (ZEISS)	CY3	BP 546/12	FT 506	BP 575-640

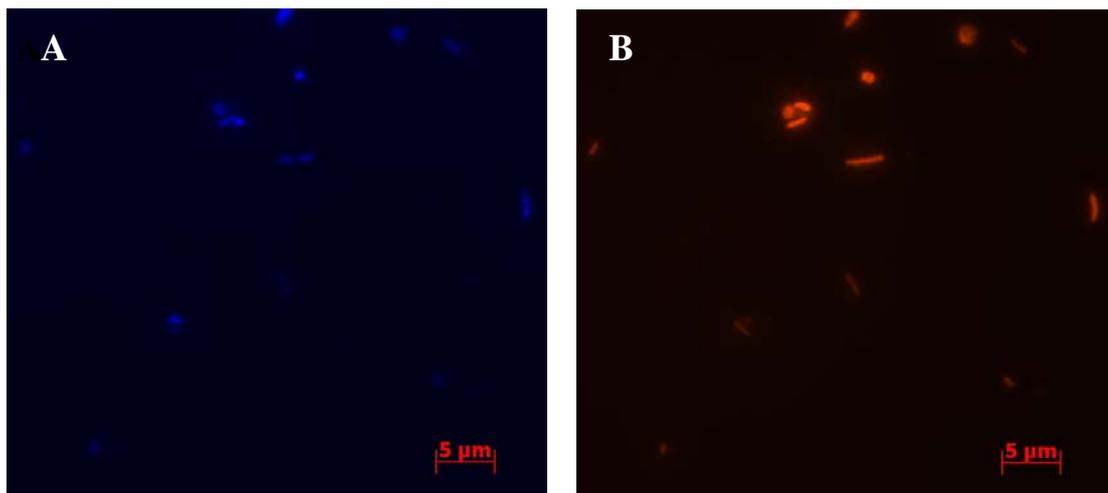


Abb. 3-3: Mikroskopische Aufnahmen der Bakterien im Stuhl nach der Färbung mit DAPI (A) und das gleiche Sichtfeld (B) aufgenommen mit dem spezifischen Filter für Cy3 nach der Hybridisierung mit der Sonde EUB338

3.3.2.3 Quantitative Real-Time PCR

Spiking Experiment

Um die Extraktion bakterieller DNA aus Stuhlproben zu optimieren, wurden in einem Vorversuch verschiedene DNA-Extraktions-Kits (QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland; BILATEST[®] Bac Kit, Bilatec AG, Viernheim, Deutschland; PSP[®] Spin Stool DNA Kit, Invitek GmbH, Berlin, Deutschland) getestet. Hierzu wurde eine Stuhlprobe mit Ringerlösung (0,9 % NaCl, 0,042 % KCl, 0,024 % NaHCO₃) im Verhältnis 1:1 versetzt und je 400 ml dieser Mischung aliquotiert. Anschließend erfolgte die

Zugabe bekannter Mengen (aus acht Verdünnungsstufen) der in Reinkultur angezüchteten *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420. Die DNA aus den gespikten Stuhlproben wurde nach Anleitung der Hersteller extrahiert und anschließend eine quantitative Real-Time Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) mit den spezifischen Primern und Bedingungen durchgeführt (Tab. 3-3). Die besten Ergebnisse wurden mit dem PSP® Spin Stool DNA Kit erzielt, so dass dieser für die Extraktion der DNA aus den Stuhlproben Anwendung fand.

DNA-Extraktion

Für die Extraktion bakterieller DNA wurde 1 g Stuhl eingewogen und in 6 ml Ringerlösung suspendiert. Im Anschluss wurden die Proben 30 min geschüttelt (IKA Vibrax, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) und 5 min bei 300 x g zentrifugiert, um die Grobbestandteile abzutrennen. Vom Überstand wurden 2 ml abgenommen und bei 10000 x g zentrifugiert. Die Präparation der gewonnenen Zellpellets erfolgte mit einem DNA-Extraktions-Kit speziell für Stuhlproben (PSP® Spin Stool DNA Kit, Invitek GmbH, Berlin, Deutschland) nach der Anleitung des Herstellers. Die DNA wurde in 100 µl Elutionspuffer aufgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

qRT-PCR

Vor Beginn der Analysen wurden die DNA-Extrakte auf ihre Konzentration und Qualität anhand photometrischer Messungen mit einem Spectralphotometer (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überprüft. Auf dieser Basis wurden die Proben 1:100 verdünnt, so dass die eingesetzten Konzentrationen zwischen 0,8 - 4,0 ng/µl DNA betragen.

Der Reaktionsansatz für den Nachweis von *L. paracasei* und *L. acidophilus* enthielt 1 x SYBR® Premium Ex Taq™ (Takara Bio Inc., Otsu, Japan) und 0,2 µM Primer Lp1 und Lc2 für *L. paracasei* bzw. 0,3 µM Primer La1 und La2 (Metabion GmbH, München, Deutschland) für *L. acidophilus* [FURET et al. 2004]. Der Reaktionsansatz für den Nachweis von *B. lactis* enthielt 1 x PCR Puffer mit 15 mM MgCl₂ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), 2,5 mM MgCl₂, 2,5 U Hot Star Taq-Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), 0,2 µM der mit Farbstoff markierten Taqman Sonde PBact174F, 0,9 µM der Primer Bact144F und Bact226R sowie 0,8 µM dNTPs.

Der Reaktionsansatz für die Amplifikation der 16s rRNA setzte sich wie folgt zusammen: 1 x PCR Puffer mit 15 mM MgCl₂ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), 3,5 mM MgCl₂, 2,5 U Hot Star Taq-Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland), 0,2 µM der mit

Farbstoff markierten Taqman Sonde PBac1060F, 0,9 μ M der Primer Bac944F und Bac1108R (Metabion GmbH, München, Deutschland) sowie 0,8 μ M dNTPs [FRIEDRICH & LENKE 2006]

Für die quantitative PCR wurden je 16 μ l Mastermix für die entsprechenden Primerpaare mittels des Pipettierroboters Corbett Robotics CAS 1200 (Corbett Life Science, Sydney, Australien) aliquotiert und mit je 4 μ l DNA versetzt. Die qPCR wurde mit dem Corbett Rotor-Gene 3000 Real-Time Thermocycler (Corbett Life Science, Sydney Australien) durchgeführt mit spezifischen Temperaturprogrammen für die einzelnen Primerpaare (Tab. 3-3). Die Fluoreszenz wurde nach jedem Elongationsschritt in den Kanälen FAM/Sybr (*L. paracasei*, *L. acidophilus*, *B. lactis*) und JOE (16S rRNA) gemessen.

Tab. 3-3: Übersicht der Temperaturprogramme für die qRT-PCR

Species	Primer	Temperaturprogramm	Zyklen*
bakterielle 16S rRNA	Bac944F	(I) 95 °C, 15 min	
<i>Bacteria</i>	Bac1108R	(II) 94 °C, 15 s; 58 °C, 45 s	45
<i>L. paracasei</i>	Lp1	(I) 95 °C, 20 s	
	Lc2	(II) 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s	40
<i>L. acidophilus</i>	La1	(I) 95 °C, 20 s	
	La2	(II) 95 °C, 15 s; 60 °C, 60 s	40
<i>B. lactis</i>	Blact144F	(I) 95 °C, 15 s	
	Blact226R	(II) 94 °C, 20 s; 60 °C, 45 s	40

* nur Schritt (II)

Die Daten wurden mit der Rotor-Gene Software Vs. 6.0 (Corbett Life Science, Sydney Australien) analysiert. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte, sobald der Fluoreszenzschwellenwert ("Cycle Threshold" - C_T) überschritten wurde. Die DNA-Konzentrationen wurden in der exponentiellen Phase der Amplifikation bestimmt. Die absolute Quantifizierung erfolgte durch die Erstellung einer Standardkurve aus Amplifikationen bekannter DNA-Mengen. Hierzu wurden die Reinkulturen angezchtet, eine Verdünnungsreihe erstellt und aus jeder Verdünnungsstufe die DNA nach o. g. Methode extrahiert. Adäquat erfolgte die Bestimmung der Keimzahlen. Für die relative Quantifizierung wurden die Ergebnisse für die probiotischen Kulturen auf die Resultate für die 16S rRNA, welche die Gesamtbakterienzahl widerspiegelt, bezogen

3.3.2.4 Flüchtige Fettsäuren

Zur Bestimmung der prozentualen Anteile der flüchtigen Fettsäuren im Stuhl wurde 1 g des frischen Stuhls mit 2 ml destilliertem Wasser (4°C) versetzt, 2 min gevortext und 15 min bei 7000 x g zentrifugiert. Nach dem Abnehmen von 0,5 ml Überstand, Zugabe von

50 µl internem Standard (0,88577 mg iso-Caprone/100 ml) und nochmaliger Zentrifugation erfolgte die gaschromatographische Trennung (Tab. 3-4).

Tab. 3-4: Gaschromatographische Bedingungen für die Bestimmung flüchtiger Fettsäuren im Stuhl

Parameter	Bedingung
Gerät	GC 17A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Detektor	Flammenionisationsdetektor
Säule	FFAP 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm (Phenomenex, Torrance, USA)
Trägergas	Wasserstoff
Injektionstemperatur	250 °C
Temperaturprogramm	Starttemperatur: 105 °C (1,5 min) Anstieg: 35 °C/min Endtemperatur: 170 °C (2 min)
Detektionstemperatur	260 °C
Kalibration	Interner Standard iso-Caprone

3.3.2.5 Comet Assay

Vitalitätstest

Für die cyto- und genotoxischen Untersuchungen im FW wurden Zellen der Linie HT29 clone 19A auf eine Zellzahl von 2×10^6 Zellen/ml mit RPMI eingestellt. Die Bestimmung der Zellvitalität vor und nach der Inkubation mit FW erfolgte mit dem Trypanblau-Ausschlusstest [SANDSTRÖM 1965]. Dazu wurden je 20 µl Zellsuspension mit 20 µl einer 0,4 %igen Trypanblaulösung versetzt, einige Tropfen dieser Lösung auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Anzahl der vitalen (Trypanblau-ungefärbt) und toten (Trypanblau-gefärbte) Zellen unter dem Mikroskop Axiovert 25 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland) bei 400-facher Vergrößerung ermittelt. Die Vitalität wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Vitalität (\%)} = \text{Anzahl vitaler Zellen} / \sum \text{aller Zellen} \times 100$$

Comet Assay

Die Untersuchungen zur Genotoxizität des FW erfolgten nach der von SINGH et al. [1988] beschriebenen Methode der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese, die auch unter dem Namen „Comet Assay“ bekannt ist.

Für die Analysen wurden 30 µl des gewonnenen FW mit 270 µl der entsprechenden Menge Zellsuspension versetzt und 30 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Als Kontrolle diente eine 0,9 %ige NaCl-Lösung. Für jeden Versuchsansatz erfolgte eine Dreifachbestimmung. Die Inkubation wurde auf Eis gestoppt, die Inkubationsansätze aliquotiert und sofort 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 40 µl 0,7 %iger Low Melting Agarose resuspendiert und auf einem mit 0,5 %iger Normal Melting Agarose vorbeschichteten Objektträger pipettiert. Für die vollständige Einbettung der Zellen erfolgte ein nochmaliges Auftragen von 80 µl 0,7 %iger Low Melting Agarose. Im Anschluss an die alkalische Lyse (1 h, 4 °C, pH 10,0) wurden die Objektträger 20 min im Elektrophoresepuffer (Einwirkzeit ohne Spannung) inkubiert, um eine vollständige Denaturierung und Entwindung der DNA zu erreichen. Es folgte für weitere 20 min eine Elektrophorese bei 25 V und 300 mA. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger mit einem Neutralisationspuffer 3 x 5 min gewaschen und mit je 30 µl SYBR-Green (1:1000, Sigma-Aldrich-Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt.

Die Auswertung der Objektträger erfolgte bei 400-facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop Axiolab mit einer HBO 50-Einheit (Carl Zeiss GmbH, Jena) mit einem elektronischen Bildauswertesystem (Perspective Instruments, Suffolk, Großbritannien). Je Probe wurden 50 Spots erfasst. Die genotoxischen Veränderungen in den Zellen werden durch die Tail Intensity (TI, Anteil der Fluoreszenz im Schweif) charakterisiert. Die Durchführung aller Arbeitsschritte fand in abgedunkelten Räumen unter Rotlicht statt, um eine DNA-Schädigung durch UV-Licht zu vermeiden.

3.3.3 Urin

Die Stickstoffbestimmung im Urin erfolgte nach dem Homogenisieren analog der in Kapitel 3.3.1.2 beschriebenen Methode.

Die Messung der pH-Werte im Urin erfolgte unmittelbar nach dem Homogenisieren mit einem Digital-pH-Meter (Elektrode InLab[®] 420, Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) nach vorheriger Eichung.

3.3.4 Blut

3.3.4.1 Serumlipide

Die Analyse der Lipoproteine und des Triacylglycerols (TAG) im Serum erfolgte am Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Die HDL-Fraktion wurde von der LDL- und VLDL-Fraktion durch Fällung mit Magnesium und Phosphorwolframat getrennt [ASSMAN & SCHRIEWER 1981]. Das Gesamt- und HDL-Cholesterol (HDL-C) wurde mittels enzymatischer Cholesterol-Oxidase-Peroxidase Technik photometrisch am Analysengerät Synchron[®]LX 20 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) ermittelt. Die Bestimmung der Triacylglycerolkonzentrationen erfolgte photometrisch mit einer enzymatischen Glycerophosphat-Oxidase-Peroxidase-Reaktion am Analysengerät Synchron[®] LX 20 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Die Bestimmung des LDL-Cholesterol (LDL-C) erfolgte nach der Friedewald-Formel.

3.3.4.2 Immunologische Parameter

Immunphänotypisierung

Für die Bestimmung spezifischer immunphänotypischer Antikörpercluster (cluster of differentiation, CD) wurden 100 µl heparinisiertes Blut mit jeweils 20 µl FITC- bzw. PE-markierten monoklonalen Antikörpern 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Erythrocytenlyse erfolgte durch die Zugabe von 2 ml FACS-Lysing-Solution (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) über 10 min. Nach zweimaligem Waschen wurden die Leukocyten mit 1%iger Paraformaldehydlösung fixiert und mittels Durchflusscytometrie bei blaugrüner Lichtanregung gemessen (FACSscan[™], 488 nm Argonlaser, Simulset[™] Software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Es wurden 2000 Zellen im Lymphocytenfeld erfasst und der Prozentsatz folgender oberflächenmarkerexprimierender Lymphocyten ermittelt: CD3⁺, CD19⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺CD56⁺, CD57⁺, CD3⁺HLA-DR⁺ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland), CD25⁺ und CD54⁺ (BD Biosciences Pharmingen[™], Heidelberg, Deutschland; Tab. A-3). Die Zellanteile der Lymphocyten, Granulocyten und Monocyten wurden innerhalb des Simulset-Programms mit dem LeucoGate-Reagenz CD45/CD14 (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ermittelt.

Phagotest[®]

Die Phagozytoseaktivität der neutrophilen Granulozyten und Monozyten wurde mittels Phagotest[®] (Orpegen Pharma GmbH, Heidelberg, Deutschland) analysiert. 100 µl heparinisiertes Vollblut wurde mit FITC-markierten *Escherichia coli* (*E. coli*) 10 min bei 37 °C inkubiert. Die Zugabe eiskalter Quenclösung führte zum Reaktionsabbruch. Nach zwei Waschschritten wurden die Erythrocyten lysiert und anschließend eine DNA-Färbung durchgeführt. Die Messung erfolgte am Durchfluscytometer bei blaugrüner Lichtanregung (FACScan[™], 488 nm Argonlaser, CellQuest[™] Software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)). Es wurde der Prozentsatz der phagozytierenden Monozyten und Granulozyten sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle) erfasst.

Phagoburst[®]

Die Messung des oxidativen Bursts (intrazelluläre Vernichtung durch sauerstoffabhängige Mechanismen) erfolgte mittels Phagoburst[®] (Orpegen Pharma GmbH, Heidelberg, Deutschland). 100 µl heparinisiertes Vollblut wurde mit den verschiedenen Stimuli (unmarkierte opsonisierte *E. coli*, Phorbol-12-myristat-13-acetat und N-formyl-MetLeuPhe und Dihydrorhodamin 123 für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurden die Erythrocyten lysiert, die Proben gewaschen und anschließend eine DNA-Färbung durchgeführt. Die Messung erfolgte am Durchfluscytometer bei blaugrüner Lichtanregung (FACScan[™], 488 nm Argonlaser, CellQuest[™] Software; Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland). Es wurde der Prozentsatz oxidierender Monozyten und Granulozyten (Umwandlung des fluorogenen Substrates Dihydrorhodamin 123 zu Rhodamin 123) sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (Menge an umgesetztem Substrat pro Zelle, Enzymaktivität) erfasst.

Eosinophiles cationisches Protein (ECP)

Die Bestimmung des ECP im Serum wurde nach einer Gerinnungszeit von 60 min mittels Fluoreszenzimmunoassay (Pharmacia Diagnostics, Freiburg i.Br., Deutschland) durchgeführt und am UniCAP[®]100 fluorimetrisch gemessen (Pharmacia Diagnostics, Freiburg i.Br., Deutschland).

Macrophagen-derived Chemokin, Interleukin-16 und sE-Selectin

Die Analyse des Macrophagen-derived Chemokin (MDC), sE-Selectin und Interleukin-16 (IL-16) im Serum erfolgte mit spezifischen Testsystemen mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Die Absorptionsmes-

sungen wurden bei 450 nm am POLARstar (BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland) durchgeführt.

C-reaktives Protein

Die Konzentrationsbestimmung des C-reaktiven Protein (CRP) im Serum erfolgte nach dem Prinzip der Immunnephelometrie. Die Messung wurde am Analysengerät Synchron[®] LX 20 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) durchgeführt. Die Nachweisgrenze dieses Parameters lag bei 3,0 mg/l.

Immunglobulin E (IgE)

Die Bestimmung des IgE erfolgte auf der Basis eines Fluoroenzymimmunoassay mit dem CAP[®]-System (UniCAP-Reagenzien, Pharmacia Diagnostics, Freiburg i.Br., Deutschland). Die Messung erfolgte am UniCAP 250 (Pharmacia Diagnostics, Freiburg i.Br., Deutschland). Der Messbereich befand sich zwischen 2,0 kU/l und 5000 kU/l.

Interleukine (IL)

Die Bestimmung der Interleukine IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, IFN- γ und TNF- α erfolgte mit dem BD[™] Cytometric Bead Array Flex Set System (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) analog den Instruktionen des Herstellers. Die Proben wurden mittels Durchfluscytometrie gemessen (BD[™] LSR II, 3 Laser 405, 488 und 633 nm, CellQuest[™] Software (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) und mit der FCAP Array[™] Software Vs. 1.01 (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Das Detektionslimit lag bei 2,5 pg/ml.

3.4 Statistik

Für die Datenerfassung wurde Microsoft[®] Office Excel 2003 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA) verwendet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS Vs. 11.5 und Vs. 14.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Alle Daten wurden mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung überprüft. Im Fall einer Normalverteilung fand das Allgemeine Lineare Modell mit Messwiederholung (General Linear Model, GLM-Prozedur) Anwendung. Die Supplementationsfolge wurde als Kovariate mitgeführt. Um Unterschiede zwischen den gesunden Probanden und den Patienten mit AD zu evaluieren, wurden in Studie II die Gruppen (Gesunde und Patienten) als Zwischensubjektfaktor eingesetzt.

Im Fall nicht normalverteilter Daten basieren die Signifikanzberechnungen zur Ermittlung der Unterschiede zwischen den Interventionsperioden auf dem Wilcoxon-Test, während

Unterschiede zwischen den Studiengruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet wurden. Bei ungleicher Probenzahl fand der Scheffé-Test Anwendung.

Die Prüfung von Zusammenhängen erfolgte mit dem Korrelationskoeffizient nach Pearson wenn eine Normalverteilung vorlag bzw. nach Spearman im Fall nicht normalverteilter Daten. Die Korrelationen wurden unabhängig von der Supplementation ermittelt. Als Signifikanzniveau ist $P < 0,05$ zu Grunde gelegt. Daten mit $P < 0,1$ werden als Tendenzen beschrieben. Signifikanzen zwischen den Interventionsperioden sind mit ungleichen arabischen Indizes gekennzeichnet. Die Darstellung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mit griechischen Indizes.

4 Ergebnisse

4.1 Humanstudie I

In dieser Humanstudie wurde der Einfluss eines probiotischen Joghurts mit den Kulturen *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 (Probiotika I) gegen einen Placebojoghurt (Placebo I), der lediglich die konventionellen Starterkulturen *L. bulgaricus* und *S. thermophilus* (siehe Kap. 3.1.1) enthielt, bei 26 gesunden Probanden untersucht.

4.1.1 Nährstoffaufnahme und -ausscheidung

In der letzten Woche jeder Interventionsperiode wurde eine definierte Kost verabreicht, um die Ernährung der Probanden während der Sammelphasen zu standardisieren. Zwischen den beiden Perioden waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Fett- und Proteinzufuhr und der Getränkeaufnahme zu verzeichnen (Tab. 4-1). Der Body-Mass Index (BMI) wurde im Studienverlauf nicht signifikant beeinflusst (Probiotika $21,3 \pm 2,1 \text{ kg/m}^2$; Placebo $21,5 \pm 2,0 \text{ kg/m}^2$).

Tab. 4-1: Mittlere Nährstoffaufnahme während der standardisierten Kost

	Probiotika I	Placebo I
Frischmasse [g/d]	1678 ± 314	1671 ± 310
Trockensubstanz [g/d]	555 ± 101	544 ± 111
Getränke [ml/d]	2227 ± 500	2192 ± 536
Fett [g/d]	96 ± 28	97 ± 28
Protein [g/d]	79 ± 20	81 ± 18

keine signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$), GLM-Prozedur, $n = 26$

Für die täglich ausgeschiedene Masse faecaler Frisch- und Trockensubstanz ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Phasen. Die Fett- und Stickstoffexkretion sowie der pH-Wert im Stuhl unterlagen im Studienverlauf keinen Veränderungen (Tab. 4-2).

Tab. 4-2: Parameter der faecalen Ausscheidung

	Probiotika I	Placebo I
Stuhl [g/d]	122 ± 51	132 ± 63
Trockensubstanz [g/d]	26,1 ± 8,8	26,6 ± 9,2
Fett [g/d]	4,2 ± 2,3	3,8 ± 1,6
Stickstoff [g/d]	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,5
pH-Wert	7,1 ± 0,5	7,1 ± 0,5

keine signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$), GLM-Prozedur, $n = 26$

Die ausgeschiedene Urinmenge entsprach annähernd der Flüssigkeitszufuhr durch die Getränke und blieb durch die Supplementation unbeeinflusst. Für die Stickstoffgehalte und die pH-Werte im Urin waren ebenfalls keine Veränderungen zu verzeichnen (Tab. 4-3).

Tab. 4-3: Parameter der renalen Ausscheidung

	Probiotika I	Placebo I
Urin [ml/d]	2042 ± 582	2093 ± 460
Stickstoff [g/d]	10,2 ± 2,7	9,5 ± 2,8
pH-Wert	6,5 ± 0,3	6,5 ± 0,3

keine signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$), GLM-Prozedur, $n = 26$

4.1.2 Nachweis von *L. acidophilus* und *B. lactis* im Stuhl

Der Nachweis von *L. acidophilus* und *B. lactis* im Stuhl wurde mittels FISH durchgeführt. Diese Technik basiert auf dem Einsatz von fluoreszenzmarkierten Oligonucleotidsonden, die an spezifische 16S rRNA-Sequenzen der nachzuweisenden Bakterien binden. Die Auswertung erfolgte in Relation zu DAPI, einem Fluoreszenzfarbstoff, der mit Nukleinsäuren interkaliert und infolgedessen an alle DNA- und RNA-haltigen Strukturen im Stuhl bindet [WELLING et al. 2000]. Der Anteil der Gesamtbakterien im Stuhl wurde mit der EUB338-Sonde detektiert, die sich durch eine spezifische, alle Bakterien charakterisierende, 16S rRNA-Sequenz auszeichnet. Dieser war in der Probiotikaphase mit $79,2 \pm 10,4\%$ im Vergleich zu $83,2 \pm 9,7\%$ in der Placeboperiode tendenziell vermindert ($P = 0,087$). Die regelmäßige Aufnahme des probiotischen Joghurts über 5 Wochen resultierte in einem signifikanten Anstieg der Anteile von *L. acidophilus* und *B. lactis* im Stuhl (Tab. 4-4).

Tab. 4-4: Prozentuale Anteile von *L. acidophilus* und *B. lactis* an den Gesamtbakterien im Stuhl

	Probiotika I	Placebo I
<i>L. acidophilus</i>		
[% DAPI]	0,19 ± 0,41 ^a	0,02 ± 0,07 ^b
[% EUB]	0,22 ± 0,49 ^a	0,02 ± 0,08 ^b
Minimum	0	0
Maximum	2,14	0,30
<i>B. lactis</i>		
[% DAPI]	1,38 ± 1,78 ^a	0,35 ± 0,60 ^b
[% EUB]	1,71 ± 2,15 ^a	0,42 ± 0,71 ^b
Minimum	0	0
Maximum	7,46	2,48

^{a,b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), Wilcoxon-Test, $n = 26$

Es existierten sehr große individuelle Unterschiede bezüglich der faecalen Anteile der probiotischen Bakterien, die in den hohen Standardabweichungen zum Ausdruck kommen. Infolge der regelmäßigen Aufnahme von *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 wurde *L.*

acidophilus bei 30,8 % der Teilnehmer (8 von 26) mit Anteilen von größer als 0,1 % detektiert. In der Placebophase war *L. acidophilus* bei zwei von diesen Teilnehmern noch nachweisbar. Für *B. lactis* erfolgte ein positiver Nachweis bei 88,6 % der Probanden (23 von 26). In der Placebophase konnte *B. lactis* bei 11 der 26 Teilnehmer detektiert werden, jedoch mit signifikant geringerem Anteil an den Gesamtbakterien (Abb. 4-1).

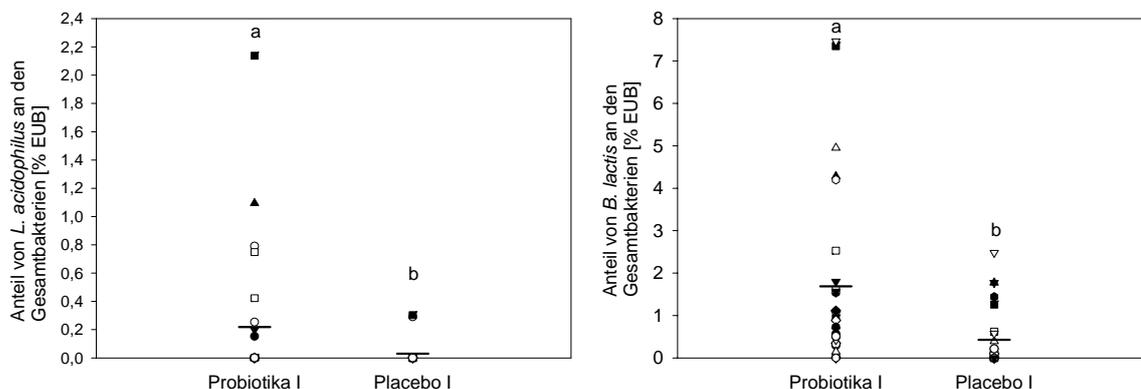


Abb. 4-1: Einfluss der Intervention mit probiotischem Joghurt auf die individuellen Anteile von *L. acidophilus* und *B. lactis* an den Gesamtbakterien im Stuhl; ^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten ungleicher Variablen ($P < 0,05$), Wilcoxon-Test, $n = 26$

4.1.3 Ausscheidung der flüchtigen Fettsäuren

Die Gesamtkonzentration flüchtiger Fettsäuren wurde durch den Verzehr des probiotischen Joghurts nicht beeinflusst ($P = 0,215$). Der gleiche Sachverhalt konnte für die Konzentration von Propionat, *iso*- und *n*-Butyrat, *iso*- und *n*-Valeriat sowie *n*-Caproat gezeigt werden. Lediglich für Acetat war ein tendenzieller Konzentrationsabfall ($P = 0,085$) nach der Probiotikaaufnahme im Vergleich zum Placebo zu verzeichnen (Tab. 4-5).

Tab. 4-5: Konzentration flüchtiger Fettsäuren im Stuhl [$\mu\text{mol/g}$]

	Probiotika I	Placebo I
Acetat	46,7 \pm 12,6	49,5 \pm 10,0
Propionat	16,7 \pm 8,7	16,9 \pm 7,0
<i>iso</i> -Butyrat	1,9 \pm 0,6	2,0 \pm 0,8
<i>n</i> -Butyrat	14,6 \pm 6,4	15,1 \pm 4,7
<i>iso</i> -Valeriat	2,3 \pm 0,7	2,4 \pm 0,9
<i>n</i> -Valeriat	2,1 \pm 0,8	2,0 \pm 0,8
<i>n</i> -Caproat	0,7 \pm 0,7	0,6 \pm 0,7
Konzentration gesamt	85,0 \pm 25,6	88,5 \pm 19,3

keine signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$), GLM-Prozedur, $n = 26$

Die molaren Verhältnisse (mol %) der bedeutendsten flüchtigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat betragen im Mittel 56:19:19 und unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den Phasen.

4.1.4 Cyto- und Genotoxizität des Faeceswassers

Die Bestimmung der Cyto- und Genotoxizität im FW erfolgte an HT29c-Zellen, einer differenzierten Tumorzelllinie, als repräsentatives Modell für humane Colonzellen.

Die Zellvitalität blieb durch die Inkubation mit dem FW der Probanden unbeeinflusst. Für die HT29c-Zellen wurde vor der Inkubation eine Vitalität von $96,9 \pm 2,0$ % gemessen. Nach 30-minütiger Inkubation mit isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) als Kontrolle betrug die Vitalität $90,7 \pm 5,2$ %. Die Inkubation mit dem FW aus der Probiotika- bzw. Placebophase resultierte in Werten für die Vitalität von $91,0 \pm 5,4$ % bzw. $89,0 \pm 7,6$ % und blieb somit durch die Intervention unbeeinflusst (Abb. 4-2).

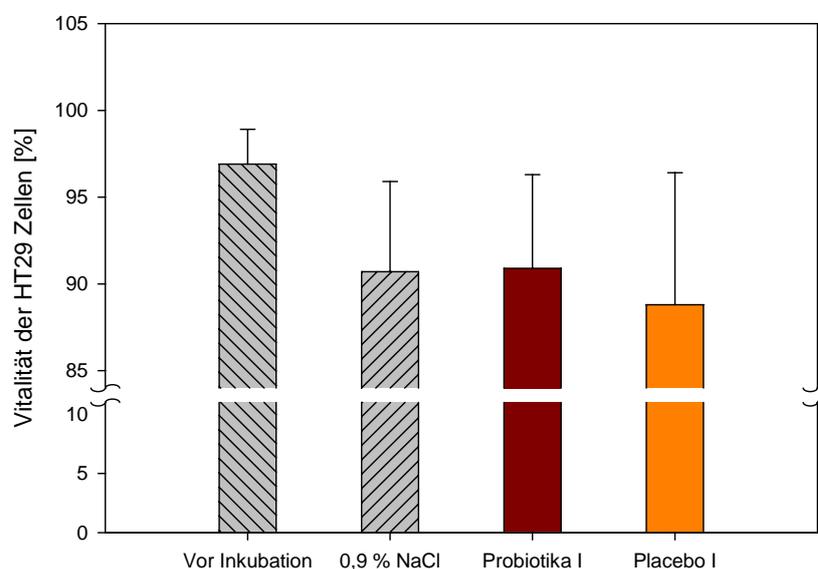


Abb. 4-2: Vitalität der HT29c-Zellen vor und nach der Inkubation mit Faeceswasser aus der Probiotika- ($n = 26$) und Placebophase ($n = 26$) sowie mit 0,9 % NaCl als Kontrolle ($n = 6$); keine signifikanten Unterschiede, Scheffé-Test

Die Genotoxizität im FW wurde *in vitro* mit dem Comet Assay bestimmt. Die TI entspricht dem Anteil der Fluoreszenz im Schweif als ein Maß für die induzierten DNA-Strangbrüche. Die Supplementation mit den probiotischen Kulturen *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 resultierte in einer signifikant verminderten Genotoxizität des FW in HT29c-Zellen sowohl im Vergleich zum Placebo als auch im Vergleich zur Inkubation mit der isotonischen Kochsalzlösung (Tab. 4-6).

Tab. 4-6: Genotoxizität im Faeceswasser

	0,9 % NaCl	Probiotika I	Placebo I
TI [%]	1,67 ± 0,36 ^b	1,91 ± 1,00 ^b	4,03 ± 1,57 ^a
Minimum	1,26	0,80	1,38
Maximum	2,16	5,75	8,48

^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,001$), Scheffé-Test, $n = 26$, 0,9 % NaCl $n = 6$

Eine signifikant, inverse Korrelation konnte zwischen den Anteilen von *B. lactis* im Stuhl und der TI im FW nachgewiesen werden ($r = -0,379$, $P = 0,029$, $n = 52$, Spearman). Zwischen den faecalen Anteilen von *L. acidophilus* und der TI im FW bestand hingegen kein Zusammenhang ($r = -0,100$, $P = 0,482$, $n = 52$, Spearman).

4.1.5 Serumlipide

Die Aufnahme von *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 über fünf Wochen führte zu einer signifikanten Reduktion der Serum-TAG-Konzentrationen um 11,6 % ($P = 0,045$) im Vergleich zum Placebo. Die Konzentrationen des Gesamtcholesterols (TC) und die Konzentrationen von LDL-C und HDL-C im Serum wurden durch die Supplementation mit probiotischem Joghurt nicht signifikant beeinflusst (Tab. 4-7).

Die Verhältnisse von LDL-C/HDL-C sowie TAG/HDL-C und TC/HDL-C sind ebenfalls zur Darstellung von Veränderungen im Lipidprofil geeignet. Die Verhältnisse von LDL-C/HDL-C und TC/HDL-C blieben durch die Supplementation unbeeinflusst, während sich für das Verhältnis TAG/HDL-C ein tendenzieller Abfall in der Probiotikaphase abzeichnete ($P = 0,094$).

Tab. 4-7: Konzentrationen der Serumlipide [mmol/l] und deren Verhältnisse

	Probiotika I	Placebo I
TC	4,45 ± 0,89	4,37 ± 0,92
LDL-C	2,47 ± 0,79	2,49 ± 0,75
HDL-C	1,52 ± 0,26	1,54 ± 0,26
TAG	0,84 ± 0,38 ^b	0,95 ± 0,42 ^a
Verhältnisse		
LDL-C/HDL-C	1,67 ± 0,58	1,66 ± 0,54
TAG/HDL-C	0,57 ± 0,27 [*]	0,64 ± 0,32
TC/HDL-C	2,99 ± 0,66	2,90 ± 0,64

^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), ^{*} Trend ($P < 0,1$), GLM-Prozedur, $n = 26$

4.1.6 Immunologische Parameter

4.1.6.1 Zelluläre Immunabwehr

Die prozentualen Anteile der Granulocyten, Monocyten und Lymphocyten an den Leucocyten blieben durch die Intervention unbeeinflusst (Tab. 4-8).

Die Supplementation mit den probiotischen Kulturen führte zu einem tendenziell niedrigeren Anteil der T-Helfer-Zellen (CD4⁺) im Vergleich zum Placebo (P = 0,053; Tab. 4-9). Das Verhältnis der T-Helfer-Zellen zu den cytotoxischen T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺-Ratio) unterlag jedoch mit $1,9 \pm 0,7$ in der Probiotikaphase und $1,9 \pm 0,8$ in der Placebophase keinen signifikanten Veränderungen (P = 0,944).

Tab. 4-8: *Leukocytenfraktionen im Blut [% der Leukocyten]*

	Probiotika I	Placebo I
Lymphocyten	39,7 ± 7,0	41,6 ± 8,7
Monocyten	6,9 ± 2,0	6,5 ± 1,5
Granulocyten	53,4 ± 6,4	51,8 ± 8,0

keine signifikanten Unterschiede (P < 0,05), GLM-Prozedur, n = 26

Für die Expression der T-Lymphocyten (CD3⁺), B-Lymphocyten (CD19⁺), cytotoxischer T-Lymphocyten (CD8⁺) und weiterer analysierter Lymphocytenoberflächenmarker im Plasma konnte kein signifikanter Einfluss der Supplementation mit *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 verzeichnet werden (Tab. 4-9).

Tab. 4-9: *Einfluss von L. acidophilus 74-2 und B. lactis 420 auf die Expression verschiedener Lymphocytenoberflächenmarker im Plasma [% der Lymphocyten]*

	Probiotika I	Placebo I
CD3 ⁺	68,7 ± 7,2	69,0 ± 7,3
CD19 ⁺	10,6 ± 3,0	10,2 ± 3,0
CD4 ⁺	40,6 ± 6,3*	42,0 ± 6,3
CD8 ⁺	24,2 ± 6,6	25,2 ± 7,5
CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,5 ± 7,4	15,0 ± 7,6
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	5,0 ± 3,1	5,2 ± 2,3
CD57 ⁺	9,8 ± 4,7	9,8 ± 5,7
CD8 ⁺ CD57 ⁺	6,5 ± 4,0	6,8 ± 4,2
CD25 ⁺	9,3 ± 2,4	10,5 ± 3,6
CD4 ⁺ CD25 ⁺	8,1 ± 2,2	9,2 ± 3,3
CD54 ⁺	56,0 ± 7,3	55,3 ± 6,9
CD4 ⁺ CD54 ⁺	10,3 ± 5,3	9,7 ± 3,1

keine signifikanten Unterschiede (P < 0,05), * Trend (P < 0,1), GLM-Prozedur, n = 26

4.1.6.2 Phagozytische Aktivität und oxidativer Burst

Der Phagozytoseprozess, als ein Parameter der unspezifischen zellulären Immunabwehr, gliedert sich in mehrere Phasen: die Chemotaxis, die Anlagerung der Partikel an die Zellen, die Phagozytose und die intrazelluläre Vernichtung durch sauerstoffabhängige (oxidativer Burst) und sauerstoffunabhängige Mechanismen. In dieser Arbeit wurde der Anteil phagozytischer und oxidierender Monozyten und neutrophiler Granulozyten sowie die Phagozytose- und Burstaktivitäten, die durch die mittlere Fluoreszenzintensität widergespiegelt werden, bestimmt.

Die Intervention mit *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 resultierte in einem signifikanten Anstieg der Anteile phagozytoseaktiver Monozyten und neutrophiler Granulozyten im Vergleich zum Placebo ($P = 0,044$; Abb. 4-3). Die Phagozytoseaktivität, gemessen als mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle, blieb dagegen unverändert mit 2129 ± 601 nach Probiotika und 2295 ± 664 nach der Placeboaufnahme ($P = 0,247$).

Im Gegensatz dazu wurden die Anteile burstaktiver Granulozyten und Monozyten durch die Probiotika nicht beeinflusst (Abb. 4-3). Die Burstaktivität war jedoch nach fünf Wochen Probiotika mit einer mittleren Fluoreszenzintensität pro oxidierender Zelle von 348 ± 187 im Vergleich zum Placebo mit 258 ± 134 signifikant erhöht ($P = 0,025$).

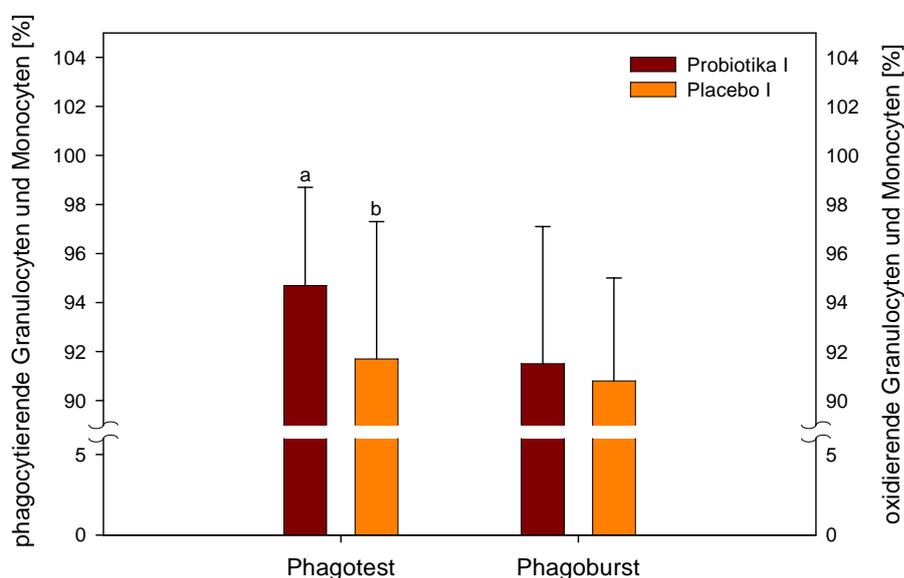


Abb. 4-3: Einfluss von *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf die Anteile phagozytose- und burstaktiver Granulozyten und Monozyten; ^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur, $n = 26$

4.2 Humanstudie II

In der zweiten Humanstudie wurde die Wirkung der probiotischen Kulturen *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 in einem Joghurtgetränk (Probiotika II) im Vergleich zu einem Placebogetränk (Placebo II), das lediglich *S. thermophilus* als konventionelle Joghurtkultur (siehe Kap. 3.2.1) enthielt, untersucht. Die Zielgruppe bildeten gesunde Probanden (n = 15) und Patienten mit atopischer Dermatitis (n = 15).

4.2.1 Auswertung der Ernährungsprotokolle

Die Analyse der fünftägigen Ernährungsprotokolle zeigte zwischen den Interventionsperioden keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Energie- und Nährstoffaufnahme bei den Studienteilnehmern (Tab. 4-10, Abb. 4-4). Zwischen den gesunden Probanden und den Patienten mit atopischer Dermatitis konnten keine Unterschiede in der Ernährung festgestellt werden. Aus diesem Grund wurde auf eine getrennte Darstellung nach Probandengruppen in Tab. 4-10 und Abb. 4-4 verzichtet.

Tab. 4-10: Energie- und Nährstoffaufnahme während Humanstudie II

	Probiotika II	Placebo II
Energie [kJ/d]	9316 ± 3208	8792 ± 2526
Kohlenhydrate [g/d]	272 ± 107	255 ± 73
Fett [g/d]	82 ± 30	76 ± 27
Protein [g/d]	84 ± 34	80 ± 27
Ballaststoffe [g/d]	22 ± 10	19 ± 7

keine signifikanten Unterschiede ($P < 0,05$), GLM-Prozedur, n = 30

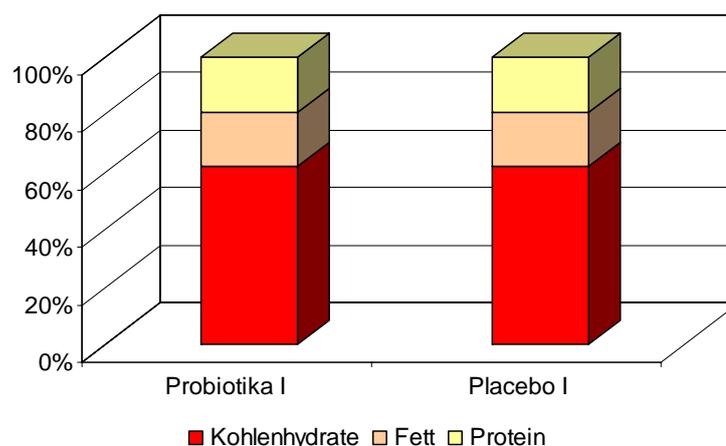


Abb. 4-4: Prozentualer Anteil der Hauptnährstoffe an der Gesamtenergieaufnahme

Der BMI unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gesunden und Patienten mit AD und betrug vor Beginn der Studie $22,1 \pm 3,2 \text{ kg/m}^2$ (n = 30). Obwohl sich die Energieauf-

nahme während der Studie nicht signifikant veränderte, wurde am Ende der Studie ein erhöhter BMI mit $22,7 \pm 3,2 \text{ kg/m}^2$ ($n = 30$, $P < 0,05$) verzeichnet.

4.2.2 Nachweis der probiotischen Kulturen im Stuhl

4.2.2.1 *L. paracasei* mittels FISH

Die achtwöchige Aufnahme des probiotischen Joghurtgetränks führte in beiden Studiengruppen zu einem signifikanten Anstieg von *L. paracasei* im Stuhl im Vergleich zur Auswasch- und Placebophase (Tab. 4-11).

Der prozentuale Anteil der Gesamtbakterien (EUB338-Sonde in Relation zu DAPI) veränderte sich im Studienverlauf nicht signifikant in beiden Probandengruppen (Gesunde: $82,7 \pm 6,1 \%$ vs. $81,9 \pm 5,3 \%$ vs. $82,9 \pm 4,9\%$; Patienten mit AD: $81,7 \pm 5,7$ vs. $81,9 \pm 5,0$ vs. $81,5 \pm 5,0$; Probiotika II vs. Wash-out vs. Placebo II).

Tab. 4-11: Prozentuale Anteile von *L. paracasei* an den Gesamtbakterien im Stuhl

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n = 15)			
<i>L. paracasei</i>			
[% DAPI]	$0,22 \pm 0,17^a$	$< 0,01^b$	$0,01 \pm 0,02^b$
[% EUB]	$0,27 \pm 0,20^a$	$0,01 \pm 0,02^b$	$0,01 \pm 0,02^b$
Minimum	0	0	0
Maximum	0,72	0,1	0,1
Patienten (n = 15)			
<i>L. paracasei</i>			
[% DAPI]	$0,25 \pm 0,32^a$	$0,02 \pm 0,05^b$	$0,02 \pm 0,04^b$
[% EUB]	$0,32 \pm 0,39^a$	$0,03 \pm 0,07^b$	$0,02 \pm 0,05^b$
Minimum	0	0	0
Maximum	1,33	0,26	0,17

^{a,b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), Wilcoxon-Test

Die Streuung des durchschnittlichen Anteils von *L. paracasei* war bei den Patienten mit AD höher als bei den gesunden Probanden. Infolge der Supplementation erfolgte ein positiver Nachweis für *L. paracasei* mit Anteilen von mehr als 0,1 % (bezogen auf DAPI) bei 67 % (10 von 15) der Patienten und 80 % (12 von 15) der gesunden Teilnehmer. Die hohen individuellen Unterschiede bezüglich des faecalen Anteils von *L. paracasei* werden in den hohen Standardabweichungen reflektiert. In der Auswasch- und Placebophase konnte *L. paracasei* bei 4 der 30 Probanden nachgewiesen werden (Abb. 4-5).

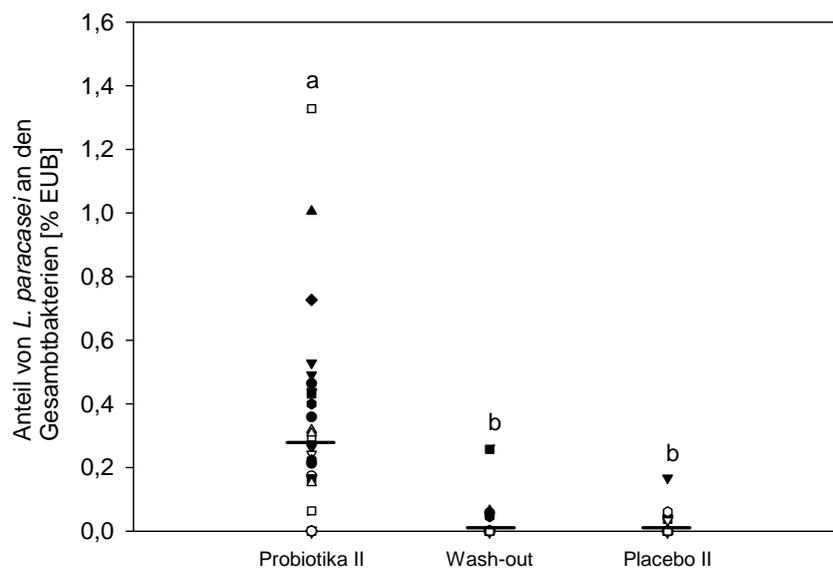


Abb. 4-5: Einfluss der Intervention mit dem probiotischen Joghurtgetränk auf die individuellen Anteile von *L. paracasei* an den Gesamtbakterien im Stuhl; ^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), Wilcoxon-Test, $n = 30$

4.2.2.2 *L. paracasei*, *L. acidophilus* und *B. lactis* mittels qRT-PCR

Aufgrund der verschiedenen Konzentrationen von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 in dem Joghurtgetränk wurde der Nachweis der probiotischen Kulturen im Stuhl zusätzlich mittels qRT-PCR, als sensitivere Methode, geführt.

Die Gesamtkeimzahl im Stuhl blieb durch Intervention mit den probiotischen Kulturen in beiden Studiengruppen unbeeinflusst. In der Placebophase ergab der Vergleich der Gesamtkeimzahl zwischen den Teilnehmergruppen signifikant höhere Werte bei den Patienten ($P = 0,018$). Die Supplementation mit den Probiotika resultierte in einem signifikanten Anstieg von *L. paracasei* (Gesunde $P = 0,001$; Patienten $P = 0,015$) und *B. lactis* (Gesunde $P = 0,003$; Patienten $P = 0,019$) in beiden Gruppen im Vergleich zum Placebo. Nach der zweiwöchigen Auswaschphase war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (Tab. 4-12). Für *L. acidophilus* konnte kein Einfluss der Intervention mit dem probiotischen Produkt auf die Keimzahl im Stuhl festgestellt werden.

Die Berechnung der relativen Anteile der einzelnen probiotischen Kulturen an der Gesamtkeimzahl im Stuhl zeigte die gleichen Veränderungen, wie sie für die absoluten Werte beschrieben wurden (Abb. 4-6). Lediglich bei den gesunden Probanden ergab sich für den Anteil von *L. paracasei* ein signifikanter Unterschied zwischen der Auswasch- und Placebophase ($P = 0,023$, Abb. 4-6). Für den absoluten Wert wurde hingegen nur eine Tendenz verzeichnet ($P = 0,078$, Tab. 4-12).

Tab. 4-12: Quantifizierung der probiotischen Kulturen *L. paracasei*, *L. acidophilus* und *B. lactis* sowie Gesamtzahl der Bakterien im Stuhl [kbE/g]

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n = 15)			
Gesamtbakterien	$2,8 \times 10^{11} \pm 2,2 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{11} \pm 2,5 \times 10^{11}$	$4,7 \times 10^{11} \pm 4,6 \times 10^{11} \alpha$
<i>L. paracasei</i>	$4,2 \times 10^8 \pm 3,5 \times 10^8 \text{ a}$	$8,9 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^8 \text{ b}$	$8,6 \times 10^6 \pm 5,4 \times 10^6 \text{ b}$
<i>L. acidophilus</i>	$3,7 \times 10^8 \pm 6,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8 \pm 1,6 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8 \pm 4,3 \times 10^8 \text{ b}$
<i>B. lactis</i>	$2,1 \times 10^8 \pm 1,4 \times 10^8 \text{ a}$	$5,3 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^8 \text{ b}$	$2,2 \times 10^7 \pm 5,3 \times 10^7 \text{ b}$
Patienten (n = 15)			
Gesamtbakterien	$2,1 \times 10^{11} \pm 1,2 \times 10^{11}$	$1,9 \times 10^{11} \pm 1,4 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^{11} \pm 1,5 \times 10^{11} \beta$
<i>L. paracasei</i>	$2,4 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8 \text{ a}$	$4,6 \times 10^7 \pm 1,4 \times 10^8 \text{ b}$	$6,1 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^8 \text{ b}$
<i>L. acidophilus</i>	$4,2 \times 10^8 \pm 3,6 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8 \pm 3,3 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8 \pm 4,1 \times 10^8$
<i>B. lactis</i>	$2,4 \times 10^8 \pm 1,8 \times 10^8 \text{ a}$	$3,3 \times 10^7 \pm 6,4 \times 10^7 \text{ b}$	$3,1 \times 10^7 \pm 5,5 \times 10^7 \text{ b}$

^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), Wilcoxon-Test

^{α, β} signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten ($P < 0,05$), Mann-Whitney-U Test

Der durchschnittliche Anteil von *L. paracasei* an der Gesamtkeimzahl betrug nach der Intervention mit den Probiotika $0,21 \pm 0,21$ % bei den gesunden Teilnehmern und $0,15 \pm 0,12$ % bei den AD-Patienten. Dieser variierte insgesamt bei allen Probanden zwischen 0 % und 0,84 %.

Obwohl der Anteil von *L. acidophilus* in der Probiotikaphase bei den Gesunden mit $0,25 \pm 0,56$ % höher war als in der Placebophase mit einem Anteil von $0,08 \pm 0,01$ %, wiesen die Phasen aufgrund der sehr hohen Streuung in der Interventionsphase keine Signifikanz zueinander auf ($P = 0,433$).

Der Anteil von *B. lactis* im Stuhl war nach der achtwöchigen Interventionsphase bei den gesunden Teilnehmern mit $0,13 \pm 0,13$ % bzw. $0,22 \pm 0,38$ % in der Patientengruppe signifikant im Vergleich zur Auswasch- und Placebophase erhöht (Abb. 4-6). Der individuelle Anteil von *B. lactis* an den Gesamtbakterien reichte von 0 % bis 1,44 %. Zwischen den beiden Zielgruppen unterschieden sich die Werte in keiner Phase signifikant.

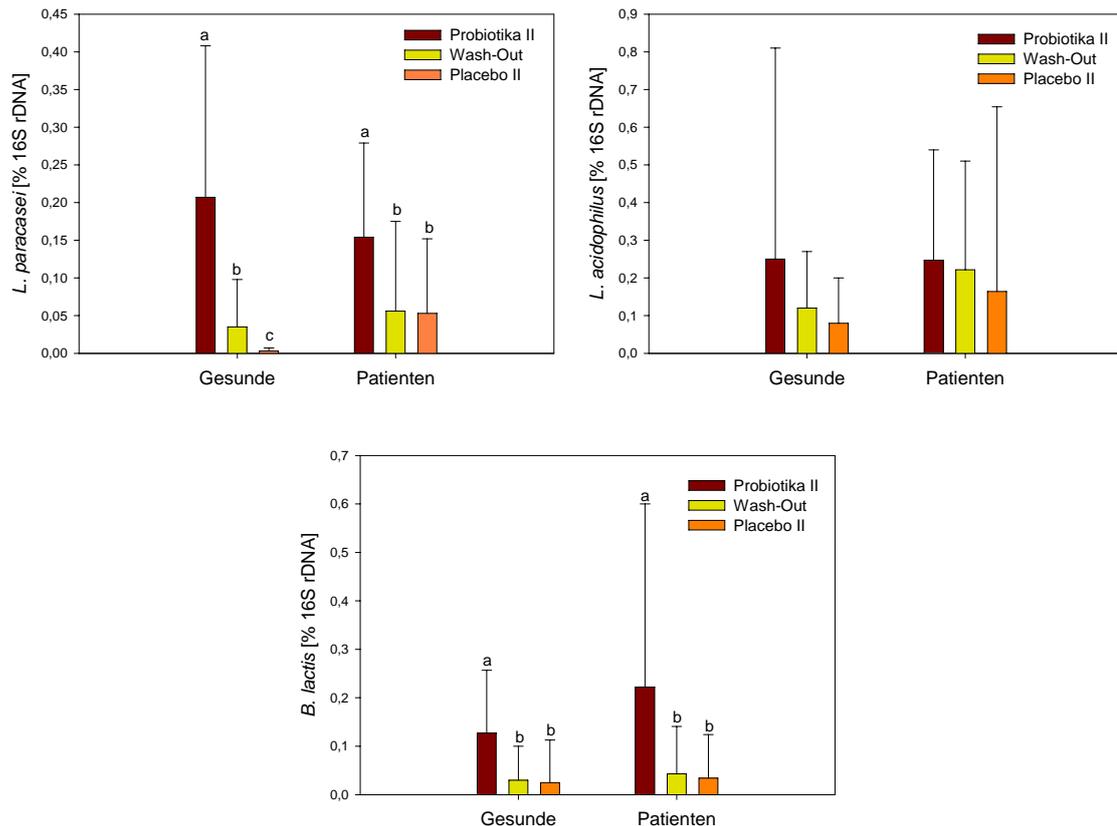


Abb. 4-6: Prozentuale Anteile von *L. paracasei*, *L. acidophilus* und *B. lactis* an der Gesamtkeimzahl im Stuhl detektiert mittels qRT-PCR; a, b, c signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), Wilcoxon-Test, Gesunde $n = 15$, Patienten $n = 15$

4.2.3 Flüchtige Fettsäuren und pH-Wert im Stuhl

Die Intervention mit den probiotischen Kulturen zeigte keinen Einfluss auf die Gesamtkonzentration der flüchtigen Fettsäuren im Stuhl (Tab. 4-13). Die Konzentrationen von Acetat, Propionat und *n*-Butyrat blieben ebenfalls unbeeinflusst. Innerhalb der gesunden Teilnehmer konnten für *iso*- und *n*-Valeriat sowie für *n*-Caproat in der Placebophase signifikant niedrigere Konzentrationen im Vergleich zur zweiwöchigen Auswaschphase beobachtet werden, während in der Patientengruppe keine Veränderungen der einzelnen flüchtigen Fettsäuren auftraten. Die Konzentration von *n*-Caproat unterschied sich in allen drei Phasen signifikant zwischen den gesunden Probanden und den Patienten mit AD ($P < 0,05$; Tab. 4-13).

Die molaren Verhältnisse (mol %) von Acetat, Propionat und Butyrat betragen im Durchschnitt bei den gesunden Teilnehmern 55:17:19 und 56:18:18 bei den Patienten mit AD. Bei den gesunden Teilnehmern blieben die faecalen pH-Werte während der Studie unverändert. Im Gegensatz dazu konnte bei den Patienten nach achtwöchiger Probiotikaufnahme

me ein signifikant niedrigerer pH-Wert im Vergleich zum Placebo festgestellt werden (Tab. 4-14; $P = 0,037$).

Tab. 4-13: Konzentration flüchtiger Fettsäuren im Stuhl [$\mu\text{mol/g}$]

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)			
Acetat	44,0 \pm 12,4	42,4 \pm 10,7	41,3 \pm 14,9
Propionat	12,9 \pm 4,5	13,7 \pm 3,1	12,3 \pm 2,8
iso-Butyrat	1,7 \pm 1,0 ^{ab}	2,0 \pm 0,8 ^a	1,5 \pm 0,7 ^b
n-Butyrat	12,7 \pm 5,2	13,8 \pm 4,3	12,7 \pm 7,7
iso-Valeriat	2,5 \pm 1,6 ^{ab}	2,9 \pm 1,3 ^a	2,1 \pm 1,1 ^b
n-Valeriat	2,4 \pm 1,3 ^{ab}	2,5 \pm 1,7 ^a	2,0 \pm 0,6 ^b
n-Caproat	1,3 \pm 1,0 ^{ab, α}	1,5 \pm 1,1 ^{a, α}	1,0 \pm 0,7 ^{b, α}
Konzentration gesamt	77,5 \pm 22,4	78,7 \pm 17,7	72,9 \pm 23,1
Patienten (n = 15)			
Acetat	42,4 \pm 10,2	44,8 \pm 21,4	45,2 \pm 14,6
Propionat	13,6 \pm 3,1	14,6 \pm 5,7	15,3 \pm 5,2
iso-Butyrat	1,7 \pm 0,7	1,9 \pm 0,9	1,8 \pm 0,8
n-Butyrat	12,4 \pm 6,4	12,7 \pm 5,9	12,7 \pm 6,7
iso-Valeriat	2,5 \pm 1,0	2,7 \pm 1,3	2,6 \pm 1,2
n-Valeriat	2,1 \pm 1,0	2,3 \pm 1,3	2,1 \pm 1,0
n-Caproat	0,4 \pm 0,6 ^{β}	0,4 \pm 0,9 ^{β}	0,4 \pm 0,6 ^{β}
Konzentration gesamt	78,5 \pm 16,6	79,0 \pm 32,9	80,1 \pm 23,2

^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur,

^{α, β} signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten ($P < 0,05$)

Tab. 4-14: pH-Werte im Stuhl

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)	6,7 \pm 0,5	6,8 \pm 0,5	6,8 \pm 0,4
Patienten (n = 15)	6,6 \pm 0,5 ^b	6,9 \pm 0,5 ^{ab}	7,0 \pm 0,4 ^a

^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur

4.2.4 Cyto-und genotoxische Untersuchungen mit Faeceswasser

Die Vitalität der HT29c-Zellen wurde durch die Inkubation mit dem FW der Probanden aus den einzelnen Studienphasen nicht beeinflusst. Da sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Vitalität zwischen den Gesunden und Patienten ergaben, wurden die Ergebnisse für alle 30 Teilnehmer in einer Abbildung zusammengefasst (Abb. 4-7).

Die Zellvitalität der HT29c-Zellen betrug vor der Inkubation $99,3 \pm 0,2$ %. Nach der Inkubation mit dem FW wurden Vitalitäten zwischen 97,6 % (Placebo) und 98,8 % (Probiotika) gemessen (Abb. 4-7).

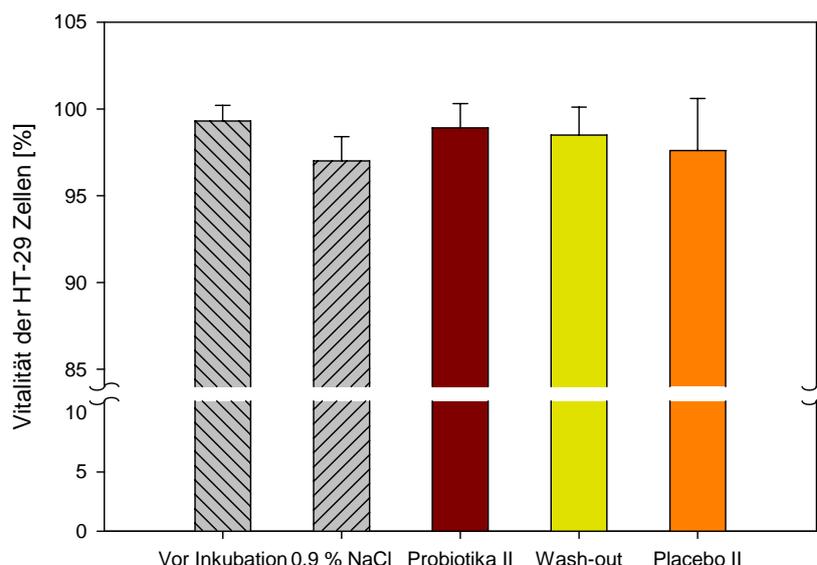


Abb. 4-7: Einfluss der Inkubation mit Faeceswasser auf die Vitalität der HT29c-Zellen ($n = 30$) und mit 0,9 % NaCl als Kontrolle ($n = 6$); keine signifikanten Unterschiede, Scheffé-Test

Die Supplementation mit *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 wirkte sich auf die Genotoxizität im FW unterschiedlich in den beiden Teilnehmergruppen aus. Während bei den Gesunden kein Einfluss der Supplementation verzeichnet werden konnte, zeigte sich bei den Patienten mit AD eine niedrigere genotoxische Wirkung der FW auf die HT29c-Zellen durch die Intervention mit den probiotischen Kulturen ($P = 0,029$). Ferner wurden in der Placebophase bei den Patienten signifikant höhere Werte für die TI als bei den Gesunden verzeichnet (Tab. 4-15). Weder bei den Gesunden noch bei den Patienten mit AD bestanden signifikante Korrelationen zwischen den faecalen Anteilen probiotischer Bakterien und der TI im FW.

Tab. 4-15: Genotoxizität im Faeceswasser

	0,9 % NaCl	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde ($n = 15$)				
TI [%]	8,0 ± 4,7	13,8 ± 8,4	13,9 ± 8,8	14,6 ± 6,8 ^α
Minimum	2,2	5,5	5,2	6,6
Maximum	13,4	35,6	36,6	27,2
Patienten ($n = 15$)				
TI [%]	10,4 ± 2,2 ^{ab}	16,7 ± 7,6 ^b	18,9 ± 9,1 ^{ab}	23,5 ± 9,2 ^{a,β}
Minimum	8,5	9,8	8,6	11,1
Maximum	13,5	34,5	47,7	38,9

^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen den Phasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur

keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle (0,9 % NaCl $n = 4$ in jeder Gruppe) Scheffé-Test

^{α, β} signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten ($P < 0,01$)

4.2.5 Konzentrationen der Serumlipide

Die Konzentrationen der Cholesterolfractionen und der TAG im Serum unterschieden sich nicht zwischen den gesunden Probanden und den Patienten mit AD.

Bei den gesunden Teilnehmern wurde in der Auswaschphase eine signifikant niedrigere Konzentration für das TC und für das LDL-C im Vergleich zum Placebo verzeichnet (Tab. 4-16). Dieser Sachverhalt spiegelt sich auch in den erniedrigten Verhältnissen von LDL-C/HDL-C ($P = 0,011$) sowie TC/HDL-C in der Auswaschphase wider ($P = 0,003$; Tab. 4-17). Dennoch waren keine Unterschiede zwischen Probiotika und Placebo festzustellen. In der Patientengruppe konnte kein Einfluss der Intervention auf die Serumlipidwerte sowie deren Verhältnisse gezeigt werden (Tab. 4-16, Tab. 4-17).

Tab. 4-16: Cholesterol- und Triacylglycerolkonzentrationen im Serum [mmol/l]

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)			
TC	4,88 ± 1,21 ^{ab}	4,62 ± 1,06 ^b	5,04 ± 1,20 ^a
LDL-C	2,91 ± 1,16 ^{ab}	2,70 ± 0,98 ^b	3,08 ± 1,17 ^a
HDL-C	1,58 ± 0,37	1,52 ± 0,32	1,55 ± 0,41
TAG	1,03 ± 0,58	0,93 ± 0,34	1,12 ± 0,61
Patienten (n = 15)			
TC	5,28 ± 0,69	5,27 ± 0,76	5,14 ± 0,89
LDL-C	3,24 ± 0,58	3,24 ± 0,64	3,16 ± 0,80
HDL-C	1,59 ± 0,31	1,56 ± 0,26	1,53 ± 0,28
TAG	1,27 ± 0,54	1,39 ± 0,55	1,28 ± 0,54

^{a,b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur

In der Gruppe der gesunden Teilnehmer war das Verhältnis von TC/HDL-C in der Probiotikaphase im Vergleich zum Placebo tendenziell niedriger ($P = 0,067$; Tab. 4-17).

Tab. 4-17: Verhältnisse der Serumlipide

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)			
LDL-C/HDL-C	1,90 ± 0,70 ^{ab}	1,82 ± 0,68 ^b	2,05 ± 0,71 ^a
TAG/HDL-C	0,68 ± 0,41	0,63 ± 0,24	0,81 ± 0,60
TC/HDL-C	3,15 ± 0,72 ^{ab}	3,10 ± 0,64 ^b	3,34 ± 0,74 ^a
Patienten (n = 15)			
LDL-C/HDL-C	2,10 ± 0,47	2,13 ± 0,51	2,10 ± 0,54
TAG/HDL-C	0,83 ± 0,40	0,93 ± 0,41	0,87 ± 0,41
TC/HDL-C	3,40 ± 0,54	3,44 ± 0,56	3,42 ± 0,60

^{a,b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur

4.2.6 SCORAD

Um den Einfluss der Intervention von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf das Hautbild zu dokumentieren, wurde der SCORAD als Parameter für den Schweregrad der Erkrankung in regelmäßigen Abständen für die Patienten erhoben. Zum Beginn der Studie betrug der SCORAD $24,0 \pm 5,4$.

Die Aufnahme des probiotischen Joghurts führte nach acht Wochen zu einer Reduktion des SCORAD um 15,5 % auf 20,3 ($P = 0,081$). In der Placebophase konnte eine geringe Abnahme des SCORAD auf 22,9 beobachtet werden ($P = 0,521$). Der Vergleich der beiden Endpunkte nach acht Wochen Supplementation mit Probiotika bzw. dem Placebo ergab eine tendenzielle Verbesserung des Hautbildes nach der Aufnahme des probiotischen Produkts ($P = 0,063$; Abb. 4-8)

Die einzelne Betrachtung der subjektiven Symptome wie Juckreiz und Schlaflosigkeit (Skala 1-10), sowie der prozentuale Anteil der betroffenen Körperoberfläche und die Intensität der AD (Trockenheit, Rötung, Ödem, nässender Zustand, Lichenifikation und Abschürfungen) als Bestandteile des SCORAD (Abb. A-1), zeigten ebenfalls keinen Einfluss der Supplementation mit Probiotika (Tab. 4-18, Abb. 4-9).

Tab. 4-18: Einfluss der Supplementation auf das Ausmaß, die Intensität und subjektive Symptome der atopischen Dermatitis

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Betroffene Körperfläche [%]	2,4 \pm 2,9	2,2 \pm 3,4	2,7 \pm 3,9
Intensität	4,5 \pm 1,3	4,7 \pm 1,0	4,6 \pm 0,8
Juckreiz	3,7 \pm 2,0	4,1 \pm 2,2	3,3 \pm 1,9
Schlaflosigkeit	1,7 \pm 2,0	2,4 \pm 2,9	1,3 \pm 1,3



Abb. 4-9: Veränderung des Hautbildes nach acht Wochen in Abhängigkeit von der Intervention

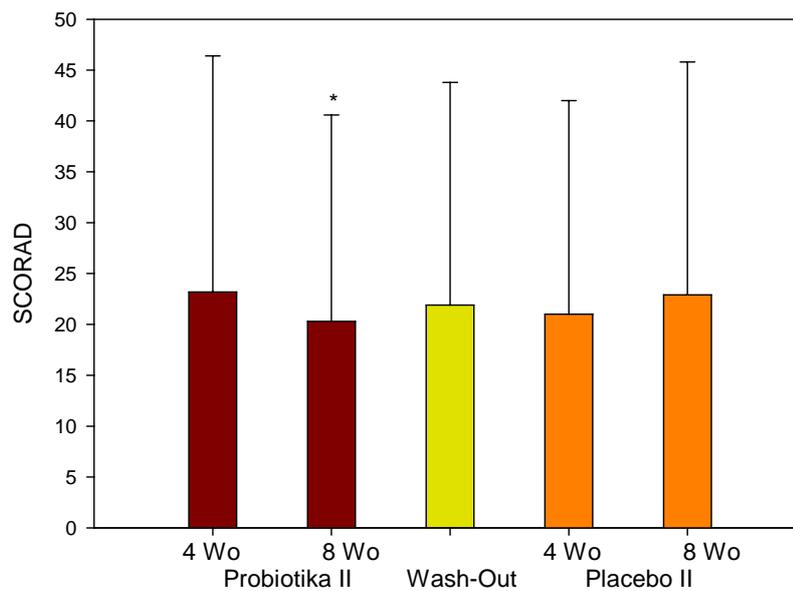


Abb. 4-8: Entwicklung des SCORAD bei den Patienten; keine signifikanten Unterschiede, GLM-Prozedur, *Trend im Vergleich zu 8 Wochen (Wo) Placebo ($P < 0,1$) $n = 15$

Von den 15 Patienten wiesen 10 Patienten ein atopisches-Ekzem bzw. IgE-assoziierte AD [nach NOVAK & BIEBER 2005] mit IgE-Konzentrationen über 150 kU/l und allergischer Rhinokonjunktivitis bzw. einer Sensibilisierung gegen Aero- und Nahrungsmittelallergene oder Asthma auf. Fünf Patienten litten an einem nicht-atopischen Ekzem mit IgE-Werten unter 150 kU/l und keiner nachweisbaren Sensibilisierung gegen Allergene oder asthmatische Erkrankungen (nicht IgE-assoziierte AD). Die Unterscheidung nach IgE- und nicht-IgE-assoziierte AD zeigte hinsichtlich des SCORAD das gleiche Resultat wie für die gesamte Patientengruppe beschrieben.

4.2.7 Immunologische Parameter im Blut

4.2.7.1 Parameter der zellulären Immunabwehr

Die prozentualen Anteile der Granulocyten, Monocyten und Lymphocyten an den Leukozyten blieben in den Studienphasen von der Intervention unbeeinflusst. Bei den Patienten mit AD wurden im Vergleich zu den Gesunden in allen Phasen signifikant erhöhte Anteile der Granulocyten, resultierend aus dem erhöhten Anteil der eosinophilen Granulocyten, festgestellt (Tab. 4-19).

Tab. 4-19: Leukozytenfraktionen im Blut [% der Leukocyten]

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)			
Lymphozyten	40,3 ± 9,1	39,1 ± 6,0	40,7 ± 6,8
Monozyten	6,3 ± 1,8	6,8 ± 1,9	6,2 ± 1,5
Granulozyten	52,8 ± 7,6 ^α	54,9 ± 6,5 ^α	53,7 ± 6,6 ^α
• neutrophile	49,1 ± 7,1	51,1 ± 4,8	48,9 ± 5,7
• eosinophile	2,4 ± 1,7 ^α	2,2 ± 1,6 ^α	2,4 ± 1,5 ^α
• basophile	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2
Patienten (n = 15)			
Lymphozyten	35,7 ± 7,4	35,5 ± 6,0	35,5 ± 8,6
Monozyten	6,3 ± 1,4	5,9 ± 1,5	6,1 ± 1,6
Granulozyten	58,2 ± 7,1 ^β	58,3 ± 6,5 ^β	58,3 ± 8,8 ^β
• neutrophile	49,4 ± 15,3	51,1 ± 7,1	51,8 ± 10,3
• eosinophile	4,2 ± 2,2 ^β	4,7 ± 3,2 ^β	4,2 ± 2,9 ^β
• basophile	0,4 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,2

^{α,β} signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten (P < 0,05)

Tab. 4-20: Einfluss von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf die Expression verschiedener Lymphocytenoberflächenmarker [% der Lymphocyten]

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)			
CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,6 ± 7,8	16,5 ± 5,8	15,1 ± 5,4
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	6,9 ± 3,1	7,1 ± 3,4	5,8 ± 3,1
CD57 ⁺	8,7 ± 5,2 ^a	5,7 ± 3,1 ^b	5,3 ± 3,7 ^b
CD8 ⁺ CD57 ⁺	7,0 ± 4,1	7,7 ± 3,5	7,4 ± 2,3
CD25 ⁺	11,3 ± 4,3 ^{ab}	10,5 ± 3,5 ^b	13,3 ± 4,8 ^a
CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,5 ± 3,2 ^{ab}	8,6 ± 2,7 ^b	11,3 ± 3,5 ^a
CD54 ⁺	69,1 ± 11,5	68,9 ± 9,9	68,1 ± 10,3
CD4 ⁺ CD54 ⁺	21,1 ± 8,7	22,5 ± 6,9	21,0 ± 8,0
Patienten (n = 15)			
CD16 ⁺ CD56 ⁺	15,0 ± 9,1	13,4 ± 7,4	12,7 ± 5,9
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	6,4 ± 2,1	5,5 ± 2,3	6,1 ± 2,1
CD57 ⁺	6,3 ± 4,4	6,9 ± 5,0	6,7 ± 3,5
CD8 ⁺ CD57 ⁺	5,9 ± 2,8	5,9 ± 2,5	6,0 ± 2,4
CD25 ⁺	11,7 ± 3,2	11,0 ± 3,4	12,9 ± 3,1
CD4 ⁺ CD25 ⁺	9,7 ± 2,8	8,9 ± 2,3	10,5 ± 2,1
CD54 ⁺	62,1 ± 10,1	63,0 ± 8,0	63,2 ± 8,3
CD4 ⁺ CD54 ⁺	15,1 ± 5,0 ^b	17,1 ± 3,7 ^a	18,3 ± 4,9 ^a

^{a,b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen (P < 0,05), GLM-Prozedur

Der Anteil der T-Helfer-Zellen (CD4⁺) an den Lymphocyten fiel zwei Wochen nach Absetzen der Probiotika bei den gesunden Teilnehmern signifikant ab (P = 0,003). Zwischen der Probiotika- und Placebophase konnte kein Unterschied bezüglich dieses Parameters verzeichnet werden. Das Verhältnis der T-Helfer-Zellen zu den cytotoxischen T-Zellen (CD4⁺/CD8⁺ Ratio) veränderte sich in der gleichen Weise. Die Expression der cytotoxi-

schen T-Zellen ($CD8^+$) blieb unbeeinflusst (Abb. 4-10). Bei den Patienten konnte kein Einfluss der Intervention auf die Expression von $CD4^+$ und $CD8^+$ sowie deren Verhältnis festgestellt werden (Abb. 4-10).

Die Analyse weiterer Lymphocytenoberflächenmarker ergab bei den gesunden Probanden eine signifikant erhöhte Expression von $CD57^+$ infolge der Intervention mit *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 ($P = 0,034$ im Vergleich zur Wash-out-Phase bzw. $P = 0,035$ im Vergleich zum Placebo). Die Expression der α -Kette des IL-2-Rezeptors ($CD25^+$) sowie der IL-2-Rezeptor-tragenden Helferzellen ($CD4^+CD25^+$) war in der Placebophase signifikant im Vergleich zur Auswaschphase erhöht. Zwischen Probiotika und Placebo bestand jedoch kein signifikanter Unterschied für diese Parameter (Tab. 4-20).

Bei den Patienten mit AD wurde für die $CD54^+$ -tragenden Helferzellen ($CD54^+CD4^+$) eine signifikant erniedrigte Expression nach der Intervention mit den probiotischen Kulturen im Vergleich zum Placebo verzeichnet ($P = 0,031$). Die Expression weiterer untersuchter Lymphocytenoberflächenmarker blieb unbeeinflusst (Tab. 4-20).

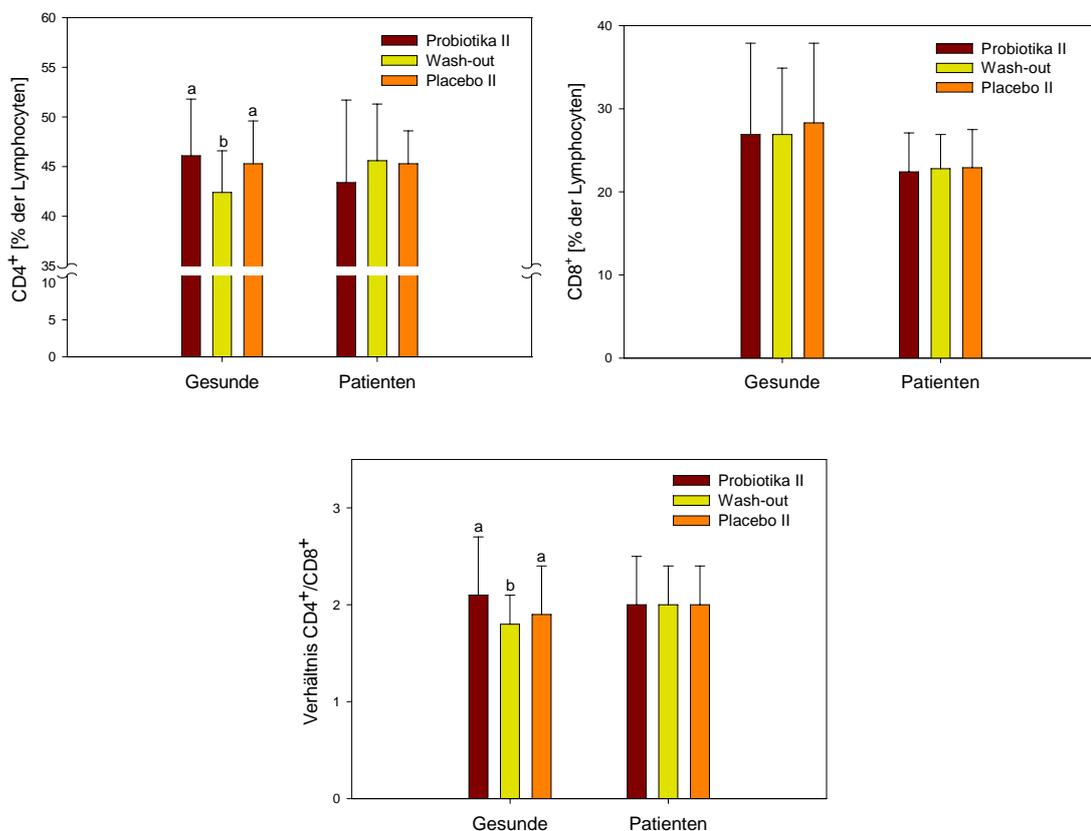


Abb. 4-10: Einfluss von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf die Expression von $CD4^+$ und $CD8^+$ sowie deren Verhältnis; ^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur, Gesunde $n = 15$, Patienten $n = 15$

4.2.7.2 Phagozytoseaktivität und oxidativer Burst

Bei den gesunden Teilnehmern waren die Anteile phagozytoseaktiver Monocyten und neutrophiler Granulocyten sowie die Phagozytoseaktivität dieser Zellen durch die Intervention mit den probiotischen Kulturen im Vergleich zur Placebophase signifikant erhöht ($P = 0,014$ bzw. $P = 0,029$). Während die Anteile phagozytoseaktiver Zellen in der Wash-out-Phase signifikant abfielen ($P = 0,005$), persistierte die Phagozytoseaktivität pro Zelle noch zwei Wochen nach Absetzen der Probiotika ($P = 0,198$). Die Anteile burstaktiver Monocyten und neutrophiler Granulocyten sanken zwei Wochen nach Absetzen der Probiotika signifikant ab ($P = 0,029$), unterschieden sich jedoch nicht zwischen Probiotika und Placebo ($P = 0,156$). Die Aktivität burstaktiver Monocyten und Granulocyten wurde hingegen in allen drei Phasen nicht signifikant beeinflusst (Tab. 4-21, Abb. 4-11 A).

Bei den Patienten mit AD blieben sowohl die Anteile phagozytose- bzw. burstaktiver Monocyten und Granulocyten als auch deren Aktivität durch die Supplementation mit den probiotischen Kulturen unbeeinflusst (Tab. 4-21, Abb. 4-11 B).

Tab. 4-21: Phagozytose- und Burstaktivität der Monocyten und neutrophilen Granulocyten [mittlere Fluoreszenzintensität]

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n = 15)			
Phagozytoseaktivität	2009 ± 518 ^a	1870 ± 453 ^a	1587 ± 608 ^b
Burstaktivität	321 ± 131	366 ± 189	445 ± 439
Patienten (n = 15)			
Phagozytoseaktivität	2068 ± 559	1627 ± 829	1836 ± 489
Burstaktivität	362 ± 219	288 ± 132	262 ± 131

^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur

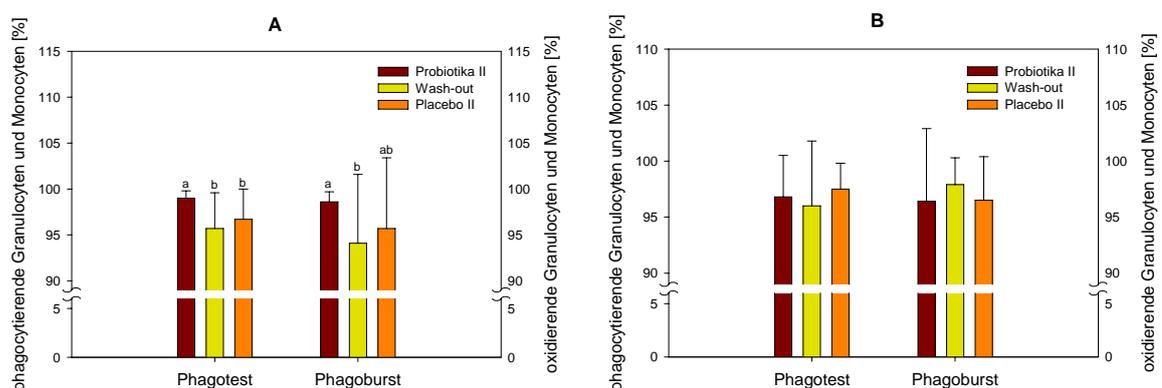


Abb. 4-11: Einfluss der Intervention mit *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf den Anteil phagozytischer bzw. oxidierender Monocyten und Granulocyten bei (A) den gesunden Teilnehmern und (B) den Patienten; ^{a, b} signifikante Unterschiede zwischen Mittelwerten der Studienphasen ($P < 0,05$), GLM-Prozedur, Gesunde $n = 15$, Patienten $n = 15$

4.2.7.3 Cytokine

Die Supplementation mit den probiotischen Kulturen zeigte keinen Einfluss auf die Cytokinkonzentration im Serum. Der Vergleich zwischen Patienten und gesunden Teilnehmern ergab eine signifikant höhere Konzentration von IL-2 ($P = 0,007$) und IL-16 ($P = 0,001$) im Serum der Patienten (Tab. 4-22). Ferner wurden die Konzentrationen von TNF- α , IFN- γ und IL-4 bestimmt. Die Werte für TNF- α und IFN- γ lagen zu allen Messzeitpunkten unter der Nachweisgrenze von 2,5 pg/ml. Für IL-4 wurden lediglich drei Werte über der Nachweisgrenze gemessen, so dass auf eine Darstellung der Daten für TNF- α , IFN- γ und IL-4 verzichtet wurde.

Tab. 4-22: Konzentrationen von IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und IL-16 im Serum [pg/ml] in Abhängigkeit von der Intervention mit *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)			
IL-2	43,1 ± 6,1 ^β	43,2 ± 11,3 ^β	45,9 ± 8,7 ^β
IL-6	4,35 ± 0,30	4,34 ± 0,40	4,27 ± 0,50
IL-8	2,62 ± 1,68	2,84 ± 0,82	2,16 ± 1,51
IL-10	3,87 ± 0,45	4,19 ± 0,46	4,02 ± 0,70
IL-12p70	4,27 ± 0,46	4,44 ± 0,47	4,17 ± 1,21
IL-16	141 ± 36,9 ^β	130 ± 33,4 ^β	126 ± 54,9 ^β
Patienten (n = 15)			
IL-2	50,1 ± 9,1 ^α	49,1 ± 8,4 ^α	51,1 ± 5,8 ^α
IL-6	4,70 ± 0,32	4,58 ± 0,43	5,13 ± 1,89
IL-8	3,28 ± 1,14	3,50 ± 0,79	3,29 ± 1,28
IL-10	4,07 ± 0,48	4,24 ± 0,48	4,21 ± 0,45
IL-12p70	4,42 ± 0,60	4,43 ± 0,66	4,35 ± 0,59
IL-16	217 ± 93,3 ^α	217 ± 92,5 ^α	240 ± 121 ^α

^{α,β} signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten ($P < 0,05$)

4.2.7.4 ECP, CRP, MDC, und sE-Selectin

Diese Parameter stehen in engem Zusammenhang mit dem Schweregrad der Atopischen Dermatitis und geben Auskunft über den Grad der entzündlichen Reaktion. Das C-reaktive Protein (CRP) gehört zu den Akute-Phase-Proteinen und ist ein unspezifischer Entzündungsparameter. Bei den gesunden Probanden lagen die Werte für das CRP zu allen Messzeitpunkten unter der Nachweisgrenze von 3,0 mg/l. In der Patientengruppe konnte nach dem achtwöchigen Konsum des probiotischen Getränks bei einem der 15 Patienten ein erhöhter CRP-Wert von 7,25 mg/l gemessen werden. In der Placebophase wurden dagegen bei 4 der 15 Patienten mit AD erhöhte CRP-Konzentrationen von 7,09 mg/l, 3,56 mg/l, 11,99 mg/l bzw. 3,23 mg/l gemessen. Die Werte der verbleibenden 11 Patienten lagen ebenfalls unter der Nachweisgrenze von 3,0 mg/l.

Die Konzentration des eosinophilen cationischen Proteins (ECP), des Macrophage-derived Chemokin (MDC) und sE-Selectin im Serum veränderten sich im Studienverlauf in beiden Teilnehmergruppen nicht signifikant durch die Intervention mit den Probiotika. Die Serumkonzentrationen des MDC waren bei den Patienten mit AD signifikant höher als bei den gesunden Kontrollpersonen ($P = 0,009$, Tab. 4-23).

Tab. 4-23: Serumkonzentrationen von ECP, MDC und sE-Selectin

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)			
ECP [$\mu\text{g/l}$]	11,6 \pm 7,90	9,31 \pm 6,67	8,68 \pm 10,3
MDC [pg/ml]	636 \pm 286 ^{β}	613 \pm 266 ^{β}	646 \pm 275 ^{β}
sE-Selectin [ng/ml]	25,7 \pm 11,2	24,4 \pm 10,6	26,5 \pm 11,0
Patienten (n = 15)			
ECP [$\mu\text{g/l}$]	11,1 \pm 10,2	9,75 \pm 12,2	13,7 \pm 14,0
MDC [pg/ml]	950 \pm 288 ^{α}	979 \pm 324 ^{α}	947 \pm 313 ^{α}
sE-Selectin [ng/ml]	25,8 \pm 15,4	25,4 \pm 15,4	25,6 \pm 16,6

^{α, β} signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten ($P < 0,05$)

4.2.7.5 Immunglobulin E

Das Immunglobulin E (IgE) vermittelt als Serum-Immunglobulin allergische Reaktionen vom Sofort-Typ (Typ 1). Das Krankheitsbild der AD ist in Abhängigkeit vom Schweregrad des Ekzems mit erhöhten Serum-IgE-Konzentrationen assoziiert. Der Vergleich der beiden Studiengruppen ergab für die Patienten mit AD signifikant höhere Serum-IgE-Konzentrationen in allen Phasen der Studie ($P = 0,038$). Im Studienverlauf waren sehr hohe individuelle Schwankungsbreiten für diesen Parameter zu verzeichnen. Es konnte jedoch kein Einfluss der Intervention mit den probiotischen Kulturen beobachtet werden. Während sich die mittleren Werte der gesunden Teilnehmer zwischen 29,6 kU/l und 32,2 kU/l bewegten, konnte für die Patienten eine deutlich höhere Streuung der IgE Konzentrationen im Serum verzeichnet werden. Besonders deutlich wird dies beim Vergleich der Interventionsphasen mit den Probiotika und dem Placebo (Tab. 4-24).

Tab. 4-24: IgE-Konzentration im Serum der gesunden Probanden und Patienten mit atopischer Dermatitis [kU/l]

	Probiotika II	Wash-out	Placebo II
Gesunde (n =15)			
IgE	32,2 \pm 23,6 ^{β}	31,6 \pm 24,2 ^{β}	29,6 \pm 23,8 ^{β}
Minimum	5,2	5,6	5,1
Maximum	94,2	101,0	93,2
Patienten (n = 15)			
IgE	524 \pm 836 ^{α}	1052 \pm 2125 ^{α}	1383 \pm 2806 ^{α}
Minimum	4,1	5,0	4,3
Maximum	2573	8073	8740

^{α, β} signifikante Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten, Mann-Whitney-U-Test ($P < 0,05$)

Obwohl die durchschnittliche IgE-Konzentration in der Probiotikaphase mit 524 kU/l um 62 % niedriger war als nach dem Placebo, erreichte der Unterschied keine statistische Signifikanz ($P = 0,649$).

Bei mehr als 80 % der erwachsenen Patienten ist die AD mit erhöhten Serum-IgE-Konzentrationen (> 150 kU/l) assoziiert, während 20 % der Patienten normale IgE-Level aufweisen [NOVAK & BIEBER 2003]. In der aktuellen Studie wurden bei 67 % der Patienten erhöhte IgE-Konzentrationen bzw. bei 33 % normale IgE-Level (< 150 kU/l) im Serum gemessen. Eine Wirkung der Probiotika konnte jedoch auch nicht bei einer Unterteilung in IgE-assoziierte AD und nicht-IgE-assoziierte AD festgestellt werden (Abb. 4-12).

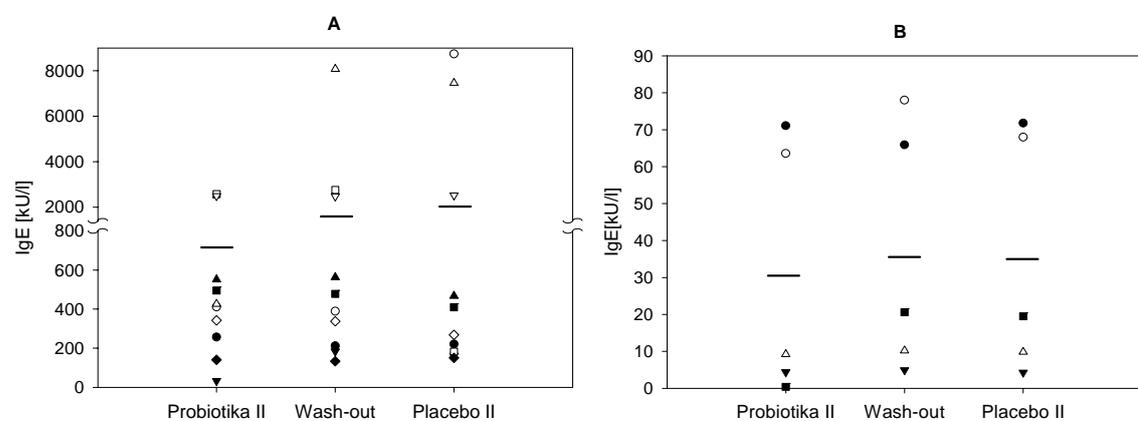


Abb. 4-12: Serum-IgE-Konzentrationen im Studienverlauf bei (A) IgE-assoziiierter AD ($n = 10$) und (B) nicht-IgE-assoziiierter AD ($n = 5$)

5 Diskussion

5.1 Nährstoffzufuhr und -exkretion

Um einen potentiellen Einfluss der Supplementation mit probiotischem Joghurt auf die Nährstoffausscheidung zu überprüfen und den Einfluss individueller Ernährungsgewohnheiten auszuschließen, erhielten die Teilnehmer in Humanstudie I während der Sammelphasen eine siebentägige, standardisierte und quantitativ an den Bedarf adaptierte Kost. Die durchschnittliche Nährstoffaufnahme unterschied sich zwischen den beiden Interventionsphasen nicht signifikant. Somit wurde das Ziel, eine vergleichbare Ernährung während der Sammelphasen zu gewährleisten, erfüllt. Die renale und faecale N-Exkretion sowie die faecale Fettsäureausscheidung wurden durch die Supplementation nicht verändert. Die Werte sind mit den Daten aus anderen Humanstudien sehr gut vergleichbar [KRAFT 2003, DITSCH 2006, DE PRETER et al. 2006]. Über eine Verbesserung der Darmtätigkeit bedingt durch einen höheren Wassergehalt und damit assoziierter Erhöhung der Stuhlmasse durch Probiotika wird berichtet [OLIVARES et al. 2006a]. Die tägliche Aufnahme von 300 g Joghurt mit *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 über fünf Wochen in Studie I zeigte jedoch keinen Einfluss der Probiotika auf das durchschnittliche Stuhlgewicht sowie auf die Trockensubstanz. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in anderen Studien beobachtet [MARTEAU et al. 2002, DE PRETER et al. 2007].

In Humanstudie II erfolgte die Dokumentation der Nährstoffaufnahme anhand des Freiburger Ernährungsprotokolls, das jeweils die letzten fünf Tage jeder Interventionsperiode geführt wurde. Die Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Aufnahme an Hauptnährstoffen und Ballaststoffen zwischen den Phasen, so dass ein Einfluss der Ernährung im Folgenden vernachlässigt werden kann. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt einen Anteil von 55-60 % Kohlenhydraten, 25-30 % Fett sowie 15 % Protein bezogen auf die tägliche Energieaufnahme [DGE 2000]. Im Rahmen dieser Studie wurden diese Empfehlungen von den Teilnehmern gut umgesetzt (Abb. 4-4). Die Betrachtung der täglichen Proteinzufuhr zeigt jedoch eine annähernd um das 1,5-fache über den Empfehlungen liegende Aufnahme, wie sie generell in Westeuropa und den USA beobachtet wird [METGES & BARTH 2000].

5.2 Detektion der probiotischen Kulturen im Stuhl

Das probiotische Konzept basiert auf den Interaktionsmechanismen der Bakterien des Gastrointestinaltrakts mit dem Wirt. Die hierbei vermittelten Signale sind maßgeblich von der

Zusammensetzung der Mikrobiota abhängig. Diese kann durch die orale Aufnahme von Probiotika beeinflusst werden. Der Nachweis der verabreichten probiotischen Kulturen ist vor allem im Hinblick auf die Interpretation weiterer Effekte essentiell. In dieser Arbeit wurden die supplementierten Species mit zwei verschiedenen Techniken auf der Grundlage spezifischer Sequenzen der rRNA (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) bzw. der rDNA (qRT-PCR) nachgewiesen.

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Detektion von *L. acidophilus* und *B. lactis* in Humanstudie I erfolgte im Stuhl mittels FISH unter Anwendung der speciesspezifischen Sonden Lba und LW420c+2. Letztere wurde in Anlehnung an den Primer von KOK et al. [1996] im Rahmen dieser Anwendung designt und deren Zugänglichkeit zur Zielsequenz durch die Zugabe von Helferoligonucleotiden verbessert [KLEIN et al. 2008]. Beide Sonden wurden erstmalig zum Nachweis in Stuhlproben angewandt. Aufgrund dessen existieren bislang keine direkt vergleichbaren Daten aus der Literatur zum Nachweis von *L. acidophilus* und *B. lactis* in Stuhlproben. Untersuchungen der Zusammensetzung der faecalen Mikrobiota basieren entsprechend der Fragestellung und der großen Vielfalt verschiedener Bakterien vor allem auf der Anwendung Gruppen- bzw. Gattungsspezifischer Sonden (Tab. 5-1).

Tab. 5-1: Übersicht zu den Anteilen von Bifidobakterien und Lactobacillen [% EUB338] im Stuhl gesunder Erwachsener

Sonde	DITSCHEID 2006	MUELLER et al. 2006	ROCHET et al. 2006	VAN DER WAAIJ et al. 2005	HE et al. 2003 [#]	HARMSSEN et al. 1999 und 2000
Lab158 ⁽¹⁾	0,4 ± 0,4	0,2 (0,2-0,3)	2,6 ± 2,6	0,08 ± 0,13	0,3	0,1
Bif164 ⁽²⁾	4,5 ± 6,3	1,5 (1,2-1,8)	6,4 ± 3,6	4,0 ± 8,0	4,1	4,6
EUB338*	84,4 ± 11,2	k. A.	k. A.	k. A.	81,3	60,9

⁽¹⁾ spezifisch für Lactobacillen und Enterococcen, ⁽²⁾ spezifisch für Bifidobakterien, * [% von DAPI], [#] Daten von älteren Personen (> 75 Jahre), k. A. – keine Angabe

Die Aufnahme von $2,8 \times 10^9$ kbE/d *L. acidophilus* 74-2 und $9,0 \times 10^8$ kbE/d *B. lactis* 420 in einem Joghurt über fünf Wochen resultierte in einem signifikanten Anstieg der faecalen Anteile beider Species (*L. acidophilus* 0,22 % von EUB nach Probiotika gegenüber 0,02 % nach Placebo, *B. lactis* 1,72 % von EUB nach Probiotika gegenüber 0,42 % von EUB nach Placebo), unabhängig von der Reihenfolge der Supplementation infolge des Cross-over-Designs (Abb. 5-1). Die Erhöhung faecaler Anteile von probiotischen Bakterien nach regelmäßiger Aufnahme über zwei bis fünf Wochen um mehr als das 1000-fache wurde auch in anderen Interventionsstudien für verschiedene Kulturen gezeigt [OUWEHAND et al. 2006, ROCHET et al. 2006, LARSEN et al. 2006, YAMANO et al. 2006]. Ein signifikanter Anstieg

der supplementierten Bakterien im Stuhl, wie er in dieser Studie beobachtet wurde, kann als ein klassischer Hinweis auf vorübergehende Kolonisation interpretiert werden [VALEUR et al. 2004]. *B. lactis* wurde bei 23 der 26 Teilnehmer nach fünfwöchiger Supplementation erfolgreich nachgewiesen. Verantwortlich dafür sind neben der Magen- und Gallensäurenstabilität die gut dokumentierten Adhäsionseigenschaften dieses Stammes. Ein Vergleich zur Adhäsion verschiedener Bifidobakterien-Stämme an den Mucus (isoliert aus humanen Stuhlproben verschiedener Altersstufen) zeigt, dass *B. lactis* 420 durchweg sehr gute Adhäsionseigenschaften besitzt [OUWEHAND et al. 1999b]. Auffallend ist, dass *B. lactis* auch in der Placebophase bei 11 der 26 der Probanden detektiert wurde. Die Anteile lagen jedoch signifikant niedriger im Vergleich zur Supplementationphase ($P = 0,002$).

Im Gegensatz zu *B. lactis* konnte *L. acidophilus* lediglich bei 8 der 26 Teilnehmer im Stuhl nach der Supplementation detektiert werden. Eine ähnliche Beobachtung wurde von MÄTTÖ et al. [2006] gemacht, die den Lactobacillen-Stamm *L. acidophilus* NCFB 1748 in einer vergleichbaren Dosis supplementierten und diesen bei nur 3 der insgesamt 14 Probanden im Stuhl nachweisen konnten. Für die vergleichsweise niedrige Wiederfindung in der aktuellen Humanstudie können verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden. Die Zusammensetzung der Mikrobiota ist individuell einzigartig [MAI & MORRIS 2004, TANNOCK et al. 2000]. Untersuchungen der Mikrobiota vor und nach der Supplementation mit probiotischen Bakterien zeigen bei den Teilnehmern sehr unterschiedliche Anteile der verabreichten Bakterien im Stuhl [TANNOCK et al. 2000, MÄTTÖ et al. 2006, JOHANSSON et al. 1993]. Dies lässt vermuten, dass die Kolonisation supplementierter Probiotika von individuellen Faktoren abhängt. TANNOCK et al. [2000] untersuchten den Einfluss von probiotischem *L. rhamnosus* auf die Zusammensetzung der faecalen Mikrobiota vor (sechs Monate), während (sechs Monate) und nach der Intervention (drei Monate). Sie detektierten geringe Anteile des Probiotikums bei allen Teilnehmern, deren Stuhl vorwiegend ein oder zwei *Lactobacillus*-Stämme enthielt. Im Gegensatz dazu konnte bei den Probanden, die eine höhere Variabilität an Stämmen der *Lactobacillus*-Gattung besaßen, *L. rhamnosus* als dominanter Stamm während der Intervention nachgewiesen werden. Somit scheint die Diversität innerhalb der Gattungen der autochthonen Mikrobiota einen wesentlichen Einfluss auf eine erfolgreiche Kolonisation supplementierter Probiotika auszuüben. Untersuchungen der faecalen Mikrobiota zeigten ferner, dass die Variabilität innerhalb der Bifidobakterien weitaus höher liegt als bei den Lactobacillen [KIMURA et al. 1997, FRANKS et al. 1998]. Insofern könnte diese Hypothese auch eine Erklärung für die gute Wiederfindung von *B. lactis* bei 88,6 % der Teilnehmer nach der Supplementation darstellen.

Der Nachweis der verabreichten Species erfolgte mit der FISH-Technik, die bevorzugte Methode für eine zuverlässige Identifizierung probiotischer Bakterien in der komplexen faecalen Mikrobiota [GUEIMONDE et al. 2004]. Ein wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens besteht in der Visualisierung prokaryotischer Zellen in ihrer natürlichen Umgebung unabhängig von deren Kultivierung sowie dem Nachweis auf Basis bekannter, spezifischer Sequenzen der rRNA [BLAUT et al. 2002]. Jedoch müssen Einschränkungen hinsichtlich der Nachweisgrenze, die bei 0,1 % liegt, berücksichtigt werden. Insofern ist ein höheres Vorkommen von *L. acidophilus* mit relativen Anteilen unter 0,1 % nach der Supplementation durchaus möglich.

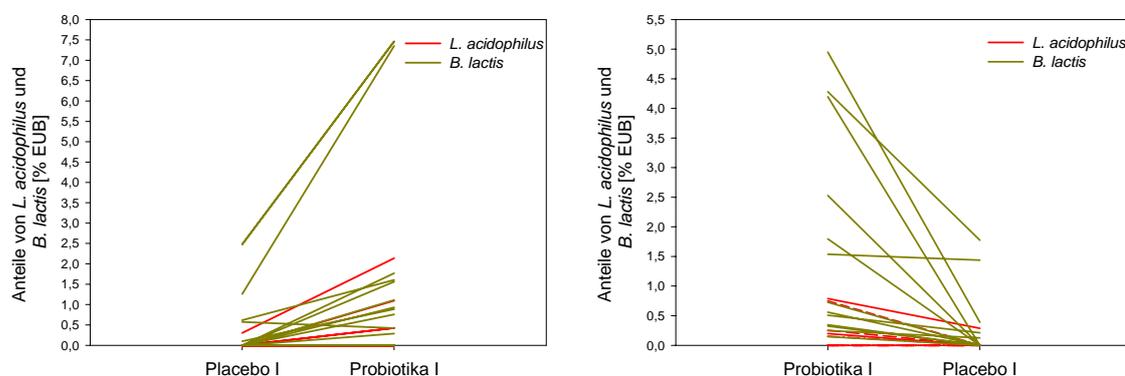


Abb. 5-1: Einfluss der Suppletionsfolge auf die faecalen Anteile von *L. acidophilus* und *B. lactis* (je $n = 13$)

Die aufgeschlüsselte Darstellung der Suppletionsfolge erlaubt zusätzliche Aussagen über die mögliche Zugehörigkeit der detektierten Species zur autochthonen Mikrobiota und über die Persistenz der verabreichten Probiotika. Von den 13 Probanden, die zuerst das Placeboprodukt bekamen, war in einem Fall *L. acidophilus* und in sechs Fällen *B. lactis* nachweisbar. Diese Beobachtung wurde bereits in früheren Untersuchungen gemacht [BARTOSCH et al. 2005, KÜHBACHER et al. 2006, LARSEN et al. 2006, OUWEHAND et al. 2006, KEKKONEN et al. 2008]. Da die Teilnehmer zum Zeitpunkt der Probennahme bereits acht Wochen (drei Wochen Vorperiode plus fünf Wochen Placebo) keine probiotischen Produkte zu sich nahmen, kann vermutet werden, dass diese Species bei diesen Teilnehmern Bestandteil der autochthonen Mikrobiota sind oder aber deren Herkunft aus anderen Nahrungsquellen resultiert. Für die tatsächliche Zugehörigkeit dieser Species zur autochthonen Mikrobiota der breiten Bevölkerung existieren bis zum jetzigen Zeitpunkt keine gesicherten Beweise [BARTOSCH et al. 2005]. Ohnehin stellt die Unterteilung einzelner Species bzw. Stämme in allochthone und autochthone Bakterien aufgrund der Individualität in der Zusammensetzung der Mikrobiota eine große Herausforderung dar.

Die Betrachtung der 13 Probanden die zuerst das probiotische Produkt konsumierten, zeigt in allen Fällen eine Verminderung der faecalen Anteile von *L. acidophilus* und *B. lactis* nach den folgenden fünf Wochen Placebo, der vermutlich auf die fehlende Aufnahme der Probiotika zurückzuführen ist. Somit ist eine regelmäßige Zufuhr probiotischer Bakterien essentiell, um deren Konzentrationen im Intestinaltrakt und im Stuhl aufrecht zu erhalten. Die relativen Anteile von *B. lactis* und *L. acidophilus* der Probiotika- und der Placebophase korrelierten signifikant ($r = 0,588$; $P = 0,002$; $n = 26$ bzw. $r = 0,754$; $P < 0,001$; $n = 26$). Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass die Präsenz einer Species vor der Supplementation die Ansiedlung von Stämmen der gleichen Species begünstigt (Abb. 5-1).

Die faecale Mikrobiota repräsentiert in erster Linie die Zusammensetzung der luminalen Mikrobiota des distalen Colons. Sie reflektiert jedoch nicht die Verhältnisse im gesamten Intestinaltrakt [ARICI et al. 2004]. Vergleichende Untersuchungen der Mikrobiota in Biopsieproben verschiedener Abschnitte des Intestinaltrakts mit der faecalen Mikrobiota konnten positive Korrelationen bzw. vergleichbare Werte zwischen den Bakteriengehalten der Gewebeproben und den Gehalten im Stuhl zeigen [VAN DER WAAIJ et al. 2005, OUWEHAND et al. 2004]. Die regelmäßige Aufnahme von *L. reuteri* und *L. rhamnosus* über 18 bzw. 28 Tage führte zu einem signifikanten Anstieg der supplementierten probiotischen Bakterien in den verschiedenen Abschnitten des Intestinaltrakts und im Stuhl der Probanden, die zudem miteinander korrelierten [ROSENFELDT et al. 2003, VALEUR et al. 2004]. In Anlehnung an diese Untersuchungsergebnisse kann der signifikante Anstieg der Gehalte im Stuhl als Hinweis für eine vorübergehende Kolonisation der verabreichten Bakterien im Colon gedeutet werden. ALANDER et al. [1999] detektierten nach Gabe eines Probiotikums dieses sowohl im Stuhl als auch in Colon-Biopsieproben aller Probanden. Zwei Wochen nach dem Absetzen der Supplementation war der Stamm noch in den Biopsieproben einiger Teilnehmer, jedoch nicht mehr im Stuhl nachweisbar. Insofern sollte berücksichtigt werden, dass mit dem alleinigen Nachweis probiotischer Bakterien in den Stuhlproben deren tatsächliche Kolonisation möglicherweise unterschätzt wird.

In Humanstudie II resultierte die tägliche Aufnahme von *L. paracasei* Lpc-37 über die Dauer von acht Wochen in einem signifikanten Anstieg dieser Species im Stuhl, so dass auch in dieser Studie von einer Kolonisation der supplementierten probiotischen Kultur ausgegangen werden kann. Dass es sich um eine vorübergehende Kolonisation handelt, belegt der signifikant verminderte Anteil von *L. paracasei* im Stuhl zwei Wochen nach Absetzen des probiotischen Produkts bei allen Probanden. Es existieren keine Unterschiede hinsichtlich der durchschnittlichen faecalen Anteile zwischen den gesunden Teilnehmern

und den Patienten mit AD. Somit scheinen die Kolonisationseigenschaften von *L. paracasei* unabhängig vom Krankheitsbild der atopischen Dermatitis zu sein, obwohl allgemein bei atopischen Erkrankungen ein verminderter Anteil von Lactobacillen im Stuhl beobachtet worden ist [BJÖRKSTÉN et al. 1999, BJÖRKSTÉN et al. 2001]. Hinweise auf krankheitsabhängige unterschiedliche Adhäsionseigenschaften probiotischer Bakterien liefern OUWEHAND et al. [2003], indem sie die Adhäsionsfähigkeiten verschiedener Lactobacillen-Stämme an den Mucus bzw. die Mucosa von Patienten mit Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, die ebenfalls im Zusammenhang mit reduzierten faecalen Lactobacillen und Bifidobakterienanteilen stehen, demonstrierten [PATHMAKANTHAN et al. 1999].

Der Anteil der Gesamtbakterien (in Relation zu DAPI) wurde durch die Supplementation in beiden Humanstudien nicht signifikant beeinflusst. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Interventionsstudien [YAMANO et al. 2006, LARSEN et al. 2006, ROCHET et al. 2006]. Untersuchungen zum Einfluss der Supplementation von Bifidobakterien bzw. Lactobacillen auf die Anteile der dominanten Gruppen wie *Bacteroides*, *Clostridia* und *Enterococcus* ergaben keine Veränderungen [LARSEN et al. 2006, ROCHET et al. 2006]. Jedoch waren signifikant höhere Anteile der jeweiligen Gattungen *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* durch die zusätzliche Aufnahme nachweisbar [ROSENFELDT et al. 2003, BARTOSCH et al. 2005, YAMANO et al. 2006].

Quantitative Real-Time PCR

Infolge der achtwöchigen Aufnahme des probiotischen Joghurtgetränks in Humanstudie II stiegen sowohl die absoluten Zahlen als auch die relativen Anteile von *L. paracasei* und *B. lactis* im Stuhl signifikant an. Diese Effekte sind mit großer Wahrscheinlichkeit auf die supplementierten Stämme zurückzuführen. SU et al. [2005] unterstützen diese These, indem sie in einer vergleichenden Untersuchung von species- und stammspezifischen Primerpaaren demonstrierten, dass auch die speciesspezifischen Primer durchaus geeignet sind, um supplementierte Stämme im Stuhl nachzuweisen.

Im Gegensatz dazu blieben die Konzentration und der relative Anteil von *L. acidophilus* im Stuhl unverändert. Die unterschiedlichen Resultate beruhen vermutlich auf den variierenden Konzentrationen der drei verabreichten Kulturen im Produkt. Diese sind dadurch bedingt, dass *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 aufgrund der positiven Ergebnisse der ersten Studie zugegeben wurden, während *L. paracasei* Lpc-37 das dominierende Probiotikum in dieser Studie war. Symbiotische Effekte von probiotischen Lactobacillen und Bifidobakterien wurden bereits in der Literatur beschrieben [MÄTTÖ et al. 2006, SHEU et al. 2006, WILDT et al. 2006]. Der stärkste Anstieg im Vergleich zum Placebo konnte für *L.*

paracasei beobachtet werden, der mit 10^{10} kbE/d in der höchsten Dosis supplementiert wurde. Das Überleben der Magen-Darm-Passage und der damit verbundene positive Nachweis im Stuhl hängen maßgeblich von der verabreichten Menge ab. In einer Dosis-Wirkungs-Studie zeigten CHRISTENSEN et al. [2006], dass die Erhöhung der verabreichten Menge probiotischer Bakterien um eine Zehnerpotenz zu einem Anstieg um den Faktor 20 im Stuhl führte. Gleichzeitig war eine Verminderung der interindividuellen Abweichungen zu beobachten. Interessant ist, dass die vergleichsweise geringe Dosis von 10^7 kbE/d *B. lactis* 420 ebenfalls zu einem signifikantem Anstieg von *B. lactis* von 10^7 kbE/g Stuhl auf 10^8 kbE/g Stuhl führte (Tab. 4-12). In Humanstudie I konnte ein identischer Effekt für *B. lactis* 420, jedoch bei einer höheren Dosis von 10^9 kbE/d, nachgewiesen werden. Ausschlaggebend für diese Wirkung sind unter anderem die bereits beschriebenen, guten Adhäsionseigenschaften dieses Stammes [OUWEHAND et al. 1999b]. Der Abfall der Werte zwei Wochen nach dem Absetzen der Supplementation verdeutlicht die Abhängigkeit des Effekts für *B. lactis* und *L. paracasei* von der regelmäßigen Zufuhr. Entsprechende Ergebnisse wurden in anderen Interventionsstudien dokumentiert und unterstreichen die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Aufnahme probiotischer Bakterien für deren dauerhaft erfolgreiche Kolonisation und Wirkung [ALANDER et al. 2001, CRITTENDEN et al. 2004, SULLIVAN et al. 2004, MÄTTÖ et al. 2006].

Dass die Aufnahme von *L. acidophilus* 74-2 zu einer Steigerung der faecalen Anteile von *L. acidophilus* führt, konnte in Humanstudie I gezeigt werden. Insofern resultiert der ausbleibende Effekt in Humanstudie II vermutlich aus der niedrigen aufgenommenen Dosis von $5,8 \times 10^6$ kbE/d. In einer Studie mit einem probiotischen Joghurt, der ebenfalls eine Dreifachkombination der Gruppen *L. paracasei*, *L. acidophilus* und *B. lactis* enthielt, wurde nach zehn Tagen Supplementation für den Stamm *L. acidophilus* NCFB 1748 ebenfalls das geringste Vorkommen in nur drei der 14 Probanden mit einer durchschnittlichen Konzentration von 10^5 kbE/g Stuhl gezeigt. Die Stämme *L. paracasei* F19 und *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 wurden stattdessen bei 14 bzw. 11 der insgesamt 14 Teilnehmer nachgewiesen [MÄTTÖ et al. 2006]. Da die Probiotika dieser Studie alle in vergleichbaren Konzentrationen von über 10^{10} kbE/d verabreicht wurden, scheint ein zusätzlicher Konkurrenzeffekt von *L. paracasei* F19 und *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 gegenüber *L. acidophilus* NCFB 1748 vorzuliegen.

Tab. 5-2: Gehalte probiotischer Bakterien in den Faeces nach vorangegangener Supplementation

	EIGENE STUDIE	MÄTTO et al. 2006	OuweHAND et al. 2006	BARTOSCH et al. 2005	ROCHET et al. 2006
Aufnahme					
Stämme und Dosis	<i>L. paracasei</i> Lpc-37 [7,8 x 10 ¹⁰ kbE/d] <i>B. lactis</i> 420 [1,2 x 10 ⁷ kbE/d] <i>L. acidophilus</i> 74-2 [5,8 x 10 ⁶ kbE/d]	<i>L. paracasei</i> F19 [2 x 10 ¹⁰ kbE/d] <i>B. lactis</i> Bb-12 [1 x 10 ¹¹ kbE/d] <i>L. acidophilus</i> NCFB 1748 [2 x 10 ¹⁰ kbE/d]	<i>B. lactis</i> 420 [10 ⁹ kbE/d]	<i>B. bifidum</i> BB-02 [3,5 x 10 ¹⁰ kbE/d] <i>B. lactis</i> BL-01 [3,5 x 10 ¹⁰ kbE/d] 6 g Raftilose	<i>L. paracasei subsp. paracasei</i> DN-114001** [1 x 10 ¹⁰ kbE/d]
Probanden	30 (19-31 Jahre)	14 (36-74 Jahre)	8 (28-48 Jahre)	18 (63-90 Jahre)	12 (23-44 Jahre)
Interventionsdauer	8 Wochen	10 Tage	4 Wochen	4 Wochen	10 Tage
Ausscheidung in den Faeces					
Nachweismethode	qRT-PCR	RAPD-PCR*	qRT-PCR	qRT-PCR	qRT-PCR
Primer	Lp1 & Lc2 Blact144F & Blact226R La1 & La2	OPA-2 OPA-3 OPA-5 OPA-13	Bifido5' & Bifido3'	BiBIF-1F & BiBIF-2R BlactF & BlactR	Lp1 & Lc2
Gehalte nach der Supplementation in den Faeces	<i>L. paracasei</i> [#] [3,3 x 10 ⁸ kbE/g] <i>B. lactis</i> [2,2 x 10 ⁸ kbE/g] <i>L. acidophilus</i> [3,8 x 10 ⁸ kbE/g]	<i>L. paracasei</i> F19 [7,9 x 10 ⁶ kbE/g] <i>B. lactis</i> Bb-12 [1,6 x 10 ⁵ kbE/g] <i>L. acidophilus</i> NCFB 1748 [3,2 x 10 ⁵ kbE/g]	<i>B. lactis</i> [~ 5 x 10 ⁸ kbE/g]	<i>B. bifidum</i> BB-02 [2,0 x 10 ⁹ kbE/d] <i>B. lactis</i> BL-01 [7,9 x 10 ⁷ kbE/d]	<i>L. paracasei</i> [7,9 x 10 ⁹ kbE/g]

* Random Amplified Polymorphic DNA, [#] Mittelwerte von allen Teilnehmern, unabhängig ob Gesunde oder Patienten

Unter Berücksichtigung der aufgenommenen Menge probiotischer Bakterien sind die Ergebnisse der eigenen Studie gut mit den faecalen Gehalten aus aktuellen Interventionsstudien vergleichbar, zumal die Nachweise zum Teil auf der Anwendung identischer Primerpaare (für *L. paracasei*) bzw. der gleichen Species (*B. lactis*) basieren. Zu berücksichtigen ist, dass der Nachweis der supplementierten Bakterien von MÄTTÖ et al. [2006] und BARTOSCH et al. [2005] auf Stammesebene erfolgte, während der Nachweis in den anderen Studien speciespezifisch geführt wurde (Tab. 5-2). Bei dem Vergleich dieser Studien ist hervorzuheben, dass die eigene Studie mit einer Dauer von acht Wochen über den längsten Zeitraum sowie mit den meisten Probanden durchgeführt wurde.

Vergleich der relativen Anteile von L. paracasei detektiert mittels FISH und qRT-PCR

Die Anteile von *L. paracasei* im Stuhl wurden sowohl mit FISH als auch mit qRT-PCR bestimmt. Ein Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zeigt für die relativen faecalen Anteile einen signifikanten Zusammenhang ($r = 0,401$, $P < 0,001$, $n = 90$). Auch in der aktuellen Literatur bestätigen vergleichende Analysen mit FISH und qRT-PCR gute Korrelationen für die Gehalte spezifischer Bakterien im Stuhl und in anderen Medien [GUEIMONDE et al. 2004, LAHTINEN et al. 2006, COLLADO et al. 2006]. Insofern sind beide Methoden für die Untersuchung bakterieller Gehalte in Stuhlproben gut geeignet und ermöglichen einen präzisen Nachweis für die applizierten Kulturen in Abhängigkeit von der Spezifität der eingesetzten Sonden bei der FISH-Methode bzw. der Primer im Rahmen der PCR. In diesem Zusammenhang soll erwähnt werden, dass der taxonomische Status der *L. casei* Gruppe, die auch einige probiotische Bakterien enthält, gegenwärtig noch diskutiert wird. Momentan werden dieser Gruppe die Species *L. casei*, *L. paracasei*, *L. zae* und *L. rhamnosus* zugeordnet [COLLINS et al. 1989, DICKS et al. 1996, COUDEYRAS et al. 2008].

Aussagen über die Lebensfähigkeit der nachgewiesenen Kulturen sind mit PCR nicht bzw. mit FISH indirekt möglich. Die Detektion mittels Real-Time PCR beruht auf der Quantifizierung bakterieller DNA. Aufgrund ihrer Stabilität ist die DNA kein Marker für Lebensfähigkeit, da auch tote Zellen noch bedeutende DNA-Gehalte besitzen können [LAHTINEN et al. 2006]. Die FISH-Technik basiert auf dem Nachweis spezifischer Sequenzen der 16S rRNA. Die Methode verfügt für vitale und sich vermehrende Zellen über eine gute Sensitivität, da diese hohe Mengen an 16S rRNA aufweisen, während in toten Zellen nur niedrige Gehalte zu finden sind [VALEUR et al. 2004]. Somit sprechen hohe Fluoreszenzintensitäten, wie sie auch in eigenen Untersuchungen beobachtet wurden, für vitale, wachsende Zellen (Abb. 3-3). Die geringere Halbwertszeit im Vergleich zur DNA macht die rRNA zu einem geeigneten Marker für die Überprüfung der Lebensfähigkeit [LAHTINEN et al. 2006]. Den-

noch ist das Ergebnis von weiteren Faktoren abhängig, wie der Menge an 16S rRNA, der Zugänglichkeit der Sonde zur Zielsequenz und der Fluoreszenzintensität der gebundenen Sonde [SMITH et al. 2004].

Vergleichende Untersuchungen zwischen traditionellen Kultivierungsmethoden, FISH und Real-Time PCR liefern übereinstimmende Ergebnisse, welche die Eignung der angewandten Methoden zum Nachweis der aktiven Bakterien unterstreichen [GUEIMONDE et al. 2004].

5.3 Probiotika und die Konzentration flüchtiger Fettsäuren

Die kurzkettigen Fettsäuren stellen die bedeutendsten bakteriellen Fermentationsprodukte im Colon dar. Bis zu 95 % der gebildeten kurzkettigen Fettsäuren werden durch die Epithelzellen resorbiert. Nur ca. 5 % der metabolisierten Fettsäuren werden mit dem Stuhl ausgeschieden. [TOPPING & CLIFTON 2001]. Deren Bildung ist maßgeblich vom Substratangebot, der Zusammensetzung der Mikrobiota sowie der intestinalen Transitzeit abhängig. Die regelmäßige Aufnahme probiotischer Bakterien kann durch Verschiebungen der mikrobiellen Zusammensetzung im Colon zu einem veränderten Fermentationsprofil beitragen.

Die Stämme *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 zeigten die Fähigkeit *in vitro* und *in vivo* die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren zu erhöhen [KRISTENSEN 2002, GMEINER et al. 2000, OUWEHAND et al. 2006]. Dennoch wurde in beiden Humanstudien im Vergleich zum Placebo keine Veränderung für die faecale Konzentration der flüchtigen Fettsäuren durch die Aufnahme der probiotischen Kulturen über fünf bzw. acht Wochen beobachtet. Aufgrund dessen wird vermutet, dass die verabreichten Probiotika den Metabolismus der individuellen Mikrobiota nicht maßgeblich beeinflusst haben. Die pH-Werte im Stuhl blieben bei den gesunden Probanden in beiden Studien entsprechend unverändert. Auffällig ist der signifikant verminderte pH-Wert im Stuhl der Patienten mit AD in Studie II nach der Probiotikaufnahme, obwohl die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren im Vergleich zum Placebo sich nicht verändert waren. Dies lässt vermuten, dass andere Produkte der bakteriellen Fermentation wie z. B. Lactat oder Succinat für den pH-Wert Abfall verantwortlich sein können.

Generell sind die Ergebnisse zum Einfluss probiotischer Bakterien auf die Konzentration flüchtiger Fettsäuren und den pH-Wert im Stuhl nicht eindeutig, wie die Übersicht in Tab. 5-3 zeigt. Neben variierenden Transitzeiten und damit verbundenem Einfluss auf den bakteriellen Metabolismus können auch indirekte Einflussfaktoren wie z. B. Alter, Stress

und Aktivitäten des neuroendokrinen Systems für die unterschiedlichen Effekte verantwortlich sein [MACFARLANE & MACFARLANE 2003]. Vom mikrobiologischen Standpunkt betrachtet, spielen die chemische Zusammensetzung, die verfügbare Substratmenge, die Anzahl und Zusammensetzung der individuellen Mikrobiota sowie die Interaktion der verschiedenen Species für die Effektivität der bakteriellen Fermentation eine entscheidende Rolle. In Humanstudie I erhielten alle Teilnehmer während der Sammelphasen eine standardisierte Kost entsprechend ihrem Bedarf. In Studie II zeigte die Dokumentation der Ernährungsgewohnheiten anhand von Ernährungsprotokollen ebenfalls eine gut vergleichbare Nährstoff- und speziell Ballaststoffaufnahme zwischen den Studienphasen (Tab. 4-10), so dass der Einfluss der Ernährung weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Die Werte für die einzelnen flüchtigen Fettsäuren sind zwischen beiden Studien und mit entsprechenden Daten aus der Literatur sehr gut vergleichbar [KIEBLING et al. 2002, DITSCHIED 2006, OUWEHAND et al. 2006]. Auch die molaren Verhältnisse von Acetat, Propionat und Butyrat gehen mit entsprechenden Daten aus verschiedenen Studien konform, die über durchschnittliche Anteile von 60:20:20 für diese Fettsäuren im Stuhl berichten [WONG et al. 2006, ST-ONGE et al. 2000]. Untersuchungen der Darminhalte von Unfallopfern ergaben, dass sich trotz unterschiedlicher Fermentationstätigkeiten in den verschiedenen Darmabschnitten, die molaren Verhältnisse zwischen dem proximalen und distalen Colon kaum unterschieden [CUMMINGS et al. 1987]. Im Caecum und im proximalen Colon ist die Fermentationsaktivität aufgrund des hohen Substratangebots am höchsten und nimmt in Richtung distales Colon ab. Der pH-Wert steigt entsprechend an. Insofern reflektieren die relativ konstant bleibenden molaren Verhältnisse der kurzkettigen Fettsäuren im Intestinum, dass die relative Absorptionskapazität der Darmmucosa in den einzelnen Abschnitten des Colons variiert [WONG et al. 2006]. Die Messung der faecalen Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren spiegelt annähernd die Verhältnisse im distalen Colon wider. Sie sind nicht repräsentativ für die Konzentrationen und damit auch für die Fermentationsaktivitäten im proximalen Colon [TOPPING & CLIFTON 2001]. Dementsprechend ist eine Veränderung der Fermentationsaktivität der Mikrobiota durch die Probiotika in den oberen Darmabschnitten nicht auszuschließen.

Tab. 5-3: Studien zum Einfluss probiotischer Bakterien auf die Konzentration flüchtiger Fettsäuren im Stuhl

Studie	Probiotika	SCFA	pH-Wert	Nachweis der Probiotika im Stuhl
JOHANSSON et al. 1998	<i>L. plantarum</i> 299v	Acetat ↑ Propionat ↑	↔	+
SPANHAAK et al. 1998	<i>L. casei</i> Shirota	Acetat ↑ Propionat ↑	↔	+
TANNOCK et al. 2000	<i>L. rhamnosus</i> DR20	↔	k. A.	+
GOSSENS et al. 2003	<i>L. plantarum</i> 299v	↔	↔	+
KIEBLING et al. 2002	<i>L. acidophilus</i> 145 <i>B. longum</i> 913	↔	↓	+
OUWEHAND et al. 2006	<i>B. lactis</i> 420	Acetat ↑ Valeriat ↑	k. A.	+
ROCHET et al. 2006	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> DN-114001	↔	↔	+
YAMANO et al. 2006	<i>L. johnsonii</i> La1	Valeriat ↑	↓	+
KLEIN et al. 2008*	<i>L. acidophilus</i> 74-2 <i>B. lactis</i> 420	↔	↔	+

SCFA - kurzkettige Fettsäuren; ↔ kein Einfluss; ↑ erhöht im Vergleich zum Placebo; ↓ erniedrigt im Vergleich zum Placebo; + positiver Nachweis ist erfolgt; k. A. – keine Angabe, * Humanstudie I

5.4 Probiotika und Genotoxizität

Neben der genetischen Disposition wird die Entstehung von Colontumoren im Zusammenhang mit den Ernährungsgewohnheiten und der Zusammensetzung der Mikrobiota des Colons diskutiert. Bestimmte Arten intestinaler Bakterien können aus den Nahrungskomponenten Metabolite bilden, die mutagenes und damit tumorförderndes Potential besitzen [RAFTER et al. 2007]. Die Exposition des Colonepithels gegenüber cyto- und genotoxischen sowie nicht-toxischen Substanzen des Darmlumens hängt somit maßgeblich von der Stoffwechselaktivität der intestinalen Mikrobiota und den zur Verfügung stehenden Substraten ab. Im Vergleich zu den in unlöslichen Matrices gebundenen Bestandteilen wirken freie und lösliche Substanzen besonders schädigend auf das Epithel. Diese lassen sich in hohen Konzentrationen in der wässrigen Phase des Stuhls nachweisen [RAFTER et al. 2004]. Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der Cyto- und Genotoxizität im FW, als ein geeigneter, nicht-invasiver Biomarker.

Das cytotoxische Potential der FW blieb in beiden Humanstudien von den Interventionen mit den probiotischen Bakterien unbeeinflusst. Vergleichbare Ergebnisse wurden nach dem Verzehr einer Rohwurst angereichert mit *L. paracasei* bzw. eines probiotischen Joghurts

mit *L. acidophilus* 145 und *B. longum* 913 erzielt [OßWALD 2003, OBERREUTHER-MOSCHNER et al. 2004].

Eine gesteigerte Rate epithelialer Zellproliferation gilt als ein Risikofaktor für die Colonicarcinogenese. Die Stimulation der proliferativen Aktivität im Colonepithel wird zum Teil durch cytotoxische Mechanismen vermittelt. Hierbei wird angenommen, dass speziell die sekundären Gallensäuren zur Cytotoxizität des FW beitragen [RAFTER et al. 1987]. In Humanstudie I wurden die gewonnenen Stuhlproben zusätzlich auf die Konzentrationen primärer und sekundärer Gallensäuren analysiert. Die Aufnahme von *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 zeigte keinen Einfluss der Probiotika auf die Konzentrationen der Gallensäuren im Stuhl [KELLER 2002]. Da sich jedoch die Konzentrationen primärer und sekundärer Gallensäuren im Stuhl und im FW unterscheiden [DITSCHIED 2006], kann ein Einfluss der Probiotika auf die Gallensäurenkonzentration im FW nicht ausgeschlossen werden.

Im Tierversuch führte die Gabe von Pro-, Prä- und Synbiotika zu einer Reduktion des Tumorrisikos aufgrund einer verringerten Exposition gegenüber Genotoxinen im Darm [KLINDER et al. 2004]. Ferner wird eine direkte Assoziation zwischen der Genotoxizität des FW und dem Auftreten von Colontumoren bei Ratten dokumentiert. POOL-ZOBEL et al. [1996] und ROWLAND et al. [1998] berichteten von einer protektiven Wirkung verschiedener Lactobacillen- und Bifidobakterien-Species auf die durch Carcinogene induzierten DNA-Schädigungen in Colonzellen von Ratten. Obwohl zahlreiche Tierversuche darauf hinweisen, dass Probiotika die Inzidenz von Tumoren und präcancerogenen Läsionen im Colon reduzieren, sind Humanstudien rar. Die in dieser Arbeit untersuchte Kombination von *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 in Joghurt zeigte nach fünfwöchigem Konsum eine signifikante Verminderung der Genotoxizität im FW im Vergleich zum Placebo. So können für diese Kulturen die protektiven Effekte hinsichtlich der DNA-Schädigung in Colonzellen aufgrund eines reduzierten genotoxischen Potentials der humanen FW bestätigt werden. *In vitro*-Untersuchungen demonstrierten bereits antigenotoxische Eigenschaften für verschiedene Stämme von *L. acidophilus* sowie für den aktuell eingesetzten Stamm *B. lactis* 420 [BURNS & ROWLAND 2004]. Für die Stämme der Kulturen *S. thermophilus* und *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, welche bei der herkömmlichen Joghurtherstellung eingesetzt werden, konnte mehrheitlich kein antigenotoxisches Potential nachgewiesen werden [BURNS & ROWLAND 2004, POOL-ZOBEL et al. 1996]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Humanstudie I sind die Daten von OBERREUTHER-MOSCHNER et al. [2004], die nach siebenwöchiger Aufnahme eines Joghurts mit den Probiotika *L. acidophilus* 145

und *B. longum* 913 durch das gewonnene FW eine signifikante Reduktion von DNA-Strangbrüchen in HT29c-Zellen zeigen konnten.

Die antigenotoxische Wirkung ist abhängig von der eingesetzten Species und deren Zellkonzentrationen. BURNS & ROWLAND [2004] zeigten beispielsweise für *L. plantarum* bzw. für *B. lactis* bei Konzentrationen unter 10^6 kbE/g bzw. 10^5 kbE/g keinen protektiven Effekt mehr. In Humanstudie II unterschieden sich die verabreichten Probiotika in der Zusammensetzung und Konzentration von Studie I. Bei den gesunden Teilnehmern konnte die antigenotoxische Wirkung der Probiotika aus Studie I für die neue Kombination von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 nicht bestätigt werden. Bei den Patienten mit AD führte die Supplementation nach acht Wochen allerdings zu einem signifikant verminderten genotoxischen Potential der FW. Da Gesunde und Patienten das gleiche Produkt verzehrten, liegt die Ursache für die divergierenden Effekte vermutlich in der Verschiedenheit der Probandengruppen. Untersuchungen der Mikrobiota von jungen Patienten mit AD haben gezeigt, dass diese im Vergleich zu Gesunden eine höhere Konzentration von *Staphylococcus aureus* und Enterobakterien sowie geringere Anteile von Bifidobakterien und Lactobacillen aufweisen [BJÖRKSTÉN et al. 1999, BJÖRKSTÉN et al. 2001, WATANABE et al. 2003]. Diese Bakteriengruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aktivitäten für die Enzyme β -Glucuronidase, β -Glucosidase, Nitro- und Azoreduktase, die u. a. für die Bildung mutagener Substanzen im Colon verantwortlich gemacht werden [MITAL & GARG 1995, MCBAIN & MACFARLANE 1998]. Enterobakterien und Clostridien besitzen hohe Aktivitäten für die β -Glucuronidase, während Bifidobakterien und Lactobacillen generell nur geringe Aktivitäten der Xenobiotika-metabolisierenden Enzyme aufweisen [WOLLOWSKI et al. 2001, KIM et al. 2006]. In der aktuellen Studie wurde die Zusammensetzung der Mikrobiota hinsichtlich Enterobakterien, Clostridien, Bacteroides etc. nicht detaillierter untersucht. Die Ergebnisse früherer Studien lassen jedoch die Vermutung zu, dass die beschriebenen Dysbalancen bei den Patienten mit AD höhere bakterielle Enzymaktivitäten und damit verbunden eine größere Belastung mutagener Substanzen im Colon zur Folge haben. Die signifikant höhere genotoxische Aktivität der FW der Patienten im Vergleich zu den gesunden Teilnehmern in der Placebophase unterstützt diese Hypothese. Dass durch die regelmäßige Aufnahme probiotischer Lactobacillen und Bifidobakterien die faecalen Konzentrationen bzw. die Aktivitäten bakterieller Enzyme, die zur Bildung toxischer Substanzen beitragen, gesenkt werden können, haben Humanstudien bereits gezeigt [GOLDIN et al. 1992, LING et al. 1994, SPANHAAK et al. 1998, GUERIN-DANAN et al. 1998, OUWEHAND et al. 2002]. Die deutlichsten aktivitätsmindernden Effekte

sind bei Probanden mit hohem Anfangsniveau zu verzeichnen [GUERIN-DANAN et al. 1998]. Der signifikante pH-Wert-Abfall nach der Probiotikaaufnahme könnte ferner zu einer Verschiebung der Aktivitätsoptima der Enzyme beigetragen haben. Dagegen sprechen jedoch die Ergebnisse von SPANHAAK et al. [1998] und OUWEHAND et al. [2002], die bei gleich bleibendem pH-Wert eine Reduktion der β -Glucuronidase- bzw. Azoreduktase-Aktivität beobachteten. Vergleichende Daten zu faecalen Enzymaktivitäten speziell bei Patienten mit AD sind bislang nicht verfügbar.

Die protektive Wirkung kurzkettiger Fettsäuren hinsichtlich der Entstehung von Colonkrebs wird aufgrund viel versprechender *in vitro*-Untersuchungen postuliert. Die Inkubation operativ entfernter humaner Colonicarcinomzellen mit Acetat, Propionat und *n*-Butyrat ergab eine signifikant verminderte Zellinvasion im Modell, wobei die deutlichste Hemmung ($P < 0,0001$) für *n*-Butyrat verzeichnet wird [EMENAKER et al. 2001]. Acetat, Propionat und Butyrat zeigten in Kombination eine Reduktion der durch H_2O_2 -induzierten DNA-Schädigung in isolierten humanen Colonzellen sowie in der Tumorzelllinie HT29 [ROSIGNOLI et al. 2001]. TODEN et al. [2007] berichteten von einem negativen Zusammenhang zwischen der DNA-Schädigung isolierter Colonzellen und der caecalen Konzentration flüchtiger Fettsäuren, wobei der stärkste Effekt für Butyrat verzeichnet wurde. Im Rahmen der beiden Studien konnten jedoch keine signifikanten Korrelationen zwischen Butyrat und der „TI“, als ein Parameter für die DNA-Schädigung, nachgewiesen werden (Studie I: $r = -0,086$, $P = 0,544$, $n = 52$; Studie II: $r = 0,089$, $P = 0,404$, $n = 90$). Auch für Acetat, Propionat und den Gesamtgehalt flüchtiger Fettsäuren ergab sich kein mathematischer Zusammenhang mit der DNA-Schädigung der HT29c-Zellen (Daten nicht dargestellt).

In einer Vergleichsuntersuchung wurden große intra- und interindividuelle Unterschiede für die Genotoxizität des FW in humanen Colonzellen beobachtet [OBWALD et al. 2000]. Obwohl das Cross-over-Design gewählt wurde, bei dem jeder Proband seine eigene Kontrolle bildet um individuellen Unterschiede gering zu halten, wurden im Rahmen der aktuellen Studien ebenfalls hohe individuelle Abweichungen nachgewiesen.

Der Vergleich der absoluten Werte für die TI zeigt Abweichungen zwischen den beiden Humanstudien. Diese sind auf Veränderungen des Karyotyps der eingesetzten HT29c-Zelllinie zurückzuführen, dessen Sensitivität zwischen den Zellpassagen differieren kann.

5.5 Einfluss der Probiotika auf den Cholesterolmetabolismus

Epidemiologische Studien bestätigen übereinstimmend eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Cholesterol-Konzentration im Serum und dem Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [BALLANTYNE & HOOGEVEN 2003]. Probiotische Mikroorganismen stehen in der Diskussion aufgrund verschiedener Mechanismen (siehe Kap. 2.3.2) zu einer Verminderung der Cholesterol-Konzentration im Serum beizutragen [NGUYEN et al. 2007, DE ROOS & KATAN 2000].

In vitro-Studien dokumentierten für die Species *B. animalis*, *L. acidophilus*, und *L. paracasei* die Fähigkeit, die Cholesterol-Konzentration im Kulturmedium zu senken [TAHRI et al. 1996, LEWIS & BURMEISTER 2005, LIN 2004, LIONG & SHAH 2005]. Diese Probiotika zeigten auch in Versuchen mit Ratten und Hamstern unter cholesterolangereicherter Kost positive Wirkungen auf den Cholesterolspiegel [LIONG & SHAH 2006, ABD EL-GAWAD et al. 2005, CHIU et al. 2006]. Diese Ergebnisse sind nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar, da Unterschiede im Cholesterolmetabolismus zwischen den Species bestehen [KAWASE et al. 2000]. XIAO et al. [2003] demonstrierten die Ungleichheit der Wirkung eines *B. longum* Stammes zwischen Tier und Mensch. Während in einem Rattenversuch die TC-, LDL-C- und TAG-Konzentrationen im Serum nach der Probiotikagabe signifikant abnahmen, konnte in einer Humanstudie nach vier Wochen lediglich bei den Teilnehmern mit einer moderaten Hypercholesterolämie (> 240 mg/dl) ein Abfall des TC beobachtet werden. Die Cholesterol-Konzentrationen der Probanden der eigenen Studien lagen im Normalbereich. Ein Einfluss der Probiotika auf die Gesamt-, LDL- und HDL-Cholesterol-Konzentrationen im Serum war nicht zu verzeichnen. Die beschriebenen Wirkungsweisen der Cholesterolassimilation, -bindung und erhöhten -ausscheidung zur Cholesterolsenkung im Serum scheinen demzufolge für die eingesetzten Stämme *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 nicht zuzutreffen. Vielmehr ergab die Analyse der faecalen Exkretion von Sterolen in Studie I, dass durch *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 die Cholesterol- und Coprostanolausscheidung und somit auch die Gesamtausscheidung der Sterole (mg/g Gefriertrockensubstanz) im Stuhl signifikant vermindert wurde [KELLER 2002]. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu dem beschriebenen Mechanismus der erhöhten Cholesterolausscheidung durch Probiotika. Zwischen den TC-Konzentrationen im Serum und im Stuhl bestehen keine biostatistischen Zusammenhänge ($r = -0,041$, $P = 809$, $n = 38$). Da die Probanden in Studie I während der Probennahme jeweils eine standardi-

sierte Kost über sieben Tage erhielten, kann der Einfluss der Ernährung weitgehend ausgeschlossen werden.

Neuere Studien zum Einfluss von Probiotika auf den Cholesterolfstoffwechsel erhärten die Annahme, dass probiotische Bakterien beim gesunden, normocholesterolemischen Menschen nicht zu einer signifikanten Senkung der Serum-Cholesterolkonzentration beitragen können (Tab. 5-4). Wenn ein Effekt erzielt wurde, dann am wahrscheinlichsten bei Personen mit Hypercholesterolemie [ANDERSON & GILLILAND 2000, KIEBLING et al. 2002, XIAO et al. 2003]. Ferner zeigte sich, dass die Matrix, mit der die probiotischen Bakterien aufgenommen werden eine Rolle spielt. So ist die positive Wirkung von Joghurt, aufgrund seiner Gehalte an Sphingolipiden und dem Fettsäureprofil *per se* auf das LDL-C/HDL-C-Verhältnis zu berücksichtigen [FABIAN & ELMADFA 2006, KIEBLING et al. 2002]. In Studie I wurden relativ große Mengen Joghurt (300 g/d) über insgesamt zehn Wochen verzehrt. Dennoch konnte kein Effekt auf das LDL-C/HDL-C-Verhältnis nach zehn Wochen Studiendauer (Studienbeginn 1,64 vs. Studienende 1,70, $P = 0,278$), unabhängig von den Probiotika, verzeichnet werden.

Die TAG-Konzentration im Serum wurden durch Aufnahme von *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 signifikant um 11,6 % ($P = 0,045$) vermindert. Ein identischer Effekt konnte nach der vierwöchigen Aufnahme von *L. casei* TMC0409 und *S. thermophilus* TMC1543 bei 20 Männern mit TC-Konzentrationen über 200 mg/dl beobachtet werden [KAWASE et al. 2000]. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist unklar. TARANTO et al. [1998] und KIKUCHI-HAYAKAWA et al. [2000] zeigten für *L. reuteri* bzw. *L. casei* Shirota im Tierversuch eine Reduktion der Serum-TAG-Konzentrationen um 40 % bzw. 50 %. Die Autoren vermuten als Ursache eine Verminderung der intestinalen Lipidabsorption bzw. einen erhöhten Lipidkatabolismus aufgrund veränderter Aktivitäten lipogener Enzyme. In der aktuellen Studie blieb die tägliche Fettaufnahme und -ausscheidung zwischen den Phasen unverändert. Demzufolge wurde auch die Fettabsorption mit 96,0 % in der Placebophase bzw. 95,4 % nach Probiotikaaufnahme nicht vermindert ($P = 0,265$), so dass dieser Mechanismus für die Senkung der TAG keine Erklärung bietet.

Tab. 5-4: Humanstudien zur Evaluation der Wirkung probiotischer Bakterien auf den Cholesterolspiegel im Serum

Studie	Probiotika (Medium)	Probanden	Dauer	Ergebnis
ANDERSON & GILLILAND 2000	<i>L. acidophilus</i> L1 (Milchgetränk)	22 ♀, 18 ♂ HL	4 Wo	TC ↓ LDL-C ↓ HDL-C ⇔ TAG ⇔
JAHREIS et al. 2002	<i>L. paracasei</i> LTH 2579 (Salami)	10 ♀, 10 ♂ NL	5 Wo	TC ⇔ LDL-C ⇔ HDL-C ⇔ TAG ⇔
LEWIS & BURMEISTER 2005	<i>L. acidophilus</i> LA-1 (Kapsel)	51 ♀, 28 ♂ HL	6 Wo	TC ⇔ LDL-C ⇔ HDL-C ⇔ TAG ⇔
SIMONS ET AL. 2006	PCC® <i>L. fermentum</i> (Kapsel)	28 ♀, 16 ♂ HL	10 Wo	TC ⇔ LDL-C ⇔ HDL-C ⇔ TAG ⇔
LARSEN et al. 2006	<i>B. lactis</i> Bb-12 <i>L. paracasei</i> CRL-341 (Kapsel)	46 ♀, 25 ♂ NL	3 Wo	TC ⇔ LDL-C ⇔ HDL-C ⇔ TAG ⇔
OLIVARES et al. 2006a	<i>L. gasseri</i> CECT5714 <i>L. coryniformis</i> CECT5711 (Joghurt)	15 ♀, 15 ♂ NL	4 Wo	TC ⇔ LDL-C ⇔ HDL-C ⇔ TAG ↓ (P = 0,086)
FABIAN & ELMADFA 2006	<i>L. casei</i> DN-114 001 (<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>) (Joghurt)	33 ♀ NL	4 Wo	TC ⇔ LDL-C ⇔ HDL-C ⇔ TAG ⇔
GREANY et al. 2008	<i>L. acidophilus</i> DDS-1 <i>B. longum</i> UABL-14 (Kapsel)	33 ♀, 32 ♂ NL	8 Wo	TC ⇔ LDL-C ⇔ HDL-C ⇔ TAG ⇔
EIGENE STUDIE*	<i>L. acidophilus</i> 74-2 <i>B. lactis</i> 420 (Milchgetränk)	13 ♀, 13 ♂ NL	5 Wo	TC ⇔ LDL-C ⇔ HDL-C ⇔ TAG ↓ (P = 0,045)

♀ Frauen, ♂ Männer, NL - Normolipidämiker; HL – Hypercholesterolämiker, ⇔ kein Einfluss; ↑ erhöht im Vergleich zum Placebo; ↓ vermindert im Vergleich zum Placebo, * Humanstudie I

5.6 Einflussnahme auf das Hautbild bei atopischer Dermatitis

Die AD ist eine chronisch-rezidivierende, entzündliche Hauterkrankung, deren Behandlung präventive bzw. therapeutische Maßnahmen erfordert. Die Standardtherapie bei akuten Krankheitsschüben besteht in der Anwendung von topischen Corticosteroiden, wobei neue therapeutische Ansätze, wie die Anwendung der Arzneistoffe Pimecrolimus und Tacroli-

mus genutzt werden, die jedoch ebenfalls Nebenwirkungen hervorrufen [BREUER et al. 2004, ASHCROFT et al. 2005].

Als alternative Behandlungsmöglichkeit der AD zeigte die regelmäßige, orale Zufuhr von probiotischen Bakterien in zahlreichen Studien, vorrangig bei Säuglingen und Kleinkindern, viel versprechende präventive bzw. therapeutische Effekte [ISOLAURI et al. 2000, KALLIOMÄKI et al. 2001b, KALLIOMÄKI et al. 2003, RAUTAVA et al. 2002, WESTON et al. 2005].

In Humanstudie II wurde die Wirkung der Kombination von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf das Hautbild bei erwachsenen Patienten (Alter 19 - 31 Jahre) mit einer leichten bis moderaten atopischen Dermatitis (SCORAD 14,6 - 34,4) untersucht. In dieser Zielgruppe resultierte die Aufnahme über acht Wochen in einer tendenziellen Verbesserung des SCORAD um 15,5 % ($P = 0,081$). Obwohl in der Placebophase der SCORAD ebenfalls leicht vermindert wurde ($P = 0,521$), zeigte der Vergleich der beiden Endpunkte der Versuchsphasen eine deutlichere Reduktion des SCORAD nach Probiotika ($P = 0,063$).

Möglicherweise hat der Schweregrad der AD zu Beginn der Studie einen Einfluss auf den Erfolg der Intervention. BROUWER et al. [2006] dokumentierten einen deutlich verbesserten Effekt auf den SCORAD durch Probiotika bei schwerer Ausprägung der AD zu Studienbeginn. Dagegen zeigten ISOLAURI et al. [2000] eine signifikante Verbesserung des SCORAD bei milder AD infolge der Aufnahme von *B. lactis* Bb-12 bzw. *L. rhamnosus* GG. In der aktuellen Studie konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe des SCORAD zu Beginn der Studie und dem SCORAD nach der Supplementation mit den Probiotika verzeichnet werden ($r = -0,118$, $P = 0,676$, $n = 15$). Somit ist davon auszugehen, dass die Ausprägung der AD zum Studienbeginn die Stärke der Reaktion auf die probiotischen Bakterien in der eigenen Studie nicht beeinflusst.

Die Studien von VILJANEN et al. [2005b] und ROSENFELDT et al. [2003] konnten ebenfalls keinen signifikanten Effekt einer Kombination probiotischer Kulturen auf die Verbesserung des SCORAD nach vier bzw. sechs Wochen Supplementation nachweisen. Lediglich die Untergruppen IgE-sensibilisierter Patienten bzw. Teilnehmer mit einer allergischen Konstitution zeigten eine signifikante Verminderung des SCORAD durch die probiotischen Bakterien. Im Gegensatz dazu dokumentierten BROUWER et al. [2006] keinen Unterschied hinsichtlich der IgE-Sensibilisierung der Teilnehmer auf die Beeinflussung des SCORAD. In der eigenen Studie konnte eine vergleichbare Unterteilung der Patienten in IgE-assoziierte AD und nicht-IgE-assoziierte AD keine deutlich verbesserte Wirkung der

Probiotika auf den SCORAD zeigen. Es ist zu berücksichtigen, dass die vergleichsweise geringe Teilnehmerzahl die Aussage für die Untergruppen mit $n = 5$ für das nicht-atopische Ekzem bzw. $n = 10$ für das atopische Ekzem limitiert.

Zahlreiche Studien belegen den positiven Effekt von probiotischen Bakterien auf die Symptome der AD bei Säuglingen und Kleinkindern (< 2 Jahre). Im Gegensatz dazu existieren vergleichsweise wenig Studien über den Einfluss von Probiotika auf die AD bei Jugendlichen und Erwachsenen. ROSENFELDT et al. [2003] untersuchten ältere Kinder im Alter von ein bis 13 Jahren ($\bar{\varnothing}$ 5,2 Jahre). Sie konnten in der gesamten Gruppe eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Verminderung des SCORAD um vier Punkte ($P = 0,060$) feststellen. Auch MATSUMOTO et al. [2007a] zeigten nach vierwöchiger Intervention mit *B. animalis* subsp. *lactis* LKM512 bei Erwachsenen ($\bar{\varnothing}$ 22,1 Jahre) lediglich eine tendenzielle Verbesserung der Symptome der AD. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den eigenen Beobachtungen, so dass für die Effektivität der probiotischen Wirkung auf das Hautbild eine Altersabhängigkeit vermutet werden kann.

Die zugrunde liegenden Mechanismen für die divergierenden Effekte von Probiotika zwischen Kindern und Erwachsenen mit AD sind bisher unklar. Auffällig ist jedoch, dass Kleinkinder mit AD häufig gastrointestinale Beschwerden aufweisen [CAFFARELLI et al. 1998] und dass deren intestinale Barrierefunktion aufgrund einer erhöhten Permeabilität gestört ist [CAFARELLI et al. 1993, ROSENFELDT et al. 2004]. Dies kann in einem gesteigerten Antigentransfer resultieren, der über die Stimulation der spezifischen IgE-Produktion lokale Entzündungsreaktionen begünstigt. ROSENFELDT et al. [2004] zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen einer Verminderung der intestinalen Permeabilität durch probiotische Lactobacillen und einer Verbesserung des SCORAD. Eine erhöhte intestinale Permeabilität tritt vorrangig bei Kleinkindern mit AD auf, während bei älteren Kindern (> 8 Jahre) und erwachsenen Patienten keine gesteigerte Permeabilität im Vergleich zu gesunden Personen nachgewiesen werden konnte [PIKE et al. 1986, BJARNASON et al. 1985, BARBA et al. 1989]. Offensichtlich findet die Wirkung probiotischer Bakterien bei Kleinkindern vorrangig über die Stärkung der intestinalen Barrierefunktion statt, während bei Jugendlichen und Erwachsenen zusätzliche Mechanismen über die Interaktion mit dem GALT in Kraft treten. So konnten HESSLE et al. [2000] und KIMOTO et al. [2004] *in vitro* eine Modulation des T_H1/T_H2 -Gleichgewichts und dem damit verbundenen Cytokinprofil zugunsten des T_H1 -Typs durch Zellbestandteile von Lactobacillen und Bifidobakterien demonstrieren. Weiterhin ist ein Einfluss der Metaboliten probiotischer Bakterien z. B. durch kurzkettige Fettsäuren oder antiinflammatorisch wirkende Polyamine nicht auszu-

schließen [MATSUMOTO et al. 2006]. Im Rahmen der vorliegenden Studien wurden sowohl T_H1- und T_H2-typische Cytokine als auch die Konzentration kurzkettiger Fettsäuren bestimmt, deren Konzentrationen im Serum bzw. im Stuhl durch die Probiotika jedoch nicht beeinflusst wurden (siehe Kap. 4.2.3 und 4.2.7).

Im Gegensatz zu den eigenen Beobachtungen steht die Studie von YIM et al. [2006], die nach achtwöchiger Supplementation mit einer Probiotika-Kombination bestehend aus *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. casei* und *B. lactis* von einer Verbesserung des Hautbilds sowohl bei Kindern (2 bis 12 Jahre) als auch bei jugendlichen und erwachsenen Patienten (> 12 - 42 Jahre) berichteten. Die therapeutische Wirksamkeit war am deutlichsten bei den Teilnehmern mit sehr hohen Serum-IgE-Konzentrationen (> 1000 kU/l) ausgeprägt. Ein wesentlicher Nachteil des Versuchs bestand darin, dass keine Placebo-Gruppe als Kontrolle geführt wurde, zumal in zahlreichen Studien auch eine Verbesserung des SCORAD in der Placebo-Phase dokumentiert wird [KIRJAVAINEN et al. 2003, VILJANEN et al. 2005b, WESTON et al. 2005, BROUWER et al. 2006].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die regelmäßige Aufnahme von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 die Symptome der AD bei Erwachsenen nicht signifikant verbessern konnte. Generell scheinen Probiotika effektiver in der Prävention und Therapie der AD zu wirken, wenn sie in der frühen Kindheit, während der Reifung und Entwicklung des Immunsystems, gegeben werden. Bei Erwachsenen mit manifestiertem, allergischem Phänotyp scheint lediglich eine Linderung der Symptome durch Probiotika erreicht werden zu können.

5.7 Wirkungen der Probiotika auf das Immunsystem

Das Darmepithel bildet die Schnittstelle in der komplexen Kommunikation zwischen Mikrobiota und Immunsystem. Der primäre Antigenkontakt erfolgt zunächst lokal über die M-Zellen in den PP und den Lymphfollikeln der Mucosa bzw. über spezifische PRR des gastrointestinalen Immunsystems. Da sich die Untersuchung immunkompetenter Zellen des gastrointestinalen Immunsystems beim Menschen aufgrund der Notwendigkeit der direkten Probenahme schwierig gestaltet, wurden die Messungen der Lymphcytenoberflächenmarker in beiden Studien im Vollblut durchgeführt.

5.7.1 Zelluläre Immunabwehr

Spezifische Immunantwort

In Studie I konnte kein Effekt der probiotischen Kulturen *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf die Anteile der Lymphocyten, Monocyten und Granulocyten sowie auf die Expression der Lymphocytenoberflächenmarker CD3⁺, CD19⁺, CD8⁺, CD16⁺ CD56⁺, CD57⁺, CD3⁺HLA-DR, CD4⁺CD25⁺, CD25⁺, CD122⁺, CD54⁺ und CD4⁺CD54⁺ im Plasma nachgewiesen werden. Lediglich die Expression der T-Helferzellen (CD4⁺) war nach fünf Wochen Probiotika tendenziell vermindert (P = 0,053). Hinweise auf vergleichbare Effekte liefern *in vitro*-Studien. *Ex vivo*-Cokulturen von *L. casei* und Mucosagewebe, das Patienten mit Morbus Crohn entnommen wurde, führten zu einer verminderten Expression von CD4⁺ auf den intraepithelialen Lymphocyten, jedoch nur im entzündeten Gewebe und nicht im Gewebe gesunder Kontrollpersonen [BORRUELL et al. 2002]. *L. paracasei* subsp. *paracasei* B21060 (10⁶ Zellen/ml) zeigte *in vitro* eine Proliferationshemmung auf die aus dem Blut gesunder Probanden isolierten CD4⁺-T-Lymphocyten, als auch auf CD4⁺-T-Lymphocyten-Populationen, die aus der *Lamina propria* von Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen isoliert wurden. Keine Wirkung konnte für *L. paracasei* subsp. *paracasei* F19 bzw. *L. casei* subsp. *casei* DG und für Konzentrationen < 10⁶ Zellen/ml gezeigt werden [PELUSO et al. 2007]. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Effekte durch Probiotika stammspezifisch und dosisabhängig vermittelt werden. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass es sich um *in vitro*-Untersuchungen handelt und dass hierbei Ergebnisse in Abhängigkeit vom eingesetzten Zellsystem variieren können [PELUSO et al. 2007]. In anderen Humanversuchen konnte der in dieser Studie beobachtete, tendenzielle Abfall der T-Helferzellen nach Probiotikaaufnahme bisher nicht dokumentiert werden. Es zeigte sich vielmehr kein Effekt bzw. ein Anstieg auf die Expression der CD4⁺-T-Lymphocyten [SPANHAAK et al. 1998, OLIVARES et al. 2006b, GILL et al. 2001a]. JAHREIS et al. [2002] beobachteten nach zwei Wochen Intervention mit *L. paracasei* LTH 2579 einen vorübergehenden, signifikanten Anstieg der Expression von CD4⁺. Nach fünf Wochen Probiotika glichen sich die Werte wieder dem Ausgangsniveau an. Der Effekt war am deutlichsten bei den Probanden, welche die höchsten Keimzahlen des Probiotikums im Stuhl aufwiesen. In der aktuellen Studie I konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem Anteil der T-Helferzellen und den Anteilen von *L. acidophilus* und *B. lactis* im Stuhl nachgewiesen werden (*L. acidophilus*: r = 0,223; P = 0,112; n = 52 und *B. lactis*: r = -0,054; P = 0,703; n = 52). In Studie II wurde ebenfalls ein *L. paracasei*-Stamm (*L. paracasei* Lpc-37) in Kombination mit *L. acidophi-*

lus 74-2 und *B. lactis* 420 über 8 Wochen aufgenommen. Die Expression der CD4⁺-T-Lymphocyten im Plasma unterschied sich nicht zwischen Probiotika und Placebo, sowohl bei den Gesunden, als auch bei den Patienten mit AD. Dessen ungeachtet war bei den gesunden Teilnehmern ein signifikanter Abfall der Anteile an CD4⁺-T-Lymphocyten und daraus resultierend des CD4⁺/CD8⁺ Verhältnisses zwei Wochen nach Absetzen des probiotischen Getränks zu verzeichnen. Ein Abfall für diese Parameter wurde nach intensiver Belastung und in Stresssituationen beobachtet [GLEESON 2007, MAES et al. 1999] und in Verbindung mit einer Schwächung der Immunabwehr diskutiert. Da sich die Werte für CD4⁺ mit 42 % der Lymphocyten trotz der Senkung innerhalb des von HANNETT et al. [1992] angegebenen Referenzbereiches (38-46 % der Lymphocyten) befinden, sollte der Effekt nicht überbewertet werden, zumal sich die Ergebnisse der Interventionsphasen nicht voneinander unterscheiden. Möglicherweise handelt es sich um eine kurzfristige Reaktion auf die in der Wash-out-Phase fehlende Stimulation durch die Probiotika.

Obwohl die Expression der natürlichen Killerzellen (NK, CD16⁺D56⁺) und der CD57⁺-tragenden Suppressorzellen (CD8⁺CD57⁺) durch die Probiotika in Studie II bei den Gesunden unbeeinflusst blieben, wurde CD57⁺ als ein zusätzlicher Oberflächenmarker für die natürlichen Killerzellen durch die Probiotika signifikant erhöht. Eine Erklärung für diesen Sachverhalt könnte darin bestehen, dass CD57⁺ nur auf 50 % bis 60 % der natürlichen Killerzellen im Blut exprimiert wird und dass weiterhin nur ca. 50 % der peripheren Lymphocyten die CD57⁺ exprimieren, auch tatsächlich natürliche Killerzellen sind [ROBERTSON & RITZ 1990, LANIER et al. 1983, LANIER & LOKEN 1984]. Die CD57⁺ exprimierenden T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Erkennung von Tumor- und Virus-infizierten Zellen [CHOCHI et al. 2003]. Sie sezernieren größere Mengen an IFN- γ im Vergleich zu herkömmlichen T-Zellen. Ein proportionaler Anstieg wurde mit dem Alter beobachtet, vermutlich um die im Alter schwächer werdende Funktionsfähigkeit dieser Zelltypen zu kompensieren [SOLANA & MARIANI 2000]. Ein Abfall der Marker für die natürlichen Killerzellen wurde hingegen bei Personen mit suboptimalem Immunstatus, wie er z. B. bei Rauchern, unter Mangelernährung bzw. nach intensiver körperlicher Belastung auftritt, beobachtet [OLIVARES et al. 2006b, PUJOL et al. 2000, NAKACHI K & IMAI et al. 1992]. Folglich kann die erhöhte Expression von CD57⁺ bei den gesunden Teilnehmern als ein Hinweis für die Stimulation des Immunsystems gedeutet werden. Diese Wirkung auf charakteristische Oberflächenmarker der natürlichen Killerzellen ist bereits für andere probiotische Stämme beschrieben worden [OLIVARES et al. 2006b, GILL et al. 2001a, NAGAO et al. 2000].

CD4⁺CD25⁺-regulatorische T-Zellen (T_{Reg}) haben eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der oralen Toleranz, indem sie die Aktivierung und Proliferation autoreaktiver T-Zellen unterdrücken. Insofern ist diesem Zelltyp hinsichtlich der Entstehung allergischer Erkrankungen besondere Beachtung zu schenken. Die Angaben zur Expression dieser Zellen bei Patienten mit AD sind sehr widersprüchlich. In einigen Studien wurden erhöhte Anteile von CD4⁺CD25⁺-T_{Reg}-Zellen mit normaler immunsuppressiver Aktivität im Blut von Patienten mit AD nachgewiesen. [SHI et al. 2004, OU et al. 2004]. KARLSSON et al. [2004] und LING et al. [2004] dokumentierten hingegen eine verminderte Anzahl und Aktivität der CD4⁺CD25⁺-T_{Reg}-Zellen bei Atopikern. In NC/Nga Mäusen (AD-Tiermodell) zeigte sich, dass mit steigenden Anteilen der CD4⁺CD25⁺-T_{Reg}-Zellen auch der Schweregrad der AD signifikant zunahm. Ein Einfluss von *L. rhamnosus* GG auf die Expression dieser T_{Reg}-Zellen war nicht zu verzeichnen [SAWADA et al. 2007]. In Humanstudie II konnte weder ein Zusammenhang zwischen der Expression von CD4⁺CD25⁺-T_{Reg}-Zellen im Blut und dem SCORAD ($r = 0,188$, $P = 0,215$, $n = 45$) noch ein Einfluss der probiotischen Kulturen auf diesen Parameter nachgewiesen werden. Die Anteile der CD4⁺CD25⁺-T_{Reg}-Zellen im Blut der gesunden Teilnehmer und der Patienten mit AD unterschieden sich nicht. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Studien [VUKMANOVIC-STEJIC et al. 2005, BELLINGHAUSEN et al. 2003].

Bei ICAM-1 (CD54⁺) handelt es sich um ein interzelluläres Adhäsionsmolekül, dass vor allem auf CD4⁺-T-Zellen exprimiert wird und dessen Anteil infolge von Entzündungen, zellulärem Stress und Virusinfektionen ansteigt [DE ROSE et al. 1994, ROEBUCK & FINNEGAN 1999]. GOEBEL et al. [2000] konnten bei gesunden Probanden nachweisen, dass sowohl körperliche Anstrengungen als auch psychischer Stress stimulierende Wirkung auf die Expression von CD54⁺ besitzen. Erhöhte Anteile von ICAM-1 und löslichem ICAM-1 (sICAM-1) wurden desweiteren in Patienten mit AD gemessen, so dass dieser Parameter zur Beobachtung der Krankheitsaktivität herangezogen werden kann [GABRIELSSON et al. 2004, HIRAI et al. 1996, WUTHRICH et al. 1995]. Die Werte für ICAM-1 unterschieden sich in Studie II nicht signifikant zwischen den Patienten mit AD und den Gesunden ($P = 0,169$). Auffällig ist, dass die alleinige Expression von CD54⁺ und der CD4⁺-T_H-Zellen bei den Patienten im Studienverlauf unbeeinflusst blieb, die Expression der CD54⁺-tragenden Helferzellen jedoch infolge der Probiotikaaufnahme nach acht Wochen signifikant erniedrigt war ($P = 0,031$). Dies lässt vermuten, dass sich die Expression von ICAM-1 innerhalb der Lymphocyten verlagert hat.

Grundsätzlich ist festzustellen, dass sowohl die prozentualen Anteile der Granulocyten, Monocyten und Lymphocyten an den Leukocyten als auch die Werte für die Lymphocyten-subpopulationen (CD's) innerhalb der laboreigenen Referenzwerte lagen und ebenso mit den Daten aus der Literatur vergleichbar sind [HANNETT et al. 1992, PARRA et al. 2004b, OLIVARES et al. 2006c].

Unspezifische Immunantwort

Mittels spezifischer Testsysteme wurde der Anteil phagocytose- und burstaktiver Granulocyten und Monocyten sowie deren Aktivität (mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle) nach vorangegangener Stimulation bestimmt, um den Einfluss der Probiotika auf die unspezifische zelluläre Immunantwort näher zu untersuchen.

In Studie I war der Anteil phagocytierender Granulocyten und Monocyten durch die tägliche Aufnahme von *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 über fünf Wochen signifikant erhöht ($P = 0,044$), was eine verbesserte Antigenaufnahme in die Phagocyten vermuten lässt. Die Aktivität pro Zelle unterlag dagegen keinen Veränderungen. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikant erhöhte Burstaktivität ($P = 0,025$) bei unverändert bleibender Zahl oxidierender Monocyten und neutrophiler Granulocyten nach Probiotikaaufnahme festgestellt werden, so dass von einem effektiveren, intrazellulären Abbau der aufgenommenen Bakterien ausgegangen werden kann. Beide Effekte sprechen für eine Stimulation der adaptiven, unspezifischen Immunabwehr durch die regelmäßige Aufnahme dieser Probiotika. In Studie II führte die Kombination der Probiotika *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 lediglich bei den gesunden Teilnehmern zu einer Stimulation der Phagocytose, die sich in dem erhöhten Anteil phagocytoseaktiver Zellen und gesteigerter Aktivität pro Zelle widerspiegelt. Zahlreiche Studien, die den Einfluss probiotischer Bakterien auf den Phagocytoseprozess untersuchten, kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Für die Stämme *L. paracasei* LTH 2579, *L. johnsonii* La1 und *B. bifidum* Bb-12 konnten signifikant höhere Anteile bzw. Aktivitäten phagocytierender neutrophiler Granulocyten und Monocyten bei gesunden jungen Menschen (\emptyset Alter 30-40) im Vergleich zu einem adäquaten Placeboprodukt dokumentiert werden [JAHREIS et al. 2002, DONNET-HUGHES et al. 1999, SCHIFFRIN et al. 1997]. Die Kombination der beiden Probiotika *L. gasseri* CECT 5714 und *L. coryniformis* CECT 5711, aber auch der Verzehr des Placebojoghurts (*L. bulgaricus*) führten zu einer Erhöhung der Phagocytoseaktivität. Die Steigerung fiel in der Probiotikagruppe zwar höher aus, war aber nicht signifikant im Vergleich zum Placebo [OLIVARES et al. 2006b]. Der Effekt des Placebos beruht vermutlich auf der direkten Interaktion bakterieller DNA-Komponenten mit spezifischen TLR's, wie es im Tierversuch

bereits dokumentiert werden konnte [RACHMILEWITZ et al. 2004]. Somit scheint die Lebensfähigkeit der Bakterien für die Auslösung bestimmter Immunantworten nicht zwingend notwendig zu sein. Dennoch ist dieser Effekt vermutlich stammspezifisch, da sowohl bei DONNET-HUGHES et al. [1999] als auch in Studie I *L. bulgaricus* als Standardkultur im Placebo enthalten war und trotzdem signifikante Unterschiede zwischen Verum und Placebo bestanden. MALDONADO GALDEANO & PERDIGON [2004] demonstrierten sowohl für lebende als auch für hitze-inaktivierte Bakterien (*L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*) Auswirkungen auf die Cytokinproduktion im Darm, wobei die Immunstimulation durch die lebenden Bakterien deutlich effektiver war. Dies unterstreicht einmal mehr die Notwendigkeit einer Placebogruppe. Bei Senioren, die aufgrund des altersbedingten Abfalls der Immunfunktion ein höheres Risiko für infektiöse und nicht-infektiöse Erkrankungen aufweisen, zeigte die regelmäßige Aufnahme von *L. rhamnosus* HN001, *B. lactis* HN019 bzw. *L. johnsonii* La1 über drei Wochen bzw. drei Monate eine gesteigerte Phagozytoseaktivität Neutrophiler und Monocyten sowie eine Verkürzung der Infektionsdauer, so dass besonders diese sensible Bevölkerungsgruppe von einer Anregung des Immunsystems durch Probiotika profitieren könnte [GILL et al. 2001a, ARUNACHALAM et al. 2000, FUKUSHIMA 2007, FUKUSHIMA et al. 2007]. Kein Einfluss auf die Phagozytose- und Burstaktivität konnte hingegen bei Personen mit Prüfungsstress durch den Verzehr eines mit *L. casei* DN-114001 angereicherten Milchgetränks gezeigt werden [MARCOS et al. 2003]. CHRISTENSEN et al. [2006] untersuchten Konzentrationen von 10^8 bis 10^{11} kbE/d *B. lactis* Bb-12 und *L. paracasei* CRL-431 bei Gesunden auf die Phagozytoseaktivität, wobei für keine der Dosen eine Wirkung erzielt wurde. Auch *L. casei* Shirota verfehlte einen Effekt auf diesen Parameter [SPANHAAK et al. 1998, SEIFERT et al. 2008]. Diese Ergebnisse demonstrieren am Beispiel der sehr gut untersuchten Wirkung auf die Phagozytoseaktivität, dass die Stammspezifität bei der Vermittlung probiotischer Effekte eine wichtige Rolle spielt.

Die Anteile burstaktiver Zellen waren bei den Gesunden zwei Wochen nach Absetzen des probiotischen Produkts signifikant vermindert. Hierbei scheint es sich lediglich um eine kurzfristige Reaktion auf die fehlende Stimulation durch die Probiotika zu handeln, zumal zwischen Probiotika und Placebo kein signifikanter Unterschied bestand. Interessant ist jedoch, dass bei den Patienten mit AD kein Effekt der gleichen Stämme in gleicher Dosis auf die Anteile und Aktivität phagozytischer und burstfähiger neutrophiler Granulozyten und Monocyten im Blut verzeichnet werden konnte. In einer ähnlich angelegten Studie von PELTO et al. [1998] wurde bei gesunden Probanden durch ein mit *Lactobacillus* GG ange-

reichertes Milchgetränk eine erhöhte Expression der Phagocytoserezeptoren beobachtet. Im Gegensatz dazu konnte in der Teilnehmergruppe mit einer Milchüberempfindlichkeit die durch Milch induzierte erhöhte Expression der Phagocytoserezeptoren (in der Kontrollgruppe) durch das Probiotikum unterdrückt werden. Auch in der aktuellen Studie wurde eine erhöhte Phagocytoseaktivität bei den gesunden Teilnehmern beobachtet, was auf eine Stimulation der unspezifischen Immunabwehr hindeutet, während ein Effekt durch die Probiotika bei den AD-Patienten ausblieb. Insofern scheint die Phagocytoseaktivität als unspezifischer Immunparameter bei den Patienten mit AD nicht in der gleichen Weise wie bei den Gesunden moduliert zu werden. Möglicherweise ist der zu Grunde liegende Mechanismus mit Unterschieden in der Zusammensetzung der Mikrobiota assoziiert. Im Unterschied zu Gesunden weist die Mikrobiota von Patienten mit AD Differenzen hinsichtlich der Anteile von Lactobacillen und Bifidobakterien auf [BJÖRKSTÉN et al. 1999, BJÖRKSTÉN et al. 2001, WATANABE et al. 2003]. Folglich finden die Probiotika andere Konkurrenzbedingungen im Intestinaltrakt, so dass sich möglicherweise die Wege der Signalübertragung zwischen Bakterien und Enterocyten zwischen den Gruppen unterscheiden. Es konnte gezeigt werden, dass Lactobacillen über verschiedene Wege mit dem GALT in Kontakt treten und so vermutlich unterschiedliche Immunreaktionen auslösen. Die Interaktion von Lactobacillen direkt mit den M-Zellen stimulierte hauptsächlich die spezifische Immunantwort. Dagegen aktivierte die Interaktion mit dem Follikel-assoziierten Epithel der PP hauptsächlich die unspezifische bzw. entzündliche Immunantwort und induzierte nur zu einem geringen Teil spezifische Immunreaktionen [PERDIGON et al. 2000, NEUTRA & KRAEHNBUHL 1992].

Über die Höhe der Phagocytoseaktivität bei AD im Vergleich zu gesunden Personen existieren in der Literatur wenige Angaben. MICHAELSSON [1973] berichtete von einer verminderten Aktivität der Phagocyten. Ferner wurde eine reduzierte Burstfähigkeit bei Patienten mit AD festgestellt, jedoch nur wenn zusätzlich akute Hautinfektionen vorlagen. Die Patienten ohne Infektionen wiesen keine Unterschiede hinsichtlich der Burstaktivität im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen auf [MROWIETZ et al. 1988]. In der aktuellen Studie unterschieden sich die Werte für die Phagocytoseaktivität und den oxidativen Burst ebenfalls nicht zwischen den Gesunden und den Patienten mit AD. Da die untersuchten Patienten ebenfalls frei von akuten Infektionen der Haut waren (Ausschlusskriterium), können die Ergebnisse von MROWIETZ et al. [1988] bestätigt werden.

Obwohl die Werte für die Anteile als auch die Fluoreszenzintensitäten phagocytierender und oxidierender Zellen zu allen Messzeitpunkten im Vergleich zur Literatur relativ hoch

waren, lagen sie innerhalb der vom Testkit-Hersteller (Orpegen Pharma GmbH, Heidelberg, Deutschland) angegebenen Referenzbereiche.

5.7.2 Humorale Immunabwehr

Ergebnisse aus *in vitro*-Studien liefern Hinweise, dass verschiedene Lactobacillen-Stämme (*L. plantarum* NCIMB8826, *L. casei* ATCC393, *L. rhamnosus* GG) in der Lage sind, die T_H2 -vermittelte Immunantwort abzuschwächen, indem sie die Sekretion von IL-4 und IL-5 als T_H2 -typische Cytokine hemmen. Verantwortlich für diesen Effekt sind vermutlich die Cytokine IFN- γ und IL-12, da deren Eliminierung eine wiederkehrende IL-4-Sekretion der PBMC's (periphere mononukleare Blutzellen) zur Folge hatte [POCHARD et al. 2002]. In Tierversuchen zeigten sich ähnliche, durch Lactobacillen induzierte, Cytokinmuster, wie z. B. Steigerung der Sekretion von IFN- γ und Minderung der Allergen-induzierten Produktion von IL-4 [CROSS 2002]. Die *in vivo*-Daten über die Wirkung probiotischer Bakterien auf die Cytokinsekretion sind, auch im Hinblick auf die verschiedenen, eingesetzten Stämmen, nicht eindeutig. PESSI et al [2000] zeigten eine Erhöhung der IL-10-Konzentration im Serum atopischer Kinder nach vier Wochen Intervention mit *L. rhamnosus* GG, jedoch keine Veränderung für IL-6, IL-12, IFN- γ und TNF- α . POHJAVUORI et al. [2004] beobachteten indessen nach vierwöchiger Aufnahme von *L. rhamnosus* GG nur bei Kindern mit einer Kuhmilchallergie eine signifikante Erhöhung der IFN- γ -Sekretion stimulierter PBMC's, jedoch nicht bei Kindern mit Dermatitis. Der gleiche Stamm führte durch die Intervention zu einer Erhöhung des antiinflammatorischen TGF- β_2 in der Muttermilch stillender Frauen. Deren Kinder zeigten nach zwei Jahren eine signifikant geringere Prävalenz für das Auftreten der AD im Vergleich zur Placebogruppe [RAUTAVA et al. 2002]. Die Aufnahme eines Probiotika-Mixes bestehend aus *L. rhamnosus* LC705, *B. breve* Bbi99, *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* JS2 ergab hingegen keinen Einfluss auf die Sekretion von IFN- γ , IL-4 und IL-12. Die gleiche Probiotika-Kombination zeigte in einer anderen Studie nach vier Wochen bei Kindern mit AD keinen Einfluss auf die Serumkonzentrationen von IL-4, IL-6, TGF- β und IFN- γ [VILJANEN et al. 2005a]. Auch andere *L. rhamnosus* Stämme sowie die Kombination von *L. reuteri* DSM 122460 und *L. rhamnosus* 19070-2 ergaben keine Veränderung hinsichtlich der Sekretion der Cytokine IL-4, IL-5 und IFN- γ bzw. IL-2, IL-4, IL-10 IFN- γ nach Stimulation isolierter PBMC's von AD-Patienten [BROUWER et al. 2006, ROSENFELDT et al. 2003]. YIM et al. [2006] zeigten nach achtwöchiger Intervention mit einem Probiotika-Mix bestehend aus *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. casei* und *B. lactis* eine signifikante Reduktion der Ausprägung des Ek-

zems in Form des EASI-Scores (Eczema Area Severity Index) bei Kindern und bei Erwachsenen. Trotz dieses Effekts blieb auch in dieser Studie die Sekretion von IL-4 und IL-10 unbeeinflusst. Insofern scheinen andere Mechanismen als die Wirkung spezifischer Cytokine für die Besserung des Hautbilds verantwortlich zu sein, wie z. B. Verbesserung der Mikroökologie des Darms und damit verbundener Stärkung der Barrierefunktion. In der vorliegenden Studie konnte ebenfalls kein Effekt der Probiotika-Kombination von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf die untersuchten Serumkonzentrationen von IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und IL-16 festgestellt werden. Auch eine signifikante Besserung des SCORAD war nicht zu verzeichnen.

Da für die Analyse der Cytokine ein relativ neues Verfahren basierend auf der Messung mittels Durchflusszytometrie angewandt wurde, muss der methodische Ansatz bei der Diskussion berücksichtigt werden, zumal eine recht hohe Probenanzahl unter der Nachweisgrenze lag. In eine Studie von VILJANEN et al. [2005a] wurde das gleiche Verfahren zur Bestimmung der IL-Konzentrationen im Serum angewandt. Auch hier zeigte sich, dass alle Messwerte für TNF- α und 74 % der Werte für IFN- γ sich unter der Nachweisgrenze befanden. Da es sich bei den Cytokinen in erster Linie um lokale Mediatoren handelt, sind generell nur sehr starke Effekte im Serum messbar. Zusätzlich variieren die ohnehin kurzen Halbwertszeiten zwischen den Cytokinen und erschweren den Vergleich der Daten.

IL-2 besitzt verschiedenartige Funktionen bei der Regulation der T_H1/T_H2-vermittelten Immunantwort. Zum einen induziert IL-2 die IFN- γ -Produktion und hemmt die IL-4-induzierte IgE-Produktion und zum anderen bewirkt es in Synergie mit IL-12, die Sekretion von IL-10, welches wiederum IFN- γ inhibiert [YOSHIZAWA et al. 2002]. Die signifikanten Korrelationen von IL-2 mit IL-10 ($r = 0,634$, $P < 0,001$, $n = 45$) bzw. von IL-2 mit IL-12 ($r = 0,409$, $P = 0,005$, $n = 45$) der eigenen Studie bestätigen diesen Sachverhalt. Erhöhte Werte für IL-2 bei Patienten mit AD im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen wurden bereits in anderen Arbeiten dokumentiert [SZCZEPANSKI & KACZMARSKI 1995, MORITA et al. 1999].

IL-16 wird hauptsächlich von CD8⁺- und von CD4⁺-T-Lymphocyten gebildet, wobei zur Freisetzung aus CD4⁺-T-Zellen eine Stimulation durch Mitogene, spezifische Antigene bzw. Histamin notwendig ist [WU et al. 1999]. Es wirkt chemotaktisch auf CD4⁺-T-Lymphocyten, eosinophile Granulocyten, Monocyten sowie dendritische Zellen und besitzt somit pathobiologische Relevanz für die Entstehung und Chronizität der AD [CRUIKSHANK et al. 1987, CHENG et al. 2001, KASER et al. 2000, CRUIKSHANK et al. 2000]. In diesem Zusammenhang erklären sich die signifikant erhöhten Serumkonzentrationen von IL-16 bei

den Patienten mit AD, die jedoch im Studienverlauf unabhängig von den Probiotika auf relativ konstantem Niveau blieben. Signifikante Korrelationen zwischen dem SCORAD und IL-16-Konzentrationen im Serum wurden bei Kindern und Erwachsenen mit AD dokumentiert [FREZZOLINI et al. 2002, ANGELOVA-FISCHER et al. 2006]. Im Unterschied dazu bestand in der eigenen Studie ($r = 0,104$, $P = 0,497$, $n = 45$) keine Korrelation zwischen dem SCORAD und IL-16. Möglicherweise ist der Zusammenhang zwischen diesen Parametern abhängig vom Schweregrad der AD, da sowohl bei FREZZOLINI et al. [2002] als auch bei ANGELOVA-FISCHER et al. [2006] Patienten mit einem sehr hohen SCORAD von 46 bzw. 56 untersucht wurden, während die Patienten in der aktuellen Studie lediglich eine leichte bis moderaten Ausprägung der AD (mittlerer SCORAD von 24) aufwiesen.

MDC, ein Cystein-Cystein-Chemokin und Aktivierungsmarker der T_H2 -vermittelten Immunantwort, reflektiert als Entzündungsparameter im Serum die Krankheitsaktivität der AD [KAKINUMA et al. 2002, JAHNZ-ROZYK et al. 2005]. ANGELOVA-FISCHER et al. [2006] demonstrierten einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen von IL-16 und MDC bei Erwachsenen im akuten Stadium der AD. Diese Beziehung konnte auch für eine leichte bis mittlere Krankheitsaktivität belegt werden (Abb. 5-2). Außerdem korrelierten die Konzentrationen von MDC mit den Serumwerten von sE-Selectin ($r = 0,602$, $P < 0,001$, $n = 45$), IgE ($r = 0,621$, $P < 0,001$, $n = 45$) und in der Tendenz mit den prozentualen Anteilen der eosinophilen Granulocyten ($r = 0,264$, $P = 0,080$, $n = 45$) welche geeignete und in der Praxis erprobte Biomarker zur Beurteilung der Krankheitsaktivität sind [KAKINUMA et al. 2002, LEUNG et al. 2003]. Obwohl die Serum-Konzentration von IL-16, MDC, sE-Selectin und ECP bei Patienten mit AD typischerweise erhöht sind [KAKINUMA et al. 2002, MASUDA et al. 2003, ANGELOVA-FISCHER et al. 2006, MURAT-SUŠIĆ et al. 2006], kann dies bei den AD-Patienten der eigenen Studie lediglich für IL-16 und MDC bestätigt werden. Der Vergleich mit Literaturdaten zeigt, dass die Konzentration und die individuellen Schwankungsbreiten für sE-Selectin und ECP in der Kontrollgruppe (gesunde Teilnehmer) vergleichsweise hoch sind [ANGELOVA-FISCHER et al. 2006]. Außerdem weisen die Patienten mit einer leichten bis mittelschweren AD entsprechend moderate Laborwerte auf. Die Bedeutung von sE-Selectin und ECP zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wird kontrovers diskutiert, da Korrelationen mit dem Schweregrad der AD, gemessen am SCORAD, nicht einheitlich gezeigt werden können [ROSENFELDT et al. 2003, PUCCI et al. 2005, ANGELOVA-FISCHER et al. 2006, MURAT-SUŠIĆ et al. 2006]. In der vorliegenden Studie konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen dem

SCORAD und sE-Selectin ($r = 0,015$, $P = 0,920$, $n = 45$) bzw. ECP ($r = 0,132$, $P = 0,368$, $n = 45$), unabhängig von der Probiotika-Zulage, dokumentiert werden.

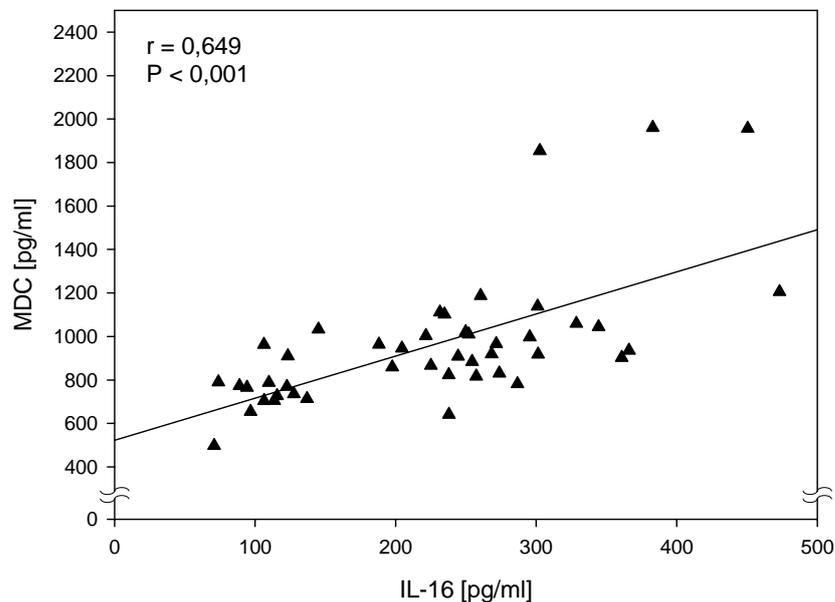


Abb. 5-2: Zusammenhang zwischen den Konzentrationen von IL-16 und MDC im Serum bei Patienten mit leichter bis moderater AD ($n = 45$)

Die Eosinophilie (erhöhte Anteile eosinophiler Granulocyten) sowie erhöhte Konzentrationen des ECP, ein Produkt aktivierter eosinophiler Granulocyten, werden als charakteristisch bei Patienten mit AD beschrieben [YOSHIDA et al. 2002]. Auch in der vorliegenden Studie konnte bei den Patienten ein signifikanter Zusammenhang zwischen der ECP-Konzentration im Serum und dem Anteil eosinophiler Granulocyten verzeichnet werden ($r = 0,651$, $P < 0,001$, $n = 45$).

Obwohl der Anteil eosinophiler Granulocyten bei den Patienten signifikant höher war im Vergleich zu den Gesunden, unterschied sich die Konzentration des ECP im Serum nicht zwischen den Probandengruppen. Die *in vitro*-Freisetzung von ECP ist temperatur- und zeitabhängig. Da diese beiden Einflussfaktoren bei allen Blutabnahmen konstant gehalten wurden, ist ein methodischer Fehler auszuschließen. Ferner gibt die ECP-Freisetzung Auskunft über den Aktivierungszustand der Granulocyten. Dieser korreliert nicht zwangsläufig mit dem Aktivierungszustand am Erfolgsorgan, wie z. B. der Haut [RENZ 2005]. NIGGEMANN et al. [1994] untersuchten Serum-ECP-Konzentrationen bei AD-Patienten mit Überempfindlichkeitsreaktionen auf Nahrungsmittel während und nach Allergenexposition. Sie beobachteten direkt nach der Exposition einen starken Anstieg der ECP-Konzentration, der jedoch innerhalb von 48 h wieder auf das Ausgangsniveau abfiel. Dies weist auf eine kurze Halbwertszeit des ECP im Blut hin. Untersuchungen weisen darauf hin, dass das Serum-ECP ein besserer Marker bei akuten Schüben bzw. bei schweren Formen

der AD ist [ROSENFELDT et al. 2003]. Die Gabe der probiotischen Kulturen hatte sowohl bei den Gesunden als auch bei den Patienten mit AD keinen Einfluss auf den Anteil eosinophiler Granulozyten und die Konzentration des ECP im Serum.

Viele Patienten mit AD besitzen eine allergische Konstitution [HALBERT et al. 1995]. Dennoch wird der Beitrag von Allergien und IgE-vermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen an der Pathogenese und klinischen Ausprägung der AD kontrovers diskutiert [ROSENFELDT et al. 2003]. In der vorliegenden Studie wurde eine signifikant höhere IgE-Konzentration im Serum der Patienten gemessen, wobei zehn Patienten eine IgE-assoziierte AD mit Serumkonzentrationen > 150 kU/l und fünf Patienten eine nicht-IgE-assoziierte AD aufwiesen. Erhöhte IgE-Serumkonzentrationen bei AD im Vergleich zu gesunden Probanden, sowie hohe individuelle Schwankungen sind Kennzeichen einer Atopie und wurden demzufolge auch in anderen Studien beobachtet [YOSHIDA et al. 2002, ROSENFELDT et al. 2003, ANTÚNEZ et al. 2006, YIM et al. 2006].

Die Stimulation der IFN- γ -Produktion zur Ausbildung eines T_H1-Phänotyps sowie die Hemmung von IL-4, dem wichtigsten T_H2-Cytokin, dass für die überschießende IgE-Freisetzung aus Plasmazellen verantwortlich ist, wurde für verschiedene Lactobacillen bereits beschrieben [CROSS & GILL 2001]. In der vorliegenden Arbeit war jedoch kein Einfluss der Probiotika-Kombination von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 auf wesentliche, regulierende Cytokine zu verzeichnen. In diesem Zusammenhang wurden auch die IgE-Konzentrationen im Serum weder bei den Gesunden, noch bei den Patienten mit einer leichten bis moderaten Ausprägung der AD beeinflusst. Im Allergie-Tiermodell wurde hingegen eine Konzentrationsverminderung für das IgE bzw. das spezifische IgE im Serum nach oraler Aufnahme verschiedener Lactobacillen (*L. casei* Shirota, *L. acidophilus* bzw. *L. paracasei*) beobachtet [MATSUZAKI et al. 1998, SHIDA et al. 2002, ISHIDA et al. 2003, FUJIWARA et al. 2004]. Humanstudien zum Einfluss von Probiotika auf die AD wurden häufig mit *L. rhamnosus* bzw. *L. reuteri* als Vertreter der Lactobacillen durchgeführt. Obwohl mitunter eine Verbesserung des Krankheitsbildes erreicht wurde, konnte eine IgE-mindernde Wirkung, wie sie in den Tierversuchen beschrieben wurde, bislang nicht bestätigt werden [KALLIOMÄKI 2001b, ROSENFELDT et al. 2003, BROUWER et al. 2006, YIM et al. 2006]. Auch bei Allergikern zeigte sich keine Verbesserung der allergischen Symptome und der Serum-Parameter ECP und sIgE durch die Aufnahme von *L. casei* Shirota über acht Wochen [TAMURA et al. 2007].

6 Zusammenfassung

Die Funktionalität probiotischer Bakterien ist stammspezifisch und wird von der Matrix des mit Probiotika angereicherten Produkts (Milch, Wurst, Kapseln) beeinflusst. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit potentielle Effekte der Probiotika im Produkt zu prüfen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkung von *Lactobacillus acidophilus* 74-2, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* DGCC 420 (*B. lactis* 420) und *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 in fermentierten Milchprodukten auf physiologische und immunologische Vorgänge bei gesunden Personen und bei Patienten mit leichter bis mittlerer Ausprägung einer atopischen Dermatitis (AD) zu untersuchen. Außerdem wurden die supplementierten Species im Stuhl nachgewiesen sowie deren Einfluss auf den Metabolismus der Mikrobiota und die Genotoxizität des Faeceswassers (FW) geprüft.

HUMANSTUDIE I

In Studie I wurde die Wirkung von *L. acidophilus* 74-2 ($2,8 \times 10^9$ kbE/d) und *B. lactis* 420 ($9,0 \times 10^8$ kbE/d) in einer randomisierten, placebokontrollierten Doppelblindstudie im Cross-over-Design untersucht. Jeweils 13 Männer und Frauen im Alter von 20 bis 37 Jahren nahmen nach einer dreiwöchigen Adaptationsphase täglich 300 g Joghurt über fünf Wochen auf. Die Hälfte der Teilnehmer erhielt das probiotische Produkt, während die andere Hälfte das Placebo verzehrte. Nach fünf Wochen wurde die Intervention gewechselt, so dass jeder Teilnehmer am Ende des Versuchs beide Produkte konsumiert hatte. Zu Beginn der Studie und am Ende jeder Interventionsperiode erhielten die Teilnehmer über sieben Tage eine standardisierte Kost. In dieser Zeit erfolgten Sammlungen von Stuhl und Urin, sowie die Blutabnahmen.

Aufgrund der standardisierten Kost können Aussagen über den Einfluss der Probiotika auf die Nährstoffbilanz getroffen werden. Die renale und faecale N-Exkretion sowie die faecale Fettausscheidung wurden, ebenso wie das Stuhlgewicht, durch die Supplementation nicht beeinflusst. Eine wesentliche Voraussetzung für die Vermittlung probiotischer Effekte besteht laut Definition darin, dass die Bakterien den Intestinaltrakt aktiv und in ausreichender Konzentration erreichen. Der Nachweis der supplementierten Probiotika im Stuhl erfolgte auf der Basis speciesspezifischer Sonden mittels FISH. Sowohl für *L. acidophilus* als auch für *B. lactis* konnte ein signifikanter Anstieg der relativen Anteile im Stuhl infolge der Supplementation verzeichnet werden (*L. acidophilus*: 0,02 vs. 0,22 % von EUB, *B. lactis*: 0,42 vs. 1,72 % von EUB), so dass von einer transienten Kolonisation dieser Kulturen während der Supplementation mit den Probiotika ausgegangen werden kann. Die Kon-

zentration kurzkettiger Fettsäuren und der faecale pH-Wert, als Hinweise zum bakteriellen Metabolismus, wurden jedoch nicht beeinflusst. Die Cytotoxizität im FW unterlag durch die Supplementation keinen Veränderungen, während die Genotoxizität im FW durch die Probiotikaaufnahme signifikant vermindert wurde (4,09 vs. 1,01 % TI). In der eigenen Studie konnte kein Einfluss der Probiotika auf die TC-Konzentration sowie die Cholesterolfractionen im Serum beobachtet werden. Generell wird die Wirkung von Probiotika auf die Serum-Cholesterolkonzentration kontrovers diskutiert. Die Konzentration der TAG wurde hingegen durch die Probiotika signifikant um 11,6 % vermindert.

Die Interaktion zwischen probiotischen Bakterien und Immunsystem erfolgt über die immunkompetenten Zellen des Darms. *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 zeigten keinen signifikanten Einfluss auf Biomarker der spezifischen zellulären Immunabwehr im Serum. Die Anteile phagozytoseaktiver Monocyten und neutrophiler Granulozyten waren jedoch in der Probiotikaphase signifikant erhöht (95 vs. 92 %), ebenso wie die oxidative Burstaktivität gemessen als mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle (348 vs. 258). Diese Effekte, die durch die regelmäßige Aufnahme von *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 über fünf Wochen hervorgerufen wurden, können als eine Stimulation der unspezifischen zellulären Immunabwehr gewertet werden.

HUMANSTUDIE II

Für die randomisierte, placebokontrollierte Doppelblindstudie im Cross-over-Design wurden 15 gesunde Probanden und 15 Patienten mit AD rekrutiert. Die Teilnehmer im Alter von 19 bis 31 Jahren konsumierten nach einer dreiwöchigen, probiotikafreien Adaptationsperiode über acht Wochen täglich 2 x 100 ml eines Joghurtgetränks mit den probiotischen Kulturen *L. paracasei* Lpc-37 ($7,8 \times 10^{10}$ kbE/d), *L. acidophilus* 74-2 ($5,8 \times 10^6$ kbE/d) und *B. lactis* 420 ($1,2 \times 10^7$ kbE/d) bzw. ein optisch und sensorisch identisches Placeboprodukt. Nach einer zweiwöchigen Wash-out-Phase wechselte die Intervention für die nächsten acht Wochen (Cross-over). Zu Beginn sowie die letzten fünf Tage jeder Interventionsperiode führten die Probanden ein Ernährungsprotokoll, um die individuelle Nährstoffaufnahme zu erfassen. Zu Beginn der Studie sowie am Ende jeder Phase erfolgten die Sammlung von Stuhlproben sowie eine Blutabnahme. Bei den Patienten wurden das Hautbild und der Gesundheitszustand im vier- bzw. zweiwöchigem Abstand untersucht.

Anhand der Ernährungsprotokolle zeigte sich eine relativ konstante Energie- und Nährstoffaufnahme der Teilnehmer während der Studie. Die regelmäßige Aufnahme von *L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 und *B. lactis* 420 über acht Wochen resultierte in ei-

nem signifikanten Anstieg der faecalen Anteile von *L. paracasei* (Gesunde: 0,01 vs. 0,21 %, Patienten: 0,05 vs. 0,15 %) und *B. lactis* (Gesunde: 0,03 vs. 0,13 %, Patienten: 0,03 vs. 0,22 %) bei unveränderter Gesamtkeimzahl. Der Anteil von *L. acidophilus* im Stuhl wurde hingegen durch die Supplementation mit den Probiotika nicht beeinflusst. Dass bereits nach der zweiwöchigen Auswaschphase ein signifikanter Abfall für die Anteile von *L. paracasei* (Gesunde auf 0,04 %, Patienten auf 0,06 %) und *B. lactis* (Gesunde auf 0,03 %, Patienten auf 0,04 %) im Stuhl zu verzeichnen war, verdeutlicht die transiente Kolonisation mit den probiotischen Kulturen. Die Konzentration der flüchtigen Fettsäuren im Stuhl wurde durch die Intervention mit den Probiotika nicht beeinflusst. Dennoch war bei den Patienten mit AD ein signifikant erniedrigter pH-Wert (7,0 vs. 6,6) in der Probiotikaphase zu verzeichnen. Insofern scheinen andere bakterielle Fermentationsprodukte als die flüchtigen Fettsäuren für diesen Effekt verantwortlich zu sein. Die Cytotoxizität im FW blieb während der Studie unbeeinflusst. Dagegen wurde die Genotoxizität im FW durch die Probiotika bei den Patienten mit AD signifikant vermindert (23,5 vs. 16,7 %), während bei den Gesunden kein Effekt zu verzeichnen war (14,6 vs. 13,8 %). Die Cholesteroll- und die TAG-Konzentration im Serum wurden durch die Intervention mit den Probiotika in dieser Studie nicht beeinflusst.

Für die Ausprägung und den Schweregrad der AD dokumentiert mit dem SCORAD, konnte durch die Probiotika eine tendenzielle Verbesserung um 15,5 % festgestellt werden, wobei die subjektiven Symptome unverändert blieben. Die Patienten wiesen die für AD typische Eosinophilie und erhöhte IgE-Konzentrationen im Serum auf. Die Expression der verschiedenen Lymphocytenoberflächenmarker blieb durch die Intervention weitgehend unbeeinflusst. Lediglich für CD57⁺ wurde eine erhöhte Expression nach Probiotika bei den gesunden Probanden beobachtet (5,3 vs. 8,7 %). In der Patientengruppe war die Expression der CD4⁺CD54⁺ in der Probiotikaphase signifikant vermindert (18,3 vs. 15,1 %). Die Phagozytoseaktivität gemessen als mittlere Fluoreszenzintensität pro Zelle (1587 vs. 2009) und die Anteile phagozytoseaktiver Monocyten und neutrophiler Granulocyten (96,7 vs. 99,0 %) waren infolge der Probiotikaaufnahme im Vergleich zum Placebo bei den Gesunden signifikant erhöht, während in der Patientengruppe kein Einfluss verzeichnet wurde. Die Supplementation ergab keine Effekte auf die Konzentration der analysierten Cytokine sowie auf das ECP, MDC und sE-Selectin im Serum als charakteristische Biomarker zur Dokumentation der Krankheitsaktivität.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen die stammspezifische Wirkung probiotischer Mikroorganismen. Gesunde Personen können aufgrund der immunstimulieren-

den Wirkung von der regelmäßigen Aufnahme der untersuchten Kombinationen probiotischer Kulturen profitieren. Bei den Patienten mit AD deutete sich eine Verbesserung des Hautbilds bei unveränderten Biomarkern der Krankheitsaktivität an. Für eine endgültige Bewertung der Effektivität der eingesetzten Probiotika sind weitere Untersuchungen bei AD im Erwachsenenalter notwendig.

7 Summary

Numerous health effects are associated with a regular intake of probiotics. However, probiotic functions are strain specific and depend on the supplement matrices (yoghurt, milk, capsules). Therefore, potential effects have to be studied in the probiotic product. The objective of the present work was to investigate the effects of *Lactobacillus acidophilus* 74-2, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DGCC 420 (*B. lactis* 420) and *Lactobacillus paracasei* Lpc-37 administered in fermented milk products on physiologic and immunologic processes in healthy adults and patients with atopic dermatitis (AD). The probiotic species were detected in faecal samples after each study period to evaluate their colonisation in the gastrointestinal tract. Furthermore, their influence on the metabolism of the intestinal microbiota and the genotoxicity of faecal water were evaluated.

HUMAN INTERVENTION STUDY I

The study was designed as a placebo-controlled and cross-over study. After a first yoghurt-free period (three weeks) 13 men and 13 women aged between 20 and 37 years consumed 300 g yoghurt daily for five weeks. Half of the subjects consumed yoghurt containing the probiotic strains *L. acidophilus* 74-2 (2.8×10^9 cfu/d) and *B. lactis* 420 (9.0×10^8 cfu/d) and the other half received the placebo product. The two groups were crossed during another five week-period. The last seven days of each period all participants had to consume a defined diet. During this time urine, faeces and blood samples were collected.

Renal and faecal nitrogen-excretion, faecal fat excretion and stool weight did not differ between the probiotic and the placebo period. According to the definition for probiotics, the survival of gastrointestinal transition of the probiotic bacteria and their adhesion to intestinal mucosa provide the basis for colonisation of the gastrointestinal tract and mediation of immune system stimulating signals. Probiotic bacteria were detected in faeces with species-specific probes using the FISH technique. The results showed a significant increase in *L. acidophilus* (0.02 vs. 0.22% of EUB) and *B. lactis* (0.42 vs. 1.72% of EUB) after probiotic intervention. This effect indicates transient colonisation of the probiotics. Concentration of total short-chain fatty acids in faeces and faecal pH as a marker for bacterial metabolism remained unchanged. Probiotic supplementation did not affect cytotoxicity of faecal water. However, genotoxicity of faecal water, detected as tail intensity, decreased significantly (4.09 vs. 1.01%) after five-week probiotic intake. Thus, this result suggests the preventive effect of probiotic microorganisms on the formation of genotoxic compounds in the colon. The influence of probiotics on cholesterol metabolism is discussed

controversially. In the present study serum concentrations of TC, LDL-C and HDL-C were not altered by the probiotic intervention. However, serum concentrations of TAG decreased significantly by 11.6% after probiotic intake. Probiotic bacteria are known to interact with the immune system via the gut-associated lymphoid tissue. *L. acidophilus* 74-2 and *B. lactis* 420 did not affect serum biomarkers of the specific cellular immune response. However, percentages of phagocytic active monocytes and granulocytes (92 vs. 95%) and oxidative burst activity (258 vs. 348 fluorescence intensity) increased significantly after probiotic supplementation. This indicates a stimulation of the unspecific cellular immune response by *L. acidophilus* 74-2 and *B. lactis* 420.

HUMAN INTERVENTION STUDY II

For the placebo-controlled and cross-over study 15 healthy subjects and 15 patients with mild or moderate AD aged between 19 and 31 years were recruited. After a run-in period (three weeks, probiotic-free) half of the subjects received 2 x 100 ml/d of the probiotic drink containing *L. paracasei* Lpc-37 (7.8×10^{10} cfu/d), *L. acidophilus* 74-2 (5.8×10^6 cfu/d) and *B. lactis* 420 (1.2×10^7 cfu/d) and the other half received 2 x 100 ml/d of a placebo drink for eight weeks. After a two-week wash-out period, the intervention crossed and the respective products were consumed for another eight weeks. To acquire the individual nutritional habits, participants had to run a food record for five days. They were supposed to remain their usual nutrition throughout the study. At the same time fresh stool samples were collected and venous blood samples were taken after overnight fasting. Additionally, after the wash-out period fresh stool samples and venous blood samples were taken in order to control the continuance of the effect. In patients the severity of AD (SCORAD) was assessed by the same physician every four weeks and two weeks after the wash-out period, respectively.

Energy and nutrient intake of participants was comparable between probiotic and placebo period as evaluated by the food record. Faecal proportions of *L. paracasei* and *B. lactis* on the total number of microbes detected by qRT-PCR increased significantly during the probiotic intervention period compared to the placebo period (*L. paracasei*: healthy adults 0.01 vs. 0.21%, AD patients 0.05 vs. 0.22%; *B. lactis*: healthy adults 0.03 vs. 0.13%, AD patients 0.03 vs. 0.15%). In contrast, supplementation with *L. acidophilus* 74-2 did not affect faecal proportions of *L. acidophilus*. Two weeks after cessation of the probiotic drink a significant decrease of *L. paracasei* (healthy adults 0.21% vs. 0.04%, AD patients 0.22% vs. 0.06%) and *B. lactis* (healthy adults 0.13% vs. 0.03%, AD patients 0.15% vs. 0.04%) was observed. This result indicates transient colonisation of *L. paracasei* and *B. lactis*.

Concentrations of short-chain fatty acids were not affected by the probiotic intervention. However, in AD patients a significant decrease in faecal pH (7.0 vs. 6.6) was observed in the probiotic period. Thus, this effect was caused by other bacterial fermentation products than short-chain fatty acids. Cytotoxicity of faecal water remained unchanged during study periods in both, healthy subjects and patients with AD. Genotoxicity of faecal water decreased significantly after probiotic supplementation in AD patients (23.5 vs. 16.7%), whereas in healthy subjects there was no effect of the probiotics on genotoxicity (14.6 vs. 13.8%). The supplementation with the probiotics did not affect serum concentrations of TC, LDL-C, HDL-C and TAG. In patients with AD the clinical SCORAD tended to decrease by 15.5% ($P = 0.081$) after eight weeks of probiotic supplementation. AD is characterised by increased serum concentrations of eosinophilic granulocytes and total IgE, which was confirmed in our study. However, probiotics did not affect serum concentrations of different cytokines (IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-16), ECP, MDC and sE-selectin. The expression of lymphocyte subsets remained nearly unaffected by the probiotics. In healthy subjects only expression of CD57⁺ was significantly increased (5.3 vs. 8.7%). In patients with AD expression of CD4⁺CD54⁺ decreased significantly after probiotic consumption (18.3 vs. 15.1%). In healthy adults phagocytic activity (1587 vs. 2009 fluorescence intensity) and percentages of phagocytic active monocytes and granulocytes (96.7 vs. 99.0%) were increased after probiotic intervention, whereas in AD patients no influence of supplementation on these parameters was observed.

The results of the present human intervention studies underline the strain-specific effects of probiotic microorganisms. Administered strains were able to modulate unspecific immune response in healthy adults. Therefore, these individuals could benefit from a regular probiotic intake. In AD patients SCORAD tended to be allayed, although biomarkers for disease activity remained unaffected. Therefore, further studies are needed to evaluate the effectiveness of supplemented probiotics in adult AD patients.

Literatur

- Abd El-Gawad IA, El-Sayed EM, Hafez SA, El-Zeini HM, Saleh FA (2005) The hypocholesterolaemic effect of soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *Int Dairy J* 15, 37-44
- Abeck D & Ring J (2002) Realistische Behandlungsziele und Therapiekonzept. In: Abeck D & Ring J. *Atopisches Ekzem im Kindesalter (Neurodermitis). Das zeitgemäße Management.* Steinkopff Verlag, Darmstadt
- Adlerberth I, Cerquetti M, Poilane, Wold A, Collignon A (2000) Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microb Ecol Health Dis* 11, 223-239
- Agerholm-Larsen L, Bell ML, Grunwald GK, Astrup A (2000) The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies. *Eur J Clin Nutr* 54, 856-860
- Alander M, Mättö J, Kneifel W, Johansson M, Kögler B, Crittenden R, Mattila-Sandholm T, Saarela M (2001) Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. *Int Dairy J* 11, 817-825
- Alander M, Satokari R, Korpela R, Saxelin M, Vilpponen-Salmela T, Mattila-Sandholm T, von Wright A (1999) Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 65, 351-354
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56, 1919-1925
- Anderson JW & Gilliland SE (2000) Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Am Coll Nutr* 18, 43-50
- Angelova-Fischer I, Hipler UC, Bauer A, Fluhr JW, Tsankov N, Fischer TW, Elsner P (2006) Significance of interleukin-16, macrophage-derived chemokine, eosinophil cationic protein and soluble E-selectin in reflecting disease activity of atopic dermatitis-from laboratory parameters to clinical scores. *Br J Dermatol* 154, 1112-1117
- Antúnez C, Torres MJ, Mayorga C, Corzo JL, Jurado A, Santamaría-Babi LF, Vera A, Blanca M (2006) Cytokine production, activation marker, and skin homing receptor in

- children with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 17, 166-174
- Arici M, Bilgin B, Sagdic O, Ozdemir C (2004) Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. *Food Microbiol* 21, 19-24
- Arimochi H, Kinouchi T, Kataoka K, Kuwahara T, Ohnishi Y (1997) Effect of intestinal bacteria on formation of azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. *Biochem Biophys Res Commun* 238, 753-757
- Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK (2000) Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr* 54, 263-267
- Ashcroft DM, Dimmock P, Garside R, Stein K, Williams HC (2005) Efficacy and tolerability of topical pimecrolimus and tacrolimus in the treatment of atopic dermatitis: meta-analysis of randomised controlled trials. *BMJ* 330, 516-526
- Assman G & Schriewer H (1981) Performance and limitations of the analysis of HDL-Cholesterol. *J Clin Chem Biochem* 19, 1-6
- Ballantyne CM & Hoogeveen RC (2003) Role of lipid and lipoprotein profiles in risk assessment and therapy. *Am Heart J* 146, 227-233
- Banasaz M, Norin E, Holma R, Midtvedt T (2002) Increased enterocyte production in gnotobiotic rats mono-associated with *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 68, 3031-3034
- Barba A, Schena D, Andreatus MC, Faccini G, Pasini F, Brocco G, Cavallini G, Scuro LA, Chierigato GC (1989) Intestinal permeability in patients with atopic eczema. *Br J Dermatol* 120, 71-75
- Bartosch S, Woodmansey EJ, Paterson JCM, McMurdo MET, Macfarlane GT (2005) Microbiological effects of consuming a synbiotic containing *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, and oligofructose in elderly persons, determined by real-time polymerase chain reaction and counting of viable bacteria. *Clin Infect Dis* 40, 28-37
- Beimfohr C, Krause A, Amann R, Ludwig W, Schleifer KH (1993) *In situ* identification of *Lactococci*, *Enterococci* and *Streptococci*. *Syst Appl Microbiol* 16, 450-456
- Bellinghausen I, Klostermann B, Knop J, Saloga J (2003) Human CD4⁺CD25⁺ T cells derived from the majority of atopic donors are able to suppress T_H1 and T_H2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 111, 862-868
- Bertolami MC, Faludi AA, Batluoni M (1999) Evaluation of the effects of a new fermented milk product (Gaio) on primary hypercholesterolemia. *Eur J Clin Nutr* 53, 97-101

- BgVV (2000) Probiotische Mikroorganismenkulturen in Lebensmitteln. Ernährungs-Umschau 47, 191-195
- Bjarnason I, Goolamali SK, Levi AJ, Peters TJ (1985) Intestinal permeability in patients with atopic eczema. Br J Dermatol 112, 291-297
- Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M (1999) The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. Clin Exp Allergy 29, 342-346
- Björkstén B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M (2001) Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. J Allergy Clin Immunol 108, 516-520
- Blasco L, Ferrer S, Pardo I (2003) Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria. FEMS Microbiol Letters 225, 115-123
- Blaut M, Collins MD, Welling GW, Doré J, van Loo J, de Vos W (2002) Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. Br J Nutr 87, S203-S211
- Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolín M, De Lara F, Espín E, Naval J, Guarner F, Malagelada JR (2002) Increased mucosal tumor necrosis factor α production in Crohn's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. Gut 51, 659-664
- Brandtzaeg P (1995) Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system. APMIS 103, 1-19
- Brandtzaeg P, Halstensen TS, Kett K, Krajci P, Kvale D, Rognum TO, Scott H, Sollid LM (1989) Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. Gastroenterology 97, 1562-1584
- Brashears MM, Gilliland SE, Buck LM (1998) Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. J Dairy Sci 81, 2103-2109
- Breuer K, Braeutigam M, Kapp A, Werfel T (2004) Influence of pimecrolimus cream 1% on different morphological signs of eczema in infants with atopic dermatitis. Dermatology 209, 314-320
- Brouns F, Kettlitz B, Arrioni E (2002) Resistant starch and the butyrate revolution. Trends Food Sci Technol 13, 251-261
- Brouwer ML, Wolt-Plompen SAA, Dubois AEJ, Van der Heide S, Jansen DF, Hoijer MA, Kauffman HF, Duiverman EJ (2006) No effects of probiotics on atopic dermatitis in infancy: a randomized placebo-controlled trial. Clin Exp Allergy 36, 899-906

- Burns AJ & Rowland IR (2004) Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutat Res* 551, 233-243
- Caffarelli C, Cavagni G, Deriu F, Zanotti P, Atherton D (1998) Gastrointestinal symptoms in atopic dermatitis. *Arch Dis Child* 78, 230-234
- Caffarelli C, Cavagni G, Menzies IS, Bertolini P, Atherton DJ (1993) Elimination diet and intestinal permeability in atopic eczema: a preliminary study. *Clin Exp Allergy* 23, 28-31
- Campbell DJ, Kim CH, Butcher EC (2003) Chemokines in the systemic organization of immunity. *Immunol Rev* 195, 58-71
- Capurso G, Marignani M, Delle Fave G (2006) Probiotics and the incidence of colorectal cancer: when evidence is not evident. *Dig Liv Dis* 38, S277-S282
- Cario E (2005) Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut* 54, 1182-1193
- Cheng G, Ueda T, Eda F, Arima M, Yoshida N, Fukuda T (2001) A549 cells can express interleukin-16 and stimulate eosinophil chemotaxis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 25, 212-218
- Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Liao CK (2000) Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis HN019*): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr* 54, 849-855
- Chiu CH, Lu TY, Tseng YY, Pan TM (2006) The effects of *Lactobacillus*-fermented milk on lipid metabolism in hamsters fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol* 71, 238-245
- Chochi K, Ichikura T, Majima T, Kawabata T, Matsumoto A, Sugasawa H, Kawarabayashi N, Takayama E, Hiraide H, Seki S, Mochizuki H (2003) The increase of CD57⁺ in the peripheral blood and their impaired immune functions in patients with advanced gastric cancer. *Oncology Reports* 10, 1443-1448
- Christensen HR, Frøkiær H, Pestka JJ (2002) Lactobacilli differently modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 168, 171-178
- Christensen HR, Nexmann Larsen C, Kæstel P, Buus Rosholm L, Sternberg C, Fleischer Michaelsen K, Frøkiær H (2006) Immunomodulating potential of supplementation with probiotics: a dose-response study in healthy young adults. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47, 380-390

- Collado MC, Moreno Y, Cobo JM, Mateos JA, Hernández M (2006) Molecular detection of *Bifidobacterium animalis* DN-173010 in human feces during fermented milk administration. *Food Res Int* 39, 530-535
- Collins MD, Phillips BA, Zannoni P (1989) Deoxyribonucleic acid homology studies of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* sp. nov., subsp. *paracasei* and subsp. *tolerans*, and *Lactobacillus rhamnosus* sp. nov., comb. Nov. *Int J Syst Bacteriol* 39, 105-108
- Coudeyras S, Marchandin H, Fajon C, Forestier C (2008) Taxonomic and strain-specific identification of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* group. *Appl Environ Microbiol* 74, 2679-2689
- Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A (2002) Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 1461-1467
- Crittenden R, Saarela M, Mättö J, Ouwehand AC, Salminen S, Peltö L, Vaughan EE, de Vos WM, von Wright A, Fondén R, Mattila-Sandholm T (2002) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19: Survival, ecology and safety in the human intestinal tract - A survey of feeding studies within the PROBDEMO project. *Microb Ecol Health Dis* 14, 22-26
- Cross ML & Gill HS (2001) Can immunoregulatory lactic acid bacteria be used as dietary supplements to limit allergies? *Arch Allergy Immunol* 125, 112-119
- Cross ML (2002) Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 34, 245-253
- Cruikshank WW, Berman J, Theodre A, Bernardo J, Center DM (1987) Lymphokine activation of T4⁺ T lymphocytes and monocytes. *J Immunol* 138, 3817-3823
- Cruikshank WW, Kornfeld H, Center D (2000) Interleukin-16. *J Leukoc Biol* 67, 757-766
- Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuijelaars S, Watzl B (2004) PASSCLAIM - Gut health and immunity. *Eur J Nutr* 43 (Suppl 2), II/118-II/173
- Cummings JH, Pomare EW, Branch WJ, Naylor CPE, Macfarlane GT (1987) Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut* 28, 1221-1227
- D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ (2002) Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *Br Med J* 324, 1361-1366

- Dambekodi PC & Gilliland SE (1998) Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Sci* 81, 1818-1824
- De Moreno de le Blanc A, Chaves S, Carmuega E, Weill R, Antóine J, Perdígón G (2008) Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiol* 213, 97-108
- De Preter V, Vanhoutte T, Huys G, Swings J, De Vuyst L, Rutgeerts P, Verbeke K (2007) Effects of *Lactobacillus casei* Shirota, *Bifidobacterium breve*, and oligofructose-enriched inulin on colonic nitrogen-protein metabolism in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 292, 358-368
- De Preter V, Vanhoutte T, Huys G, Swings J, Rutgeerts P, Verbeke K (2006) Effect of lactulose and *Saccharomyces boulardii* administration on the colonic urea-nitrogen metabolism and the bifidobacteria concentration in healthy human subjects. *Aliment Pharm Therap* 23, 963-974
- De Roos NM & Katan MB (2000) Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 71, 405-411
- De Roos NM, Schouten G, Katan MB (1999) Yogurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels. *Eur J Clin Nutr* 53, 277-280
- De Rose V, Rolla G, Bucca C, Ghio P, Bertoletti M, Baderna P, Pozzi E (1994) Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated on peripheral blood T lymphocyte subsets in dual asthmatic responders. *J Clin Invest* 94, 1840-1845
- De Smet I, De Boever P, Verstrate W (1998) Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. *Br J Nutr* 79, 185-194
- De Vrese M, Rautenberg P, Laue C, Koopmans M, Herremans T, Schrezenmeir J (2005b) Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur J Nutr* 44, 406-413
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J (2001) Probiotics compensation for lactose insufficiency. *Am J Clin Nutr* 73, 421S-429S
- De Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, Harder T, Noah C, Laue C, Ott S, Hampe J, Schreiber S, Heller K, Schrezenmeir J (2005a) Effect of *Lactobacillus gasseri* PA 16/8, *Bifidobacterium longum* SP 07/3, *B. bifidum* MF 20/5 on common cold episodes: A double blind, randomized, controlled trial. *Clin Nutr* 24, 481-491

- DGE, Deutsche Gesellschaft für Ernährung (2000) Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 1. Auflage, Umschau-Braus GmbH Verlagsgesellschaft, Frankfurt am Main
- Dicks LM, Du Plessis EM, Dellaglio F, Lauer E (1996) Reclassification of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATCC 393 and *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 15820 as *Lactobacillus zeae* nom. rev., designation of ATCC 334 as the neotype of *L. casei* subsp. *casei*, and rejection of the name *Lactobacillus paracasei*. Int J Syst Bacteriol 46, 337-340
- Diepgen TL, Sauerbrei W, Fartasch M (1996) Development and validation of diagnostic scores for atopic dermatitis incorporating criteria of data quality and practical usefulness. J Clin Epidemiol 49, 1031-1038
- Ditscheid B (2006) *In vivo* investigation into the physiologic effects of pentacalcium hydroxytriphosphate supplementation in humans and *in vitro* model for the adsorption of bile acids and neutral sterols to different calcium phosphates. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Ditscheid B, Keller S, Jahreis G (2005) Cholesterol metabolism is affected by calcium phosphate supplementation in humans. J Nutr 135, 1678-1682
- Doncheva NI, Antov GP, Softova EB, Nyagolov YP (2002) Experimental and clinical study on the hypolipidemic and antisclerotic effect of *Lactobacillus bulgaricus* strain GBN 1 (48). Nutr Res 22, 393-403
- Donnet-Hughes A, Rochat F, Serrant O, Aeschlimann JM, Schiffrin EJ (1999) Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. J Dairy Sci 82, 863-869
- Drakes M, Blanchard T, Czinn S (2004) Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. Infect Immun 72, 3299-3309
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. Am J Clin Nutr 73, 386S-392S
- Emenaker NJ, Calaf GM, Cox D, Basson MD, Qureshi N (2001) Short-chain fatty acids inhibit invasive human colon cancer by modulating uPA, TIMP-2, mutant p53, Bcl-2, Bax, p21 and PCNA protein expression in an *in vitro* cell culture model. J Nutr 131, 3041S - 3046S
- Ewaschuk J & Dieleman LA (2006) Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. World J Gastroenterol 12, 5941-5950

- Ewaschuk J, Walker JW, Diaz H, Madsen KL (2006) Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs *in vitro* and *in vivo* in mice. *J Nutr* 136, 1483-1487
- Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson ML (1993) Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat. *Digestion* 54, 248-255
- Fabian E & Elmadfa I (2006) Influence of daily consumption of probiotic and conventional yoghurt on the plasma lipid profile in young healthy women. *Ann Nutr Metab* 50, 387-393
- Fagarasan S, Muramatsu M, Suzuki K, Nagaoka H, Hiai H, Honjo T (2002) Critical roles of activation-induced cytidine deaminase in the homeostasis of gut flora. *Science* 298, 1414-1427
- Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI (1998) Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1157-1170
- FAO/WHO (2001) Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina, 1-4 October 2001
- FAO/WHO (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002
- Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, Mizon J (1997) Fecal β -D-galactosidase production and bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 42, 817-822
- Flohr C, Pascoe D, Williams HC (2005) Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true? *Br J Dermatol* 152, 202-216
- Franks AH, Harmsen HJ, Raangs GC, Jansen GJ, Schut F, Welling GW (1998) Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent *in situ* hybridisation with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 64, 3336-3345
- Frezzolini A, Paradisi M, Zaffiro A, Provini A, Cadoni S, Ruffelli M, De Pità O (2002) Circulating interleukin 16 (IL-16) in children with atopic/eczema dermatitis syndrome (AEDS): a novel serological marker of disease activity. *Allergy* 57, 815-820
- Friedrich U & Lenke J (2006) Improved enumeration of lactic acid bacteria in mesophilic dairy starter cultures by using multiplex quantitative real-time PCR and flow cytometry-fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 72, 4163-4171

- Fujiwara D, Inoue S, Wakabayashi H, Fujii T (2004) The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int Arch Allergy Immunol* 135, 205-215
- Fukushima Y (2007) Probiotics and natural defense function of the host. *Biosci Microflora* 26, 1-10
- Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T (1998) Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int J Food Microbiol* 42, 39-44
- Fukushima Y, Miyaguchi S, Yamano T, Kaburagi T, Iino H, Ushida K, Sato K (2007) Improvement of nutritional status and incidence of infection in hospitalised, enterally fed elderly by feeding of fermented milk containing probiotic *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC533). *Br J Nutr* 98, 969-977
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66, 365-378
- Furet JP, Quénee P, Tailliez P (2004) Molecular quantification of lactic acid bacteria in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 97, 197-207
- Gabrielsson S, Buentke E, Lidén A, Schmidt M, D'amato M, Tengvall-Linder M, Scheynius A (2004) *Malassezia symposialis* stimulation differently affects gene expression in dendritic cells from atopic dermatitis patients and healthy individuals. *Acta Derm Venereol* 84, 339-345
- Galli E, Cicconi R, Rossi P, Casati A, Brunetti E, Mancino G (2003) Atopic dermatitis: Molecular mechanisms, clinical aspects and new therapeutical approaches. *Curr Mol Med* 3, 127-138
- Gill HS & Guarner F (2004) Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad Med J* 80, 516-526
- Gill HS, Rutherford K, Gopal PK, Cross ML (2001a) Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 74, 833-839
- Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML (2001b) Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 21, 264-271
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 49, 377-381

- Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M (2000) Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 119, 305-309
- Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M (2003) Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 124, 1202-1209
- Gleeson M (2007) Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* 103, 693-699
- Gmeiner M, Kneifel W, Kube KD, Wouters R, De Boever P, Nollet L, Verstraete W (2000) Influence of a synbiotic mixture consisting of *L. acidophilus* 74-2 and a fructooligosaccharide preparation on the microbial ecology sustained in a simulation of the human intestinal microbial ecosystem (SHIME reactor). *Appl Microbiol Biotechnol* 53, 219-223
- Goebel MU & Mills PJ (2000) Acute psychological stress and exercise and changes in peripheral leukocyte adhesion molecule expression and density. *Psychosom Med* 62, 664-670
- Goldin BR & Gorbach SL (2008) Clinical indications for probiotics: An overview. *Clin Infect Dis* 46, S96-S100
- Goldin BR, Gorbach SL, Saxelin M, Barakat S, Gualtieri L, Salminen S (1992) Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 37, 121-128
- Goldin BR, Gualtieri LJ, Moore RP (1996) The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer* 25, 197-204
- Gossens D, Jonkers D, Russel M, Stobberingh E, Van den Bogaard A, Stockbrügger RW (2003) The effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition and metabolic activity in faeces of healthy volunteers: a placebo-controlled study on the onset and duration of effects. *Aliment Pharmacol Ther* 18, 495-505
- Greany KA, Bonorden MJ, Hamilton-Reeves JM, McMullen MH, Wangen KE, Phipps WR, Feirtag J, Thomas W, Kurzer MS (2008) Probiotic capsules do not lower plasma lipids in young women and men. *Eur J Clin Nutr* 62, 232-237
- Grundy SM, Balady GJ, Criqui MH, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka LF, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz HM, LaRosa J, Ockene IS, Pearson TA, Reed J, Washington R, Smith SC (1998) Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham. *Circulation* 97, 1876-1887

- Guarner F (2006) Enteric flora in health and disease. *Digestion* 73, 5-12
- Gueimonde M, Tölkö S, Korpimäki T, Salminen S (2004) New Real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal sample. *Appl Environ Microbiol* 70, 4165-4169
- Guerin-Danan C, Chabanet C, Pedone C, Popot F, Vaissade P, Bouley C, Szylit O, Andrieux C (1998) Milk fermented with yogurt cultures and *Lactobacillus casei* compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr* 67, 111-117
- Gupta P, Andrew H, Kirschner B, Guandalini S (2000) Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31, 453-457
- Hague A, Butt AJ, Paraskeva C (1996) The role of butyrate in human colonic epithelial cells: an energy resource or inducer of differentiation and apoptosis? *Proc Nutr Soc* 55, 937-943
- Halbert A, William L, Morelli G (1995) Atopic dermatitis: is it an allergic disease? *J Am Acad Dermatol* 33, 1008-1018
- Hannett I, Erkeller-Yuksel F, Lydard P, Deneys V, Debruyere M (1992) Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunol Today* 13, 215-218
- Harmsen HJM, Elfferich P, Schut F, Welling GW (1999) A 16S rRNA-targeted probe for detection of lactobacilli and enterococci in faecal samples by fluorescent *in situ* hybridization. *Microb Ecol Health Dis* 11, 3-12
- Harmsen HJM, Raangs GC, He T, Degener JE, Welling GW (2002) Extensive set of 16S rRNA based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 68, 2982-2990
- Hauer AC (2002) Probiotika und Allergien. *Monatsschr Kinderheilkd* 150, 829-837
- Hayatsu H & Hayatsu T (1993) Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Lett* 73, 173-179
- He T, Harmsen HJM, Raangs GC, Welling GW (2003) Composition of faecal microbiota. *Microb Ecol Health Dis* 15, 153-159
- Hessle C, Andersson B, Wold AE (2000) Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic Interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun* 68, 3581-3586

- Hessle C, Hanson LA, Wold AE (1999) Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 116, 276-282
- Heyman & Heuvelin (2006) Probiotic micro-organisms and immune regulation: the paradox. *Nutr Clin Mét* 20, 85-94
- Hirai S, Kageshita T, Kimura T, Tsujisaki M, Okajima K, Imai K, Ono T (1996) Soluble intercellular adhesion molecule-1 and soluble E-selectin levels in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 134, 657-661
- Hirose Y, Murosaki S, Yamamoto Y, Yoshikai Y, Tsuru T (2006) Daily intake of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 augments acquired immunity in healthy adults. *J Nutr* 136, 3069-3073
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ (1998) Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 41, 85-101
- Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ (2002) Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 47, 2625-2634
- Ishida Y, Bandou I, Kanzato H, Yamamoto N (2003) Decrease in ovalbumin specific IgE of mice serum after oral uptake of lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 951-957
- Isolauri E, Arvola T, Sütas Y, Moilanen E, Salminen S (2000) Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30, 1604-1610
- Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H (1993) *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 105, 1643-1650
- Isolauri E, Salminen S, Ouwehand AC (2004) Probiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 18, 299-313
- Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S (2001) Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73, 444S-450S
- Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S (2002) Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut* 50, iii54-iii59
- Jahnz-Rozyk K, Targowski T, Paluchowska E, Owczarek W, Kucharczyk A (2005) Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. *Allergy* 60, 685-688
- Jahreis G, Vogelsang H, Kiessling G, Schubert R, Hammes WP (2002) Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Res In* 35, 133-138

- Janeway CA and Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216
- Johansson ML, Molin G, Jeppsson B, Nobaek S, Ahrné S, Bengmark S. (1993) Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup: *in vivo* colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *Appl Environ Microbiol* 59, 15-20
- Johansson ML, Nobaek S, Berggren A, Nyman M, Björck I, Ahrné S, Jeppsson B, Molin G (1998) Survival of *Lactobacillus plantarum* DSM 9843 (299v), and effect on the short-chain fatty acid content of faeces after ingestion of a rose-hip drink with fermented oats. *Int J Food Microbiol* 42, 29-38
- Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M, Mitsui H, Tada Y, Saeki H, Torii H, Komine M, Asahina A, Tamaki K (2002) Serum macrophage-derived chemokine (MDC) levels are closely related with the disease activity of atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol* 127, 270-273
- Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E (2001a) Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 107, 129-134
- Kalliomäki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E (2001b) Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076–1079
- Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Kero P, Isolauri E (2003) Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 361, 1869-1871
- Karlsson MR, Rugtveit J, Brandtzaeg P (2004) Allergen-responsive CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in children who have outgrown cow's milk allergy. *J Exp Med* 199, 1679-1688
- Kaser A, Dunzendorfer S, Offner FA, Ludwiczek O, Enrich B, Koch RO, Cruikshank WW, Wiedermann CJ, Tilg H (2000) B lymphocyte-derived IL-16 attracts dendritic cells and Th cells. *J Immunol* 165, 2474-2480
- Kawase M, Hashimoto H, Hosoda M, Morita H, Hosono A (2000) Effect of administration of fermented milk containing whey protein concentrate to rats and healthy men on serum lipids and blood pressure. *J Dairy Sci* 83, 255-263
- Kekkonen RA, N Lummela, Karjalainen H, Latvala S, Tynkkynen S, Järvenpää S, Kautiainen H, Julkunen I, Vapaatalo H, Korpela R (2008) Probiotic intervention has strain-

- specific anti-inflammatory effects in healthy adults. *World J Gastroenterol* 14, 2029-2036
- Keller S (2002) Methodenentwicklung zur gaschromatographisch-massenspektrometrischen Analyse freier faecaler Sterole und Gallensäuren im Single Ion Monitoring; Einfluss von Nahrungssupplementen auf die Exkretion. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Kelly D, Conway S, Aminov R (2005) Commensal gut bacteria: mechanisms of immune modulation. *Trends Immunol* 26, 326-333
- Khoo UY, Proctor IE, Macpherson AJ (1997) CD4⁺ T cell downregulation in human intestinal mucosa: evidence for intestinal tolerance to luminal bacterial antigens. *J Immunol* 158, 3626-3634
- Kießling G, Schneider J, Jahreis G (2002) Long term consumption of fermented dairy products over six months increases HDL-cholesterol. *Eur J Clin Nutr* 56, 843-849
- Kikuchi-Hayakawa H, Shibara-Sone H, Osada K, Onodera-Masuoka N, Ishikawa F, Watanuki M (2000) Lower plasma triglyceride level in syrian hamsters fed on skim milk fermented with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 466-475
- Kim JT, Jung HY, Lee NK, Rhim SL, Paik HD (2006) Isolation, identification, and probiotic properties of *Lactobacillus reuteri* HY701 from human feces. *Food Sci Biotechnol* 15, 677-682
- Kimoto H, Mizumachi K, Okamoto T, Kurisaki J (2004) New Lactococcus strain with immunomodulatory activity: enhancement of Th1-type immune response. *Microbiol Immunol* 48, 75-82
- Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto (2002) Cholesterol removal from media by *Lactococci*. *J Dairy Sci* 85, 3182-3188
- Kimura K, McCartney AL, McConnell MA, Tannock GW (1997) Analysis of fecal populations in *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* and investigation of the immunological responses of their human hosts to the predominant strains. *Appl Environ Microbiol* 63, 3394-3398
- Kirjavainen PV & Gibson GR (1999) Healthy gut microflora and allergy: factors influencing development of the microbiota. *Ann Med* 31, 288-292
- Kirjavainen PV, Salminen S, Isolauri E (2003) Probiotic bacteria in the management of atopic disease: underscoring the importance of viability. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 36, 223-227

- Klaver FAM & Van der Meer R (1993) The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl Environ Metab* 59, 1120-1124
- Klein A, Friedrich U, Vogelsang H, Jahreis G (2008) *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *Eur J Clin Nutr* 62, 584-593
- Klinder A, Förster A, Caderni G, Femia AP, Pool-Zobel BL (2004). Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their synbiotic combination. *Nutr Cancer* 49, 144-155
- Kok RG, De Waal A, Schut F, Welling GW, Weenk G, Hellingwerf KJ (1996) Specific detection and analysis of a probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Appl Environ Microbiol* 62, 3668-3672
- Kraft J (2004) Inkorporation von konjugierten Linolsäuren in Körperlipide unter besonderer Berücksichtigung der Isomerenverteilung. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Krammer HJ, Kämper H, von Büнау R, Zieseniß E, Stange C, Schlieger F, Clever I, Schulze J (2006) Probiotic drug therapy with *E. coli* strain Nissle 1917 (EcN): Results of a prospective study of the records of 3807 patients. *Z Gastroenterol* 44, 651-656
- Kristensen HJ (2002) Probiotic activity of lactic acid bacteria. MSc Thesis, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark
- Kruis W, (2004) Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53, 1617-1623.
- Kühbacher T, Ott SJ, Helwig U, Mimura T, Rizzello F, Kleessen B, Gioncetti P, Blaut M, Campieri M, Fölsch UR, Kamm MA, Schreiber S (2006) Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut* 55, 833-841
- Lahtinen SJ, Gueimonde M, Ouwehand AC, Reinikainen JP, Salminen SJ (2006) Comparison of four methods to enumerate probiotic bifidobacteria in a fermented food product. *Food Microbiol* 23, 571-577
- Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MHF, Welling GW (1995) Quantitative fluorescence *in situ* hybridisation of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 61, 3069-3075

- Lanier LL & Loken MR (1984) Human lymphocyte subpopulations identified by using three-color immunofluorescence and flow cytometry analysis: correlation of Leu-2, Leu-3, Leu-7, Leu-8, and Leu-11 cell surface antigen expression. *J Immunol* 132, 151-156
- Lanier LL, Le AM, Phillips JH, Warner NL, Babcock GF (1983) Subpopulations of human natural killer cells defined by expression of the Leu-7 (HNK-1) and Leu-11 (NK-15) antigens. *J Immunol* 131, 1789-1796
- Lanning D, Sethupathi P, Rhee KJ, Zhai SK, Knight KL (2000) Intestinal microflora and diversification of the rabbit antibody repertoire. *J Immunol* 165, 2012-2019
- Larsen CN, Nielsen S, Kæstel P, Brockman E, Bennedsen M, Christensen HR, Eskesen DC, Jacobsen BL, Michaelsen KF (2006) Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr* 60, 1284-1293
- Lesourd BM, Mazari L, Ferry M (1998) The role of nutrition in immunity in the aged. *Nutr Rev* 56, 113-125
- Lesourd, BM (1995) Protein undernutrition as the major cause of decreased immune function in the elderly: clinical and functional implications. *Nutr Rev* 56, 86-92
- Leung TF, Ma KW, Hon KL, Lam CWK, Wan H, Li CY, Chan IHS (2003) Serum concentration of macrophage-derived chemokine may be a useful inflammatory marker for assessing severity of atopic dermatitis in infants and young children. *Pediatr Allergy Immunol* 14, 296-301
- Lewis SJ & Burmeister S (2005) A double-blind placebo-controlled study of the effects of *Lactobacillus acidophilus* on plasma lipids. *Eur J Clin Nutr* 59, 776-780
- Liévin V, Pfeiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL (2000) *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 47, 646-652
- Lin FM, Chiu CH, Pan TM (2004) Fermentation of a milk-soymilk and Lycium Chinese Miller mixture using a new isolate of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101 and *Bifidobacterium longum*. *J Ind Microbiol Biotech* 31, 559-564
- Ling EM, Smith T, Nguyen XD, Pridgeon C, Dallman M, Arbery J, Carr VA, Robinson DS (2004) Relation of CD4+CD25+ regulatory T-cell suppression of allergen-driven T-cell activation to atopic status and expression of allergic disease. *Lancet* 363, 608-615

- Ling WH, Korpela R, Mykkanen H, Salminen S, Hanninen O (1994) *Lactobacillus* strain GG supplementation decreases colonic hydrolytic and reductive enzyme activities in healthy female adults. *J Nutr* 124, 18-23
- Liong MT & Shah NP (2005) Bile salt deconjugation ability, bile salt hydrolase activity and cholesterol co-precipitation ability of lactobacilli strains. *Int Dairy J* 15, 391-398
- Liong MT & Shah NP (2006) Effects of a *Lactobacillus casei* synbiotic on serum lipoprotein, intestinal microflora, and organic acids in rats. *J Dairy Sci* 89, 1390-1399
- MacDonald TT & Monteleone G (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* 307, 1920-1925
- MacDonald TT (2003) The mucosal immune system. *Parasite Immunol* 25, 235-246
- Macfarlane GT, Cummings JH, Allison C (1986) Protein degradation by human intestinal bacteria. *J Gen Microbiol* 132, 1647-1656
- Macfarlane S & Macfarlane GT (2003) Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 62, 67-72
- Mack DR, Ahrné Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA (2003) Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 52, 827-833
- Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle JS, Jewell L, De Simone C (2001) Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121, 580-591
- Maes M, van Bockstaele DR, Van Gastel A, Song C, Schotte C, Neels H, DeMeester I, Scharpe S, Janca A (1999) The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans: evidence of immune activation. *Neuropsychobiology* 39, 1-9
- Mai V & Morris G (2004) Colonic bacterial flora: Changing understandings in the molecular age. *J Nutr* 134, 459-464
- Maldonado Galdeano C & Perdigón G (2004) Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol* 97, 673-681
- Maldonado Galdeano CM & Perdigón G (2006) The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol* 13, 219-226
- Mann G & Spoerry A (1974) Studies of surfactant and cholesteremia in the Massai. *Am J Clin Nutr* 27, 464-469

- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer KH (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 15, 593-600
- Marcos A, Wärnberg J, Nova E, Gómez S, Alvarez A, Alvarez R, Mateos JA, Cobo JM (2004) The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur J Nutr* 43, 381-389
- Marschan E, Kuitunen M, Kukkonen K, Poussa T, Sarnesto A, Haahtela T, Korpela R, Savilahti E, Vaarela O (2008) Probiotics in infancy induce protective immune profiles that are characteristic for chronic low-grade inflammation. *Clin Exp Allergy* 38, 611-618
- Marteau P, Cuillerier E, Meance S, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier M, Bouley C, Tondu F, Bommelaer G, Grimaud JC (2002) *Bifidobacterium animalis*, strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomised, controlled study. *Aliment Pharm Therap* 16, 587-593
- Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73, 430S-436S
- Masuda K, Katoh N, Okuda F, Kishimoto S (2003) Increased levels of serum interleukin-16 in adult type atopic dermatitis. *Acta Derm Venerol* 83, 249-253
- Matsumoto M, Aranami A, Ishige A, Watanabe K, Benno Y (2007a) LKM512 yogurt consumption improves the intestinal environment and induces the T-helper type 1 cytokine in adult patients with intractable atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 37, 358-370
- Matsumoto M, Benno Y (2006) Consumption of probiotic yogurt containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* LKM512 produces anti-inflammatory metabolites in the gut. *Biosci Biotech Biochem* 70, 1287-1292
- Matsumoto M, Kakizoe K, Benno Y (2007b) Comparison of fecal microbiota and polyamine concentration in adult patients with intractable atopic dermatitis and healthy adults. *Microbiol Immunol* 51, 37-46
- Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T (1998) The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J Dairy Sci* 81, 48-53

- Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T (1998) The effect of oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. *J Dairy Sci* 81, 48-53
- McBain AJ & Macfarlane GT (1998) Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med Microbiol* 47, 407-416
- McBain AJ & Macfarlane GT (1998) Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. *J Med Microbiol* 47, 407-416
- McCartney AL, Wenzhi W, Tannock GW (1996) Molecular analysis of the composition of the bifidobacterial and lactobacillus microflora of humans. *Appl Environ Microbiol* 62, 4608-4613
- Metchnikoff E (1907) Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: *The prolongation of life: Optimistic studies*. William Heinemann, London, 161-183
- Metges CC & Barth CA (2000) Metabolic consequences of a high dietary-protein intake in adulthood: Assessment of the available evidence. *J Nutr* 130, 886-889
- Michaelsson G (1973) Decreased phagocytic capacity of the neutrophil leukocytes in patients with atopic dermatitis. *Acta Derm Venerol* 53, 279-282
- Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, Julkunen I (1998) Lactobacilli and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma-interferon production in human peripheral mononuclear cells. *Infect Immun* 66, 6058-6062
- Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA (2004) Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 53, 108-114
- Mital BK & Garg SK (1995) Anticarcinogenic, hypercholesterolemic, and antagonistic activities of *Lactobacillus acidophilus*. *Crit Rev Microbiol* 21, 175-214
- Mitsuoka T, Hayakawa K, Kimura N (1974) Die faekal Flora bei Menschen. II. Die Zusammensetzung der Bifidobakterien-Flora verschiedener Altersgruppen, *Zentbl. Bakteriol. Orig. A* 223, 333-342
- Montrose DC & Floch MH (2005) Probiotics used in human studies. *J Clin Gastroenterol* 39, 469-484

- Morita H, Kihara T, Miyamoto M, Yamagata M, Sagami S (1990) Interleukin-2 production of T cells in atopic dermatitis. *J Dermatol* 17, 375-379
- Mowat A (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev* 3, 331-341
- Mrowietz U, Konter U, Traut R, Schroeder JM, Christophers E (1988) Atopic dermatitis: Influence of bacterial infections on human monocyte and neutrophil granulocyte functional activities. *J Allergy Clin Immunol* 82, 1027-1036
- Mueller S, Saunier K, Hanisch C, Norin E, Alm L, Midtvedt T, Cresci A, Silvi S, Orpianesi C, Verdenelli MC, Clavel T, Koebnick C, Zunft HJF, Doré J, Blaut M (2006) Differences in fecal microbiota in different european study populations in relation to age, gender, and country: a cross-sectional study. *Appl Environ Microbiol* 72, 1027-1033
- Murat-Sušić S, Lipozenčić J, Žižić V, Husar K, Marinović B (2006) Serum eosinophil cationic protein in children with atopic dermatitis. *Int J Dermatol* 45, 1156-1160
- Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okumura K (2000) Effects of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 64, 2706-2708
- Nakachi K & Imai I (1992) Environmental and physiological influences on human natural killer cell activity in relation to good health practices. *Jpn J Cancer Res* 83, 798-805
- Naumann K & Basler R (1976) Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Methodenbuch Band III VDLUFA, Verlag J Neumann-Neudamm, Melsungen, Berlin, Basel, Wien
- Newberry RD & Lorenz RG (2005) Organizing a mucosal defense. *Immunol Rev* 206, 6-21
- Nguyen TDT, Kang JH, Lee MS (2007) Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol* 113, 358-361
- Niess JH & Reinecker HC (2006) Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cell Microbiol* 8, 558-564
- Niggemann B, Beyer K, Wahn U (1994) The role of eosinophils and eosinophil cationic protein in monitoring oral challenge tests in children with food-sensitive atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 94, 963-971
- Noh DO, Kim SH, Gilliland SE (1997) Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J Dairy Sci* 80, 3107-3113

- Novak N & Bieber T (2003) Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 112, 252-262
- Novak N & Bieber T (2005) Pathogenese des atopischen Ekzems. *JDDG* 12, 994-1004
- Oberreuther-Moschner DL, Jahreis G, Rechlemmer G, Pool-Zobel BL (2004) Dietary intervention with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells. *Br J Nutr* 91, 925-932
- Oberreuther-Moschner DL, Jahreis G, Rechlemmer G, Pool-Zobel BL (2004) Dietary intervention with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29clone19A cells. *Br J Nutr* 91, 925-932
- Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, Yasuda K (2006) Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol* 143, 103-109
- Olivares M, Paz Díaz-Ropero M, Gómez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, Martín R, López-Huertas E, Rodríguez JM, Xaus J (2006a) Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int J Food Microbiol* 107, 104-111
- Olivares M, Paz Díaz-Ropero M, Gómez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J (2006b) The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boost the immune system of healthy humans. *Int Microbiol* 9, 47-52
- Olivares M, Paz Díaz-Ropero M, Gómez N, Sierra S, Lara-Villoslada F, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J (2006c) Dietary deprivation of fermented foods causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of this deprivation. *J Dairy Res* 73, 492-498
- Oßwald K (2003) Entwicklung und Erprobung nicht-invasiver Biomarker-Techniken für funktionelle Assays: Erfassung molekularer Parameter der Karzinogenese. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- Oßwald K, Becker TW, Grimm M, Jahreis G, Pool-Zobel BL (2000) Inter- and intra-individual variation of faecal water - genotoxicity in human colon cells. *Mutat Res* 472, 59-70

- Otte JM, Cario E, Podolsky DK (2004) Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 126, 1054-1070
- Ou LS, Goleva E, Hall MS, Leung DY (2004) T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. *J Allergy Clin Immunol* 113, 756-763
- Ouwehand AC (2007) Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr* 137, 794S-797S
- Ouwehand AC, Lagstroem H, Suomalainen T, Salminen S (2002) Effect of probiotics on constipation, fecal azoreductase activity and fecal mucin content in the elderly. *Ann Nutr Met* 46, 159-162
- Ouwehand AC, Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S (1999b) Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. *FEMS Microbiol Letters* 172, 61-64
- Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S (1999a) Probiotics: Mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 9, 43-52
- Ouwehand AC, Nurminen P, Mäkivuokko H, Rautonen N (2006) Effect of *Bifidobacterium lactis* 420 on microbiota and immune function. *Ital J Food Sci* 18, 1-5
- Ouwehand AC, Salminen S, Arvola T, Ruuska T, Isolauri E (2004) Microbiota composition of the intestinal mucosa: association with fecal microbiota? *Microbiol Immunol* 48, 497-500
- Ouwehand AC, Salminen S, Roberts PJ, Ovaska J, Salminen E (2003) Disease-dependent adhesion of lactic acid bacteria to the human intestinal mucosa. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 643-646
- Ouwehand AC, Tuomala EM, Tölkö S, Salminen S (2001) Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol* 64, 119-126
- Parra D, Martínez de Morentin B, Cobo JM, Mateos A, Martínez JA (2004b) Monocyte function in healthy middle-aged people receiving fermented milk containing *Lactobacillus casei*. *J Nutr Health Aging* 8, 208-211
- Parra MD, Martínez de Morentin BE, Cobo JM, Mateos A, Martínez JA (2004a). Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people. *J Physiol Biochem* 60, 85-92
- Pathmakanthan S, Thornley JP, Hawkey CJ (1999) Mucosally associated bacterial flora of the human colon: quantitative and species-specific differences between normal and inflamed colonic biopsies. *Microb Ecol Health Dis* 11, 169-174

- Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S (1998) Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hypersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 28, 1474-1479
- Peluso I, Fina D, Caruso R, Stolfi C, Caprioli F, Fantini MC, Caspani G, Grossi E, Di Iorio L, Paone FM, Pallone F, Monteleone G (2007) *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infect Immun* 75, 1730-1737
- Perdigón G, Galdeano CM, Valdez JC, Medici M (2002) Interactions of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr* 56, S21-S26
- Perdigón G, Medina M, Vintini E, Valdez JC (2000) Intestinal pathway of internalisation of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. *Int J Immunopathol Pharmacol* 13,141-150
- Pereira DIA & Gibson GR (2002a) Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human gut. *Appl Environ Microbiol* 68, 4689-4693
- Pereira DIA and Gibson GR (2002b): Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Crit Rev Biochem Molec Biol* 37, 259-281
- Pessi T, Sütas Y, Hurme M, Isolauri E (2000) Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 30, 1804-1808
- Philpott DJ & Girardin SE (2004) The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol Immunol* 41, 1099-1108
- Pike MG, Heddle RJ, Boulton P, Turner MW, Atherton DJ (1986) Increased intestinal permeability in atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 86, 101-104
- Pochard P, Gosset P, Grangette C, Andre C, Tonnel AB, Pestel J, Mercenier A (2002) Lactic acid bacteria inhibit TH2 cytokine production by mononuclear cells from allergic patients. *J Allergy Clin Immunol* 110, 617-623
- Pohjavouri E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M, Vaarala O, Savilahti E (2004) *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN- γ production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 114, 131-136
- Pohjavouri E, Viljanen M, Korpela R, Kuitunen M, Tiittanen M, Vaarala O, Savilahti E (2004) *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN- γ production in infants with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 114, 131-136
- Pool-Zobel BL (2005) Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr* 93, S73-S90

- Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C, Moretti M, Vilarini I, Scassellati-Sforzolini R, Rowland I (1996) Lactobacillus- and bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer* 26, 365-380
- Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney CJ, Moretti M, Villarini M, Scassellati-Sforzolini G, Rowland IR (1996) *Lactobacillus* - and *Bifidobacterium* - mediated antigenotoxicity in colon cells of rats: prevention of carcinogen-induced damage *in vivo* and elucidation of involved mechanisms. *Nutr Cancer* 26, 365-380
- Pot B, Hertel C, Ludwig W, Descheemaeker P, Kersters K, Schleifer KH (1993) Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *J Gen Microbiol* 139, 513-517
- Psomas EI, Fletouris DJ, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N (2003) Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and feta cheese. *J Dairy Sci* 86, 3416-3422
- Pucci N, Novembre E, Cammarata MG, Bernardini R, Monaco MG, Calogero C, Vierucci A (2005) Scoring atopic dermatitis in infants and young children: distinctive features of the SCORAD index. *Allergy* 60, 113-116
- Pujol P, Huguet J, Drobnic F, Banquells M, Ruiz O, Galilea P, Segarra N, Aguilera S, Burnat A, Mateos JA, Postaire E (2000) The effect of fermented milk containing *Lactobacillus casei* on the immune response to exercise. *Sports Med Training Rehab* 9, 209-223
- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E (2004) Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 126, 520-528
- Rafter J (2003) Probiotics and colon cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17, 849-859

- Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, O’Riordan M, O’Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Van Loo J, Watzl B, Collins JK (2007) Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 85, 488-496
- Rafter J, Child P, Anderson AM, Alder R, Eng V, Bruce WR (1987) Cellular toxicity of fecal water depends on diet. *Am J Clin Nutr* 45, 559-563
- Rafter J, Govers M, Martel P, Pannemanns D, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Rowland I, Tuijtelaars S, Van Loo J (2004) PASSCLAIM - Diet related cancer. *Eur J Nutr* 43, II/47-II/84
- Rautava S, Kalliomäki M, Isolauri E (2002) Probiotics during pregnancy and breastfeeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 109, 119-121
- Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E (2004) The hygiene hypothesis of atopic disease - an extended version. *JPGN* 38, 378-388
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon ATR (1999) Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 354, 635-639
- Renz H (2005) Atopie und Allergie. In: Thomas L. Labor und Diagnose, Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 6. Auflage, TH-Books-Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol* 2, 361-367
- Resta-Lenert S & Barrett KE (2003) Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52, 988-997
- Rinne M, Kalliomäki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E (2005) Effects of probiotics and breastfeeding on the bifidobacterium and lactobacillus/enterococcus microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 147, 186-191
- Robertson MJ & Ritz J (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 15, 2421-2438
- Rochet V, Rogottier-Gois L, Sutren M (2006) Effects of orally administered *Lactobacillus casei* DN-114001 on the composition or activities of the dominant faecal microbiota in healthy humans. *Br J Nutr* 95, 421-429

- Roebuck KA & Finnegan A (1999) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukocyte Biol* 66, 876-888
- Roessler A (nee Klein), Friedrich U, Vogelsang H, Bauer A, Kaatz M, Hipler UC, Schmidt I, Jahreis G (2008) The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. *Clin Exp Allergy* 38, 93-102
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Nielsen SD, Fleischer Michaelsen K, Jeppesen DS, Valerius NH, Paerregaard A (2003) Effect of probiotic *Lactobacillus* strains in children with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 111, 389-395
- Rosenfeldt V, Benfeldt E, Valerius NH, Paerregaard A, Fleischer Michaelsen K (2004) Effect of probiotics on gastrointestinal symptoms and small intestinal permeability in children with atopic dermatitis. *J Pediatr* 145, 612-616
- Rosenfeldt V, Paerregaard A, Larsen CN, Møller PL, Tvede M, Sandström B, Jakobsen M, Michaelsen KF (2003) Faecal recovery, mucosal adhesion, gastrointestinal effects and tolerance of mixed cultures of potential probiotic lactobacilli. *Microb Ecol Health Dis* 5, 2-9
- Rosignoli P, Fabiani R, De Bartolomeo A, Spinozzi F, Agea E, Pelli MA, Morozzi G (2001) Protective activity of butyrate on hydrogen peroxide-induced DNA damage in isolated human colonocytes and HT29 tumour cells. *Carcinogenesis* 22, 1675-1680
- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC (1998) Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 19, 281-285
- Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC (1998) Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 19, 281-285
- Salminen S, Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR, Isolauri E, Moreau MC, Roberfroid M, Rowland I (1998) Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 80, S147-S171
- Salminen S, Gorbach S, Lee YK, Benno Y (2006) Human studies on probiotics: What is scientifically proven today? In: Lactic acid bacteria. Microbiological & functional aspects. Salminen S, von Wright A, Ouwehand AC (eds) 3th edition Revised & Expanded
- Salminen S, Gueimonde M, Isolauri E (2005) Probiotics that modify disease risk. *J Nutr* 135, 1294-1298

- Sandström (1965) Studies on cells from liver tissue cultivated *in vitro*. *Exp Cel Re* 37, 552-568
- Sawada J, Morita H, Tanaka A, Salminen S, He F, Matsuda H (2007) Ingestion of heat-treated *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents development of atopic dermatitis in NC/Nga mice. *Clin Exp Allergy* 37, 296-303
- Schäfer T (2002) Häufigkeit. In: Abeck D & Ring J. Atopisches Ekzem im Kindesalter (Neurodermitis). Das zeitgemäße Management. Steinkopff-Verlag, Darmstadt
- Schiffirin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A (1997). Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* 66, 515S-520S
- Schrezenmeir J & de Vrese M (2001) Probiotics, Prebiotics, and synbiotics - approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73, 361S-364S
- Sheih YH, Chiang BL, Wang LH, Liao CK, Gill HS (2001) Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J Am Coll Nutr* 20, 149-156
- Sheu BS, Cheng HC, Kao AW, Wang ST, Yang YJ, Yang HB, Wu JJ (2006) Pretreatment with *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium*-containing yogurt can improve the efficacy of quadruple therapy in eradicating residual *Helicobacter pylori* infection after failed triple therapy. *Am J Clin Nutr* 83, 864-869
- Shi HZ, Li S, Xie ZF, Qin XJ, Qin X, Zhong XN (2004) Regulatory CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes in peripheral blood from patients with atopic asthma. *Clin Immunol* 113, 172-178
- Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, Koga Y (2003) The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol* 47, 371-378
- Shida K, Takahashi R, Iwadate E, Takamizawa K, Yasui H, Sato T, Habu S, Hachimura S, Kaminogawa S (2002) *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy* 32, 563-570
- Seifert S (2008) The effect of consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* Shirota on innate immune functions in healthy men with a low natural killer cell activity. 1. Tagung der DGHM-Fachgruppe Probiotika, Mikrobiota und Wirt, Seon

- Simons LA, Amansec SG, Conway P (2006) Effect of *Lactobacillus fermentum* on serum lipids in subjects with elevated serum cholesterol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16, 531-535
- Sing NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 37, 552-568
- Singh J, Rivenson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy BS (1997) *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18, 833-841
- Smith EA & Macfarlane GT (1996) Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *J Appl Bacteriol* 81, 288-303
- Smith JJ, Gunasekera TS, Barardi CR, Veal D, Vesey G (2004) Determination of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability by fluorescence *in situ* hybridization using a ribosomal RNA-directed probe. *J Appl Microbiol* 96, 409-417
- Solana R & Mariani E (2000) NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 18, 1613-1620
- Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G (1998) The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 52, 899-907
- Stadler JF (1993) Severity scoring of atopic dermatitis. The SCORAD index. Consensus report of the European task force on atopic dermatitis. *Dermatology* 186, 23-31
- St-Onge MP, Farnworth ER, Jones PJH (2000) Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. *Am J Clin Nutr* 71, 674-681
- Su P, Henriksson A, Tandanius JE, Park JH, Foong F, Dunn NW (2005) Detection and quantification of *Bifidobacterium lactis* LAFTI[®]B94 in human faecal samples from a consumption trial. *FEMS Microbiol Letters* 244, 99-103
- Sullivan A, Johansson A, Svenungsson B, Nord CE (2004) Effect of *Lactobacillus* F19 on the emergence of antibiotic-resistant microorganisms in the intestinal microflora. *J Antimicrob Chemoth* 54, 791-797
- Suomalainen T, Lagström H, Mättö J, Saarela M, Arvilommi H, Laitinen I, Ouwehand AC, Salminen S (2006) Influence of whey based fruit juice containing *Lactobacillus rham-*

- nosus* on intestinal well-being and humoral immune response in healthy adults. Swiss Soc Food Sci Technol 39, 788-795
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 122, 44-54
- Sydora BC, Tavernini MM, Wessler A, Jewell LD, Fedorak RN (2003) Lack of interleukin-10 leads to intestinal inflammation, independent of the time at which luminal microbial colonization occurs. Inflamm Bowel Dis 9, 87-97
- Szajewska H & Mrukowicz JZ (2001) Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. J Pediatr Gastroenterol Nutr 33, S17-S25
- Szczepanski M & Kaczmarek M (1995) The level of interleukin-2 (IL-2) in blood serum in children with food sensitive atopic dermatitis. Roczn Akad Med Białymst 40, 692-695
- Tahri K, Grill JP, Schneider F (1996) Bifidobacteria strains' behaviour toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. Curr Microbiol 33, 187-193
- Tahri K, Grill JP, Schneider F (1997) Involvement of trihydroxyconjugated bile salts in cholesterol assimilation by bifidobacteria. Curr Microbiol 34, 79-84
- Takahashi N, Kitazawa H, Shimosato T, Iwabuchi N, Xiao J, Iwatsuki K, Kokubo S, Saito T (2006) An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of *Bifidobacterium longum* inhibits IgE production *in vitro*. FEMS Immunol Med Microbiol 46, 461-469
- Tamura M, Shikina T, Morihana T, Hayama M, Kajimoto O, Sakamoto A, Kajimoto Y, Watanabe O, Nonaka C, Shida K, Nanno M (2007) Effects of probiotics on allergic rhinitis induced by Japanese cedar pollen: randomized double-blind, placebo-controlled clinical trial. Int Arch Allergy Immunol 143, 75-82
- Tannock GW (2001) Molecular assessment of intestinal microflora. Am J Clin Nutr 73, 410S-414S
- Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J, Gopal PK (2000) Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. Appl Environ Microbiol 66, 2578-2588
- Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz-Holgado AP, Valdez GF (1998) Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. J Dairy Sci 81, 2336-2340

- Toden S, Bird AR, Topping DL, Conlon MA (2007) Dose-dependent reduction of dietary protein-induced colonocyte DNA damage by resistant starch in rats correlates more highly with caecal butyrate than with other short chain fatty acids. *Cancer Biol Ther* 6, 253-258
- Topping DL & Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81, 1031-1064
- Turchet P, Laurenzano M, Auboiron S, Antoine JM (2003) Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J Nutr Health Aging* 7, 75-7
- Valeur N, Engel P, Carbajal N, Connolly E, Ladefoged K (2004) Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 70, 1176-1181
- Van de Waaij LA, Harmsen H, Madjipour M, Kroese F, Zwieters M, Van Duelllemen H, de Boer N, Welling G, Jansen P (2005) Bacteria population analysis of human colon and terminal ileum biopsies with 16S rRNA-based fluorescent probes: commensal bacteria live in suspension and have no direct contact with epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 11, 865-871
- Van Niel CW, Feudtner CW, Garrison MM, Cristakis DA (2002) *Lactobacillus* therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 109, 678-684
- Vijaya Kumar SG, Singh SK, Goyal P, Dilbaghi N, Mishra DN (2005) Beneficial effects of probiotics and prebiotics on human health. *Pharmazie* 60, 163-171
- Viljanen M, Pohjavuori E, Haahtela T, Korpela R, Kuitunen M, Sarnesto A, Vaarala O, Savilahti E (2005a) Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 115, 1254-1259
- Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, Tuure T, Kuitunen M (2005b) Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 60, 494-500
- Vinderola G, Matar C, Perdigón G (2005) Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria: Involvement of Toll-like receptors. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1075-1084
- Von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ (2001) Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4⁺ T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor β and Interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 695-701

- Vukmanovic-Stejic M, McQuaid A, Birch KE, Reed JR, Macegror C, Rustin MHA, Akbar AN (2005) Relative impact of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells and tacrolimus on inhibition of T-cell proliferation in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 153, 750-757
- Wallner G, Amann R, Beisker W (1993) Optimizing fluorescent *in situ* hybridisation of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136-143
- Watanabe S, Narisawa Y, Arase S, Okamatsu H, Ikenaga T, Tajiri Y, Kumemura M (2003) Differences in fecal microbiota between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *J Allergy Clin Immunol* 111, 587-591
- Welling GW, Wildeboer-Veloo L, Raangs GC, Franks AH, Jansen GJ, Tonk RHJ, Degener JE, Harmsen HJM (2000). Variations of bacterial populations in human faeces measured by FISH with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Biosci Microflora* 19, 79-84
- Weng M & Walker WA (2006) Bacterial colonization, probiotics, and clinical disease. *J Pediatr* 149, 107-114
- Wenisch C, Patruta S, Daxböck F, Krause R, Horl W (2000) Effect of age on human neutrophil function. *J Leuko Bio* 67, 40-45
- Werfel T, Aberer W, Bieber T, Buhles N, Kapp A, Vieluf D (2003) Atopische Dermatitis. In: Korting HC, Callies R, Reusch M, Schlaeger M, Sterry W. *Dermatologische Qualitätssicherung*. Zuckschwerdt Verlag, Germering/München, 19-20
- Weston S, Halbert H, Richmond P, Prescott SL (2005) Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* 90, 892-897
- Wildt S, Munck LK, Vinter-Jensen L, Fischer Hansen B, Nordgaard-Lassen I, Christensen N, Avnstroem S, Rasmussen SN, Rumessen JJ (2006) Probiotic treatment of collagenous colitis: a randomized, double blind, placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*. *Inflamm Bowel Dis* 12, 395-401
- Wollowski I, Ji ST, Bakalinsky AT, Neudecker C, Pool-Zobel BL (1999) Bacteria used for the production of yogurt inactivate carcinogens and prevent DNA damage in the colon of rats. *J Nutr* 129, 77-82
- Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL (2001) Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 73, 451S-455S

- Wong JMW, de Souza R, Kendall CWC, Emam A, Jenkins DJA (2006) Colonic health: Fermentation and short-chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40, 235-242
- Wu DMH, Zhang Y, Parada NA, Kornfeld H, Nicoll J, Center DM, Cruikshank WW (1999) Processing and release of IL-16 from CD4⁺ but not CD8⁺ T cells is activation dependent. *J Immunol* 162, 1287-1293
- Wuthrich B, Joller-Jemelka H, Kagi MK (1995) Levels of soluble ICAM - 1 in atopic dermatitis. A new marker for monitoring the clinical activity? *Allergy* 50, 88-89
- Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N, Miyaji K, Oshida K, Hiramatsu A, Iwatsuki K, Kokubo S, Hosono A (2003) Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J Dairy Sci* 86, 2452-2461
- Yamano T, Iino H, Takada M, Blum S, Rochat F, Fukushima Y (2006) Improvement of the human intestinal flora by ingestion of the probiotic strain *Lactobacillus johnsonii* La1. *Br J Nutr* 95, 303-312
- Yan F & Polk DB (2002) Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 277, 50959-50965
- Yim JH, Kim DH, Ku JK, Kang Y, Kim MY, Kim HO, Chung MJ, Park YM (2006) Therapeutic effects of probiotics in patients with atopic dermatitis. *J Microbiol Biotechnol* 16, 1699-1705
- Yoshida T, Kubota Y, Nishimoto M, Okada H, Hirashima M (2002) CD35 expression on peripheral blood granulocytes of patients with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci* 28, 42-47
- Yoshizawa Y, Nomaguchi H, Izaki S, Kitamura K (2002) Serum cytokine levels in atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 27, 225-229
- Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser AGM, de Voss WM (2001) The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb Ecol Health Dis* 13, 129-134

Anhang

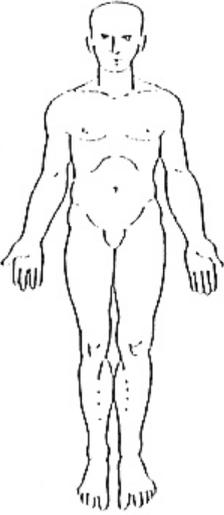
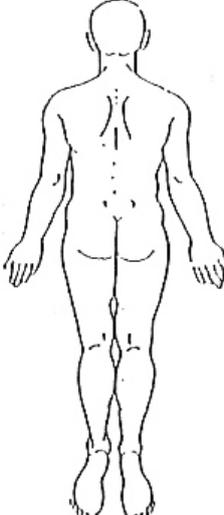
Tab. A-1: Ein- und Ausschlusskriterien für die gesunden Probanden

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Freiwillige Teilnahme mit dokumentiertem Einverständnis	Schwere Verhaltensprobleme, emotionale Probleme oder andere Umstände, die nach Meinung des Prüfarztes zu einer unzureichenden Compliance führen könnten
Bereitschaft und Fähigkeit, sich an das Protokoll zu halten	Schwangerschaft, Stillzeit
Geschäftsfähiger Patient im Alter von > 18 Jahren und < 40 Jahren	Immunsuppressive oder cytostatische Therapie bzw. systemische Steroide \leq 1 Monat vor der ersten Studienapplikation
Geschlecht: männlich oder weiblich	Phototherapie oder systemische Therapie einer Hauterkrankung \leq 1 Monat vor der ersten Studienapplikation
Kein allergisches Asthma	Aktive Hautinfektionen, AD
Keine allergische Rhinokonjunktivitis	Relevante Asthmaerkrankung, die inhalativ corticoidpflichtig ist ($FEV_1 < 70\%$)
Keine Nahrungsmittelallergien	Patienten mit Unverträglichkeit/Allergie gegenüber Bestandteilen der Milch/Laktoseintoleranz (vorbekannt oder im Allergietest festgestellt)
Ausschluss einer Atopischen Diathese (< 7 Punkte im Erlanger Atopiescore)	Patienten unter Langzeitbehandlung mit systemischen Steroiden, Depotsteroiden, langwirksamen Antihistaminika, Tranquilizern, Psychopharmaka Einnahme von Antihistaminika, Psychopharmaka mit antihistaminischer Wirkung und Anwendung von steroidhaltigen Cremes auf die Unterarme in den letzten 7 Tagen vor der Pricktestung bzw. Behandlung des Patienten mit Astemizol (Hismanal) innerhalb von 4 Wochen vor dem Test. Solche Probanden müssen wegen der langen Halbwertszeit dieses Arzneimittels von der Studie ausgeschlossen werden Akute oder chronische symptomatische Herzerkrankung und schwere internistische Erkrankungen Autoimmunerkrankungen, Immundefekte, immun-komplexinduzierte Immunopathien oder Malignome Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenmissbrauch
	Teilnahme an anderen klinischen Studien während oder 4 Wochen vor dieser Studie Fehlende Kühlgeräte

Tab. A-2: Ein- und Ausschlusskriterien für die Patienten mit atopischer Dermatitis

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Freiwillige Teilnahme mit dokumentiertem Einverständnis	Schwere Verhaltensprobleme, emotionale Probleme oder andere Umstände, die nach Meinung des Prüf arztes zu einer unzureichenden Compliance führen könnten
Bereitschaft und Fähigkeit, sich an das Protokoll zu halten	Schwangerschaft, Stillzeit
Geschäftsfähiger Patient im Alter von > 18 Jahren und < 40 Jahren	Fehlende Bereitschaft, auf andere Behandlungen der Atopischen Dermatitis als die vom Prüf arzt empfohlenen Lokaltherapeutika (Kortikoidsteroid der Klasse II) zu verzichten
Geschlecht: männlich oder weiblich	Immunsuppressive oder cytostatische Therapie bzw. systemische Steroide \leq 1 Monat vor der ersten Studienapplikation
Eindeutige Diagnose einer Atopischen Dermatitis (≥ 10 Punkte im Erlanger Atopiescore) oder Beugeneckzem und Juckreiz seit mind. 12 Monaten (rezidivierend oder konstant)	Phototherapie oder systemische Therapie der AD \leq 1 Monat vor der ersten Studienapplikation
SCORAD 5-30 (Leichte bis mittelschwere AD)	Aktive Hautinfektionen
Bereitschaft, im Rahmen der Studie nur die vom Prüf arzt empfohlenen Pflegemittel und das empfohlene Corticosteroid der Klasse II (Advantan) als weitere Therapie der AD (beispielsweise im Schub) zu verwenden	Relevante Asthmaerkrankung, die inhalativ Corticoidpflichtig ist ($FEV_1 < 70\%$)
Fähigkeit zur Führung eines Patiententagebuches und zum Ausfüllen eines Lebensqualitätsbogens	Patienten mit Unverträglichkeit/Allergie gegenüber Bestandteilen der Milch/Laktoseintoleranz
	<p>Patienten unter Langzeitbehandlung mit systemischen Steroiden, Depotsteroiden, langwirksamen Antihistaminika, Tranquilizern, Psychopharmaka</p> <p>Einnahme von Antihistaminika, Psychopharmaka mit antihistaminischer Wirkung und Anwendung von steroidhaltigen Cremes auf die Unterarme in den letzten 7 Tagen vor der Pricktestung bzw. Behandlung des Patienten mit Astemizol (Hismanal) innerhalb von 4 Wochen vor dem Test (müssen wegen der langen Halbwertszeit von der Studie ausgeschlossen werden)</p> <p>Akute oder chronische symptomatische Herzerkrankung bzw. schwere internistische Erkrankungen</p> <p>Autoimmunerkrankungen, Immundefekte (auch immunsuppressive Behandlung)</p> <p>immunkomplexinduzierte Immunopathien oder Malignome</p> <p>Alkohol-, Medikamenten- oder Drogenmissbrauch</p>
	<p>Teilnahme an anderen klinischen Studien während oder 4 Wochen vor dieser Studie</p> <p>Fehlende Kühlgeräte</p>

Kriterien
Datum
A: KOF in %
B: Trockenheit
B: Erythem
B: Ödem
B: nässend (krustös)
B: Exkorationen
B: Lichenifikationen
C: Schlafprobleme (1 bis 10)
C: Pruritus (1 bis 10)
SCORAD gesamt

Zu A: Körperoberfläche nach 9er-Regel
Zu B: pro Merkmal: nicht vorhanden = 0; gering = 1; mittel = 2; schwer = 3
Zu C: Patient vergibt Punkte zwischen 1 und 10: nicht vorhanden = 0; stark = 10
SCORAD gesamt: $A/5 + 7B/2 + C$

Schlafprobleme

0 10

Juckreiz

0 10

Abb. A-1: SCORAD-Erfassungsbogen

Tab. A-3: CD-Nomenklatur und Referenzbereiche

CD Antigen	Bezeichnung	Referenzbereich*
CD3 ⁺	T-Zellen	59 - 85 %
CD19 ⁺	B-Zellen	6 - 23 %
CD4 ⁺	T-Helfer-Zellen	29 - 61 %
CD8 ⁺	Suppressor/Zytotoxische T-Zellen	11 - 38 %
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	Aktivierte T-Zellen	1 - 9 %
CD16 ⁺ CD56 ⁺	Natürliche Killerzellen (NK)	5-30 %
CD57 ⁺	NK-Zellen, Untergruppen von T-Zellen, B-Zellen und Monozyten	5 - 25 %
CD8 ⁺ CD57 ⁺	CD57 tragende Suppressorzellen	3 - 12 %
CD25 ⁺	α -Kette des IL2-Rezeptors	5 - 13 %
CD4 ⁺ CD25 ⁺	Interleukin 2-Rezeptor tragende Helferzellen	4 - 12 %
CD54 ⁺	ICAM 1, interzelluläres Adhäsionsmolekül 1	38 - 77 %
CD4 ⁺ CD54 ⁺	CD54-tragende Helferzellen	4 - 17 %

* laboreigener Referenzbereich

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jena, 02. Juli 2008

Andrea Röbler

PUBLIKATIONEN

Klein Andrea & Jahreis Gerhard

Probiotika und deren modulierende Wirkungen auf das Immunsystem. Ernährungs-Umschau 51, 40-45 (2004).

Jahreis Gerhard & Klein Andrea

Sphingolipide In: Praxishandbuch Functional Food, Behr's Verlag (2006).

Klein Andrea, Friedrich Udo, Vogelsang Heinz, Jahreis Gerhard

Lactobacillus acidophilus 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. Eur J Clin Nutr 62, 584-593 (2008).

Roessler Andrea (nee Klein), Friedrich Udo, Vogelsang Heinz, Bauer Andrea, Kaatz Martin, Hipler Uta-Christina, Schmidt Ivonne, Jahreis Gerhard

The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention. Clin Exp Allergy 38, 93-102 (2008).

VORTRÄGE UND POSTER

Tag der Forschung, Friedrich-Schiller-Universität Jena; 27. November 2001 in Jena

Klein A, Kießling G, Keller S, Jahreis G: Interventionsstudien zur Wirkung von probiotischen Kulturen

Klein A, Kuhnt K, Vogelsang H, Jahreis G: Probiotic yoghurt and its effects on immunological parameters and serum lipids in healthy volunteers

11. Atherosklerose-Symposium; 21.-22. Juni 2002 in Erfurt

Klein A, Kießling G, Jahreis G: Einfluss von probiotischen Kulturen auf den Lipidstoffwechsel

Falk Symposium, Klinik für Innere Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena; 16. November 2002 in Jena

Klein A: Probiotika und deren Bedeutung bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

40. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung; 13.-14. März 2003 in Potsdam

Klein A, Vogelsang H, Kuhnt K, Jahreis G: Probiotika und deren Wirkungen auf das Immunsystem

9th Symposium: Vitamins and Additives in Nutrition of Man and Animal; 24.-25. September 2003 in Jena

Klein A, Vogelsang H, Jahreis G: Probiotic cultures and their modulating effects on immunological parameters and lipid metabolism

2nd International Yakult Symposium: Probiotics, Immunology and Cancer; 9.-10. Oktober 2003 in Heidelberg

Klein A, Vogelsang H, Jahreis G: Modulation of the immune system by probiotic cultures *L. acidophilus* 74-2 and *B. species* 420

10th Symposium: Vitamins and Additives in Nutrition of Man and Animal; 28.-29. September 2005 in Jena

Klein A, Vogelsang H, Jahreis G: Influence of probiotics on immunological parameters in healthy volunteers and in patients with atopic dermatitis

3rd International Yakult Symposium: Understanding the role of probiotics in health; 13.-14. Oktober 2005 in Gent

Klein A, Vogelsang H, Jahreis G: Effect of probiotics (*L. paracasei* Lpc-37, *L. acidophilus* 74-2 and *B. species* 420) on the immune system in healthy volunteers and in patients with atopic dermatitis

14. Ernährungsfachtagung der DGE-Sektion Thüringen: Bewertung und Effizienz funktioneller Lebensmittel; 9. November 2006 in Jena

Klein A: Probiotika

44. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung; 8.-9. März 2007 in Halle-Wittenberg

Klein A, Bauer A, Kaatz M, Friedrich U, Jahreis G: Einfluss einer Intervention mit Probiotika auf das Krankheitsbild der atopischen Dermatitis

4th International Yakult Symposium: The gut, immune modulation and probiotics; 22.-23. November 2007 in Verona

Roessler A, Friedrich U, Jahreis G: Effect of a probiotic mix on the microbiota and their metabolic activity in healthy volunteers and patients with atopic dermatitis

CURRICULUM VITAE

Name	Andrea Rößler (geb. Klein)
Geburtsdatum	10.06.1976
Geburtsort	Friedrichroda
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Nationalität	deutsch
Schulbildung	
09/1983 - 07/1991	Polytechnische Oberschule Kleinschmalkalden
08/1991 – 06/1995	Staatliches Gymnasium Schmalkalden <i>Abschluss:</i> Abitur
Hochschulbildung	
10/1995 - 09/1996	Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Studiengang: Romanistik/BWL/IWK
10/1996 - 04/2001	Studium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Studiengang: Ernährungswissenschaften <i>Diplomarbeit:</i> Gehalt an Sphingomyelin, Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin in Milch und Milchprodukten unterschiedlicher Herkunft - Betrachtungen im Jahresverlauf <i>Abschluss:</i> Diplom-Trophologin
seit 05/2001	Beginn der Promotion Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Ernährungswissenschaften, Lehrstuhl Ernährungsphysiologie
02/2003-02/2004	Elternzeit
03/2007-08/2008	Elternzeit
Jena, 02. Juli 2008	

Andrea Rößler

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich auf dem Weg zur Promotion unterstützt und zu deren Gelingen beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Gerhard Jahreis, für die Überlassung dieses spannenden, vielschichtigen Themas und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit. Ich danke ihm ganz herzlich für die anregenden Diskussionen, das Vertrauen in meine Arbeit und sein Verständnis.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich meinen Kollegen und Kolleginnen vom Lehrstuhl Ernährungsphysiologie aussprechen. Es ist wirklich schön in solch freundlicher, hilfsbereiter und meist entspannter Atmosphäre zu arbeiten.

Kathrin Kuhnt und Jenny Krause danke ich ganz herzlich für ihre tatkräftige Hilfe und ihr Engagement bei der Durchführung der Humanstudien. Ute Helms und Peter Möckel sage ich Dankeschön für die Unterstützung bei den vielen Analysen des, nicht immer angenehmen, Probenmaterials. Bei Dr. Udo Friedrich möchte ich mich ganz herzlich für seine stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft beim Nachweis der probiotischen Kulturen in den Stuhlproben bedanken.

Ich danke meinen Probanden, ohne deren Durchhaltevermögen und deren Bereitschaft zur Probenabgabe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Liebe Dorit und liebe Mutti, ich kann euch gar nicht genug danken für die Zeit und Mühe, die ihr in das Korrekturlesen meiner Arbeit investiert habt. Liebe Bianka, dir danke ich für die Korrektur des englischen Teils und für die schöne Zeit in unserem gemeinsamen Büro.

Ein ganz herzliches Dankeschön möchte ich an dieser Stelle meiner Familie sagen, die immer für mich da war und ist, und mich jederzeit bei meinen Vorhaben unterstützt hat. Es ist ein schönes und beruhigendes Gefühl zu wissen, dass es euch gibt.

Meinen lieben Kindern Richard und Arthur danke ich für die wundervolle Zeit, die ich mit ihnen erleben darf und dafür, dass ein Blick in euere glücklichen Kinderaugen die Welt immer wieder gerade rückt.

Lieber Olaf, dir danke ich ganz herzlich für dein Vertrauen in mich, unsere wunderbare, kleine Familie und dafür, dass du immer da bist.