R. Barreto – H. Tajiri- F. Marotta – Y. Naito – I. Rezakovic – Y. Kato. Dept. Of pathology, Cancer Institute, Tokyo, Japan – GI Division, National Cancer Center East, Chiba, Japan – GI Service, Krankenhaus S. Anna, Como Italien – Sumitomo Memorial Hospital, Nagoya, Japan – SFJO & Labs, Paris, Frankreich.

WIEDERHERSTELLUNG DER DURCH DEN ALTERUNGSPROZESS REDUZIERTEN INTERFERONPRODUKTION UND PHAGOZYTÄREN FUNKTION MITTELS EINES PROBIOTISCHEN PRÄPARATS: EXPERIMENTELLE STUDIE

Schlüsselwörter:

Microflorana® F
Interferon
Makrophagenfunktion

Inhalt:

Zweck dieser Studie war es, festzustellen, wie ein komplexes probiotisches Präparat (Micrcroflorana-F: L. acidophilus, L. helveticus, Bifidobacterium in einer mit Ionen und Vitaminen angereicherten Lösung, Named srl, Lesmo, Italien) möglicherweise auf den mit dem Alterungsprozess verbundenen Rückgang einiger immunmodulierender Eigenschaften einwirken kann.

Methoden: *46 junge (7 Wochen alt) und 46 ältere "Swiss"-Mäuse (19 Monate alt) wurden in zwei Gruppen eingeteilt; 2 Wochen lang wurde den Mäusen oral folgendes verabreicht: A) 1ml/Tag Microflorana – F; B) wie A, aber mit durch Wärmebehandlung inaktivierten Bakterien. Nach dem Opfertod der Mäuse, nach 2, 7 und 14 Tagen, wurden die Splenozyten mit 5 Mikrogramm/ml ConA und mit 2 Mikrogramm/ml LPS stimuliert, um die Produktion von IFN-Gamma und IFN-Alpha zu testen. Die peritonealen Makrophagenanteile (10^6Zellen/ml) wurden für enzymatische Tests (LDH, Beta-Glucuronidase, Beta-Galaktosidase), Phagozytosetests (vs. 1 x 10^7 Zellen/ml S. typhi) und die O_2.-Produktion benutzt.*

Ergebnisse: *nach der Stimulierung beider Gruppen war die durch die Splenozyten angeregte IFN-Gamma und IFN-Alpha-Produktion in der Kontrollgruppe der älteren Mäuse im Vergleich zu der der jüngeren marginal ($p<0,001$).*

Microflorana-F hatte die IFN-Produktion in beiden Gruppen erheblich erhöht ($p< 0,001$; höherer Wert bei den jüngeren Mäusen im Vergleich zu den älteren: $p< 0,005$). Von grösserem Interesse war jedoch, dass während der Behandlung die IFN-Werte bei den älteren Mäusen mit dem Basiswert der jüngeren Kontrollgruppe verglichen werden konnten. Microflorana-F hatte die enzymatische Aktivität ($p< 0,05$ vs. Kontrollgruppe), die opsonisierte Phagozytose ($p<0,05$) und die O_2 - Produktion ($p< 0,01$; junge Mäuse mit den älteren Mäusen vergleichbar) erhöht.

Schlussfolgerungen: *diese Daten weisen darauf hin, dass ein wirksames probiotisches Präparat wie Microflorana-F das Immunsystem hinsichtlich der IFN-Produktion und der Makrophagenaktivität potenzieren und ebenso den mit dem Alterungsprozess verbundenen Rückgang der IFN-Produktion wieder normalisieren kann.*

In Auftrag gegeben durch:
Named Srl
Via XXV Aprile snc
20050 Lesmo – Mi
Ric. 2021/1/99

In Deutschland veröffentlicht durch
und copyright by:
Medilyn
Postfach
86946 Vilgersthofen

20L5001/2

Einführung.

Heute liegen verschiedene experimentelle und klinische Studien vor, die allgemein auf die immunmodulierende Kapazität einiger Lactobakterien hinweisen (1-6). Aus den neuesten experimentellen Arbeiten und Beobachtungen beim Menschen geht hervor, dass vor allem einige nicht-pathogene Bakterien die Interferonproduktion stimulieren und erhöhen können (7-8). In diesem Zusammenhang wurde ebenso ein Rückgang der Cytokin-Produktion bei Versuchstieren und wahrscheinlich auch beim Menschen beobachtet (9-14).
Zweck dieser experimentellen Arbeit war es, die immunstimulierende Kapazität eines neuen probiotischen Präparats (Microflorana-F. Named srl, Lesmo) zu überprüfen und, was noch von grösserem Interesse war, zu testen, ob eine regelmässige Verabreichung dieses Zusatzes den im Alterungsprozess beobachteten Rückgang der Interferonproduktion und der Kapazität des retothelialen Systems verbessern kann.

Materialien und Methoden.

Insgesamt wurden 92 "Swiss"-Mäuse in zwei Gruppen, je nach Alter, eingeteilt: 46 junge Mäuse (7 Wochen alt) und 46 ältere Mäuse (19 Monate alt).

Experimentbeschreibung.

Die beiden Hauptgruppen wurden ebenso in zwei Untergruppen eingeteilt, je nach Diätzusatz, welcher 2 Wochen lang verabreicht wurde: a) 1ml/Tag Microflorana-F (Named srl, Lesmo), probiotisches Präparat, das L. acidophilus, L.Helveticus und Bifidobacterium in einer mit Ionen und Vitaminen angereicherten Lösung enthält; b) 1ml/Tag dasselbe Präparat, aber nach Bakterieninaktivierung durch Wärmebehandlung (15 min bei 90°). Ausserdem wurde eine Gruppe von 20 Mäusen (10 ältere und 10 junge Mäuse) berücksichtigt, die für eine weitere Kontrolle keiner spezifischen Behandlung unterzogen wurde. Die Tiere wurden mittels zervikaler Dislokation nach 2, 7 und 14 Tagen nach Beginn der Behandlung geopfert.
Danach wurden sofort die peritonealen Makrophagen gesammelt und isoliert, wobei folgende enzymatische Aktivitäten beobachtet wurden: Lactat-Dehydrogenase, β-Glucuronidase (15) und β-Galaktosidase (16). Für den Phagozytose-Test "in vitro" wurde Salmonella tiphy benutzt(17).
Die Makrophagenproduktion der Superoxyd-Anionen wurde mittels der Chemolumineszenz-Methode definiert (18,19).
Nachdem die peritonealen Makrophagen gesammelt worden waren, wurde mittels steriler Methodik schnell di Milz entfernt und in RPMI 1640 zermalmt, um die Splenozyten zu isolieren. Wie bereits beschrieben (20), wurden die Splenozyten mit 5µg/ml Concavalina-A, 72h lang bei 37°, und mit 2µg/ml Polysaccharide, 24h lang bei 26°C, stimuliert.

Interferon-Dosierung.

Diese wurde mittels des Tests der zytopathischen Hemmung in Kulturen von L-929-Mäusezellen durchgeführt, wie bereits von Wietzerbin und anderen. (21) beschrieben wurde, wobei man jedes Mal den dafür angemessenen IFN-Alpha und IFN-Gamma-Standard anwendete. Alle Tests wurden dreimal ausgeführt. Der IFN-Titer wurde als internationale Bezugseinheit in ml ausgedrückt; dieser Kehrwert der Maximalverdünnung der Probe kann 50% Zellenschutz gewährleisten.

Ergebnisse.

Keines der Versuchstiere hat während der Studie Anzeichen von Magen-Darmbeschwerden aufgewiesen, wie z.B. Diarrhoea, Vomitus oder verringerte Nahrungsaufnahme. Das Körpergewicht der Tiere hat sich, was die verschiedenen diätetischen Zusätze betrifft, nicht signifikant verändert.

Enzymatische Makrophagentests.

Statistisch gesehen hat keines der Makrophagenenzyme zu Beginn der Studie bedeutsame Unterschiede zwischen den beiden Gruppen der älteren und jüngeren Mäuse aufgewiesen. Im Gegensatz dazu, hat die Behandlung mit Microflorana-F eine signifikante Erhöhung ($p<0.05$ vs inaktiviertes probiotisches Präparat und vs. Normaldiät) sowohl der β-Glucoronidase als auch der β-Galaktosidase (Tabelle 1) mit sich gebracht.
Diese zwischen den beiden Mäusegruppen vergleichbare Erhöhung erreichte einen Spitzenwert am siebten Tag.

TABELLE 1

ENZYMATISCHE MAKROPHAGEN-TESTS: WIRKUNG VON MICROFLORANA
(durchschnittliche enzymatische Aktivität ± SD)

BEHANDLUNG	Lactat-Dehydrogenase nmal NADPH oxydiert/min/106 Zellen		ß-Glucoronidase nmal PNP/ h /106 Zellen		ß-Galactosidase nmal ONF/ h /106 Zellen	
	JUNG	ALT	JUNG	ALT	JUNG	ALT
STANDARDDIÄT	0,032 ± 0,004	0,028 ± 0,003	9,3 ± 0,7	9,2 ± 0,9	18,3 ± 5,9	19,2 ± 6,4
PLUS MICROFLORANA	0,041 ± 0,009	0,029 ± 0,006	22,7 ± 1,3 *	23,2 ± 1,1 *	46,2 ± 9,3 *	48,4 ± 7,8 *
PLUS INAKTIVIERTES PROBIOTISCHES PRÄPARAT	0,037 ± 0,007	0,034 ± 0,005	10,2 ± 1,9	10,3 ± 1,4	17,4 ± 6,2	18,8 ± 4,9

** P< 0,05 vs. Standarddiät und inaktiviertes probiotisches Präparat*

Messungen am 7. Tag der Beobachtungszeit
Siehe Text für Details.

Phagozytosetest in vitro.

Eine signifikante Erhöhung, bei einem ähnlichen Spitzenwert am siebten Tag, wurde bei der Phagozytose "in vitro" der opsonisierten S. tiphi - Form während der Behandlung mit Microflorana-F ($p<0.01$ vs inaktiviertem probiotischen Präparat und Normaldiät, Tabelle 2) beobachtet.

TABELLE 2

PHAGOZYTOSE-TEST "IN VITRO": PHAGOZYTOSE-ANTEILE VON PERITONEALEN MAKROPHAGEN GEGENÜBER SALMONELLA TYPHI (DURCHSCHNITT ± S.D.)

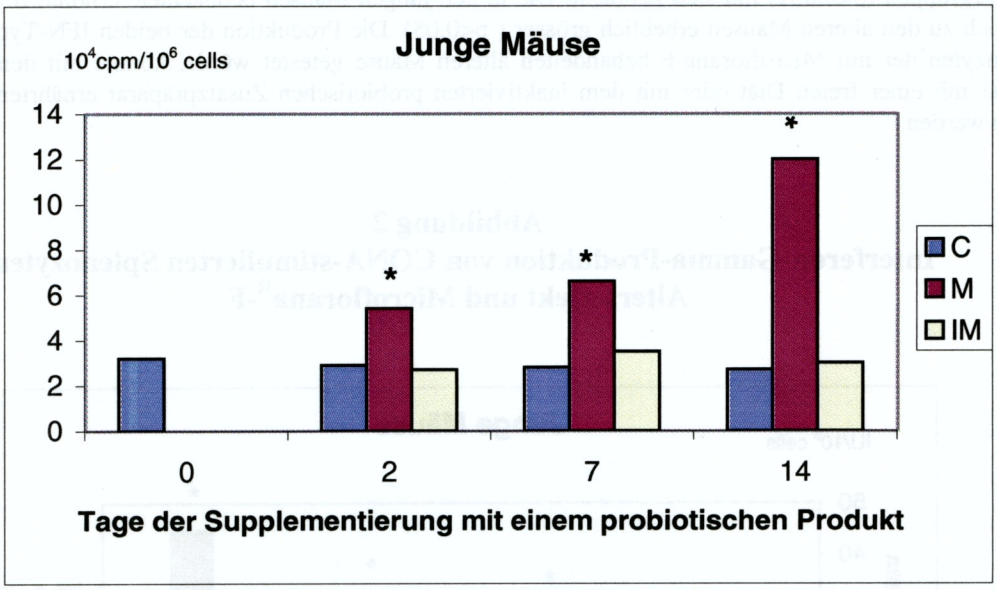
	% PHAGOZYTOSE Fütterungs-tag					
	3		7		14	
BEHANDLUNG	Jung	alt	jung	alt	jung	Alt
Standarddät	33 ± 4	28 ± 5	31 ± 3	32 ± 6	29 ± 3	29 ± 2
plus MICROFLORANA	54 ± 4*	50 ± 3*	63 ± 6*	59 ± 4*	42 ± 5*	44 ± 2*
plus inaktiviertes probiotisches Präparat	27 ± 4	32 ± 3	30 ± 3	33 ± 5	32 ± 4	33 ± 3

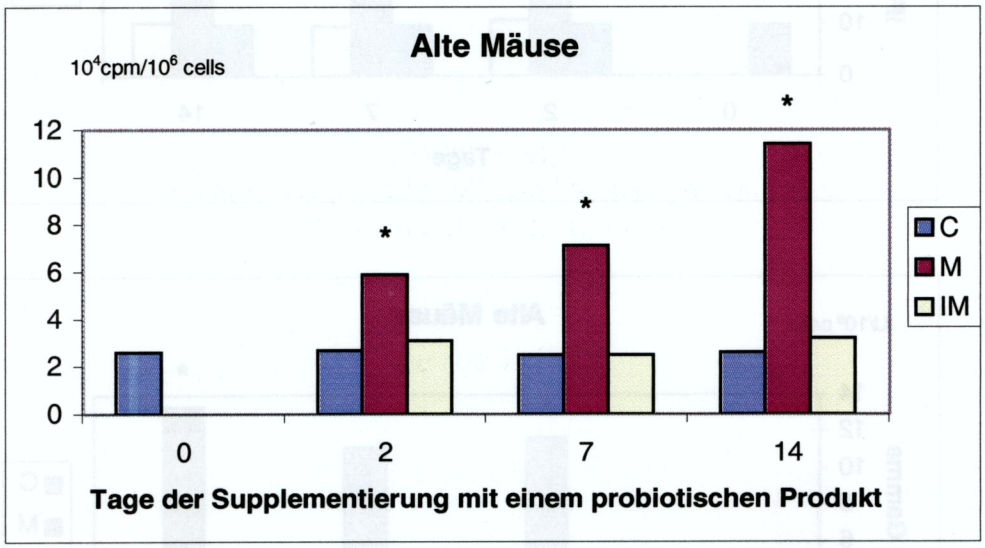
***p < 0,01 vs. Standarddiät und inaktiviertes probiotisches Präparat**
Inkubation mit opsonierter S. typhi,
15 min bei 37°C

Makrophagenproduktion von Superoxyd-Anionen.

Zu Beginn der Studie hat die Generierung von Superoxyd-Anionen, wenn auch nicht auf signifikante Weise, eine Tendenz zu einer geringeren Effizienz in der Gruppe der älteren Mäuse im Vergleich zu der der jüngeren ($p<0.05$ Abbildung 1) aufgewiesen. Die Behandlung mit Microflorana-F hat, im Gegensatz zu den Beobachtungen, die bei der Anwendung desselben inaktivierten probiotischen Präparats oder einer freien Diät angestellt wurden, eine bemerkenswerte, mit der Zeit verbundene Steigerung der Produktion von Superoxyd-Anionen mit sich gebracht, wobei am 14. Beobachtungstag der Spitzenwert erreicht wurde ($p<0.05$).

Abbildung 1
Makrophagenproduktion von Superoxyd-Anionen:
Effekt von Microflorana^{R}-F



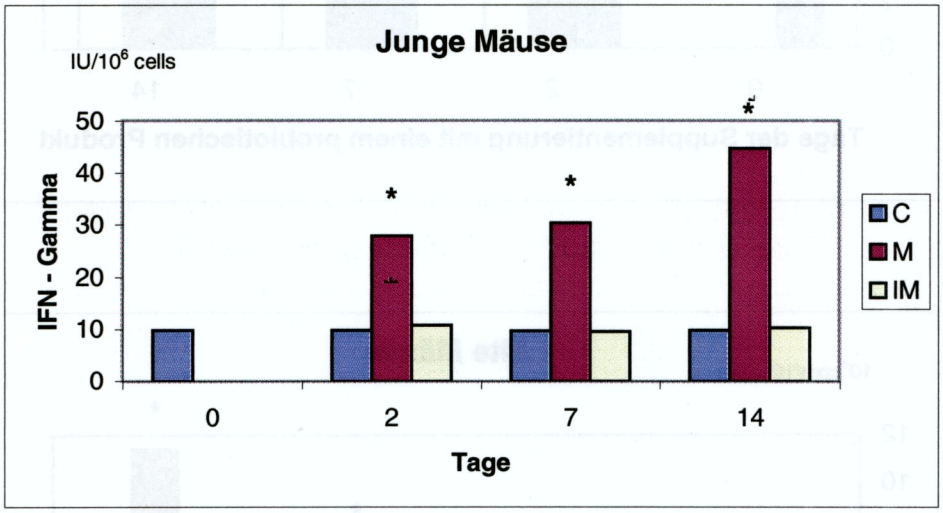


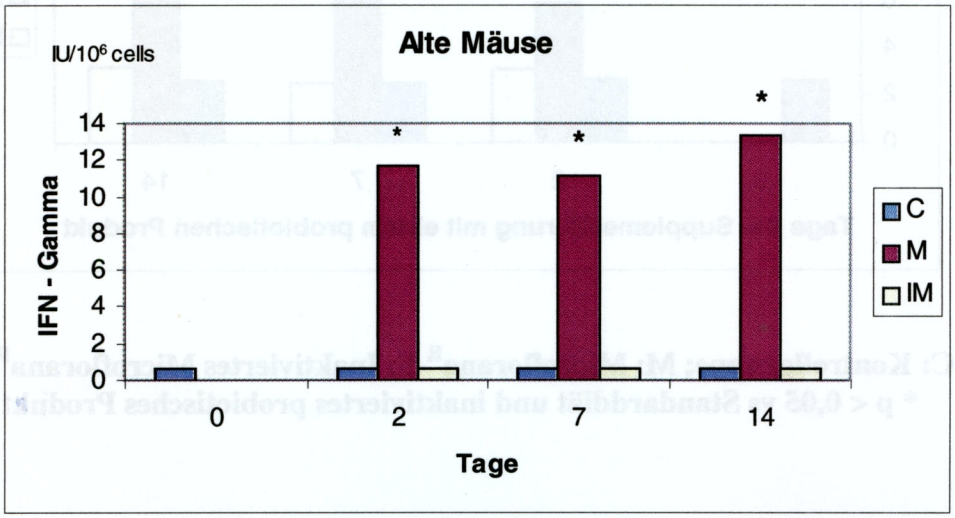
C: Kontrollgruppe; M: Microflorana^{R}-F; Inaktiviertes Microflorana^{R}-F
*** $p < 0{,}05$ vs Standarddiät und inaktiviertes probiotisches Produkt**

Interferonproduktion.

Sowohl die IFN-α- als auch die IFN-γ-Produktion durch die von den älteren Mäusen erhaltenen Splenozyten war völlig marginal im Vergleich zu den Beobachtungen bei den jungen Mäusen ($p<0.001$, Abbildung 2 e 3). Die Behandlung mit aktivem Microflorana-F hat hinsichtlich der Basiswerte eine erheblich gesteigerte Produktion der beiden IFN-Typen in allen Mäusegruppen ($p<0.001$) mit sich gebracht. Die in den jungen Mäusen beobachtete erhöhte IFN-Produktion war im Vergleich zu den älteren Mäusen erheblich grösser ($p<0.05$). Die Produktion der beiden IFN-Typen, welche durch die Splenozyten der mit Microflorana-F behandelten älteren Mäuse getestet wurde, konnte mit den Basiswerten der Gruppe der mit einer freien Diät oder mit dem inaktivierten probiotischen Zusatzpräparat ernährten jüngeren Mäuse verglichen werden.

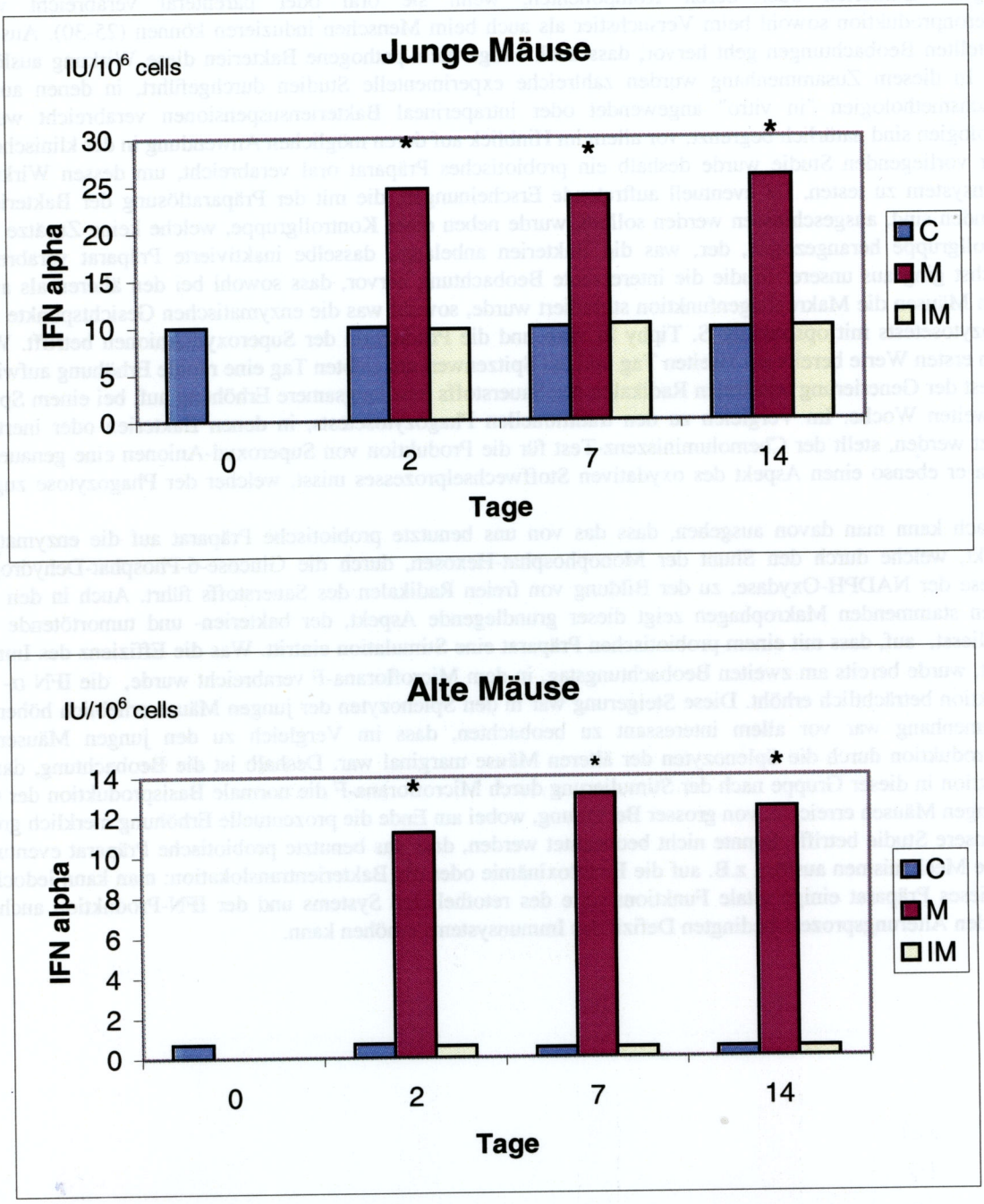
Abbildung 2
Interferon-Gamma-Produktion von CONA-stimulierten Splenozyten: Alterseffekt und Microflorana^R-F





*** p < 0,001 vs Basiswerte und inaktiviertes probiotisches Produkt, siehe Text für Details siehe vorherige Abbildung 1 für Abkürzungen**

Abbildung 3
Interferon-Alpha-Produktion von LPS-stimulierten Splenozyten: Alterseffekt und Microflorana^{R}-F



*** p < 0,001 vs Basiswerte und inaktiviertes probiotisches Produkt, siehe Text für Details**
siehe vorherige Abbildung 1 für Abkürzungen

Erörterung

Experimentelle und klinische Beobachtungen weisen darauf hin, dass der Alterungsprozess unvermeidlich mit einer sich reduzierenden Effizienz des Immunsystems einhergeht (22). Im Rahmen der physiopathologischen Erscheinungen und der daraus hervorgehenden Insuffizienz weisen während des Alterungsprozesses zahlreiche Anzeichen auf eine reduzierte Cytokin-Produktion hin, darunter auch die Interferone (14, 23, 24). Dabei wurde angeführt, dass zahlreiche pathogene Bakterien oder deren Komponenten, wenn sie oral oder parenteral verabreicht werden, die Interferonproduktion sowohl beim Versuchstier als auch beim Menschen induzieren können (25-30). Aus vor kurzem angestellten Beobachtungen geht hervor, dass auch einige nicht-pathogene Bakterien diese Wirkung auslösen können (7,8). In diesem Zusammenhang wurden zahlreiche experimentelle Studien durchgeführt, in denen ausschliesslich Versuchsmethologien "in vitro" angewendet oder intraperineal Bakteriensuspensionen verabreicht wurden; diese Methologien sind natürlich begrenzt, vor allem im Hinblick auf deren möglichen Anwendung in der klinischen Praxis.
In der vorliegenden Studie wurde deshalb ein probiotisches Präparat oral verabreicht, um dessen Wirkung auf das Immunsystem zu testen. Da eventuell auftretende Erscheinungen, die mit der Präparatlösung der Bakteriensupension verbunden sind, ausgeschlossen werden sollten, wurde neben einer Kontrollgruppe, welche keine Zusätze erhielt, eine Kontrollgruppe herangezogen, der, was die Bakterien anbelangt, dasselbe inaktivierte Präparat verabreicht wurde. Zunächst ging aus unserer Studie die interessante Beobachtung hervor, dass sowohl bei den älteren als auch bei den jungen Mäusen die Makrophagenfunktion stimuliert wurde, sowohl was die enzymatischen Gesichtspunkte als auch die Phagozytosetests mit opsonierter S. Tiphy in vitro und die Produktion der Superoxyd-Anionen betrifft. Während die beiden ersten Werte bereits am zweiten Tag und bei Spitzenwert am siebten Tag eine rapide Erhöhung aufwiesen, zeigte der Test der Generierung von freien Radikalen des Sauerstoffs eine langsamere Erhöhung auf, bei einem Spitzenwert in der zweiten Woche. Im Vergleich zu den traditionellen Phagozytosetests, in denen Bakterien oder inertes Material benutzt werden, stellt der Chemoluminiszenz-Test für die Produktion von Superoxyd-Anionen eine genauere Methode dar, da er ebenso einen Aspekt des oxydativen Stoffwechselprozesses misst, welcher der Phagozytose zugrunde liegt (31).
Demnach kann man davon ausgehen, dass das von uns benutzte probiotische Präparat auf die enzymatische Kette einwirkt, welche durch den Shunt der Monophosphat-Hexosen, durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Synthese der NADPH-Oxydase, zu der Bildung von freien Radikalen des Sauerstoffs führt. Auch in den von älteren Mäusen stammenden Makrophagen zeigt dieser grundlegende Aspekt, der bakterien- und tumortötende Funktionen einschliesst, auf, dass mit einem probiotischen Präparat eine Stimulation eintritt. Was die Effizienz des Immunsystems betrifft, wurde bereits am zweiten Beobachtungstag, in dem Microflorana-F verabreicht wurde, die IFN α- und IFN γ-Produktion beträchtlich erhöht. Diese Steigerung war in den Splenozyten der jungen Mäuse erheblich höher. In diesem Zusammenhang war vor allem interessant zu beobachten, dass im Vergleich zu den jungen Mäusen die IFN-Basisproduktion durch die Splenozyten der älteren Mäuse marginal war. Deshalb ist die Beobachtung, dass die IFN-Produktion in dieser Gruppe nach der Stimulierung durch Microflorana-F die normale Basisproduktion der Gruppe mit den jungen Mäusen erreichte, von grosser Bedeutung, wobei am Ende die prozentuelle Erhöhung merklich grösser war.
Was unsere Studie betrifft, konnte nicht beobachtet werden, dass das benutzte probiotische Präparat eventuell indirekt gewisse Mechanismen auslöst, z.B. auf die Endotoxinämie oder die Bakterientranslokation; man kann jedoch festlegen, dass dieses Präparat einige vitale Funktionswerte des retothelialen Systems und der IFN-Produktion auch bei einem durch den Alterungsprozess bedingten Defizit des Immunsystems erhöhen kann.

Bibliographie:

1) Nanno M, Shimizu-Takeda T, Mike A, Ohwaki M, Togashi Y, Suzuki R, Kumagai K, Mutai M. Increased production of cytotoxic macrophage progenitors by Lactobacillus casei in mice. J Leukoc Biol 1989; 46: 89-95.

2) Sato K, Saito H, Tomioka H. Enhancement of host resistance against Listeria infection by Lactobacillus casei: activation of liver macrophages and peritoneal macrophages by Lactobacillus casei. Microbiol Immunol 1988; 32: 689-698.

3) Ruiz Holgado AP. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus. Immunology 1988; 63: 17-23.

4) Solis-Pereyra B, Aattouri N, Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. Am J Clin Nutr 1997; 66: 521S- 525S.

5) Wheeler JG, Shema SJ, Bogle ML, Shirrell MA, Burks AW, Pittler A, Helm RM. Immune and clinical impact of Lactobacillus acidophilus on asthma. Ann Allergy Asthma Immunol 1997; 79:229-233.

6) Conge GA, Gouache P, Desormeau-Bedot JP, Looisillier F, Lemonnier D. Effects comparès d'un regime enrichi en yoghourt vivant ou thermisè, sur le système immunitaire de la souris. Repr Nutr Dev 1980; 20: 929-937.

7) Solis Pereyra B, Falcoff R, Falcoff E, Lemonnier D. Interferon induction by Lactobacillus bulgaricus and Streptococcus thermophilus in mice. Eur Cytokine Net 1991; 2: 299-303.

8) Kishi A, Uno K, Matsubara Y, Okuda C, Kishida T. Effect of the oral administration of Lactobacillus Brevis Subsp. Coagulans on Interferon-α producing capacity in humans. J Am Coll Nutr 1996; 15: 408-412.

9) Miller RA, Stutman O. Decline in aging mice of the anti-2,4,6 trinitrophenyl cytotoxic T cell response attributable in loss of Lyt-2, interleukin-2 producing helper cell function. Eur J Immunol 1981; 11: 751-756.

10) Thoman ML, Weigle WO. Lymphokines and ageing: interleukin-2 production and activity in aged animals. J Immunol 1981; 127: 2102-2106.

11) Bruley-Rosset M, Vergnon I. Interleukin-1 synthesis and activity in aged mice. Mech Ageing Dev 1984; 24: 247-254.

12) Inamizu T, Chang MP, Makinodan T. Influence of age on the production and regulation of interleukin-1 in mice. Immunology 1985; 55: 447-455.

13) Sauder DN, Ponnappan U, Cinader B. Effect of age on cutaneous interleukin 1 expression. Immunol Lett 1989; 20:111-114.

14) Grasso G, Muscettola M, Stecconi R, Muzzioli M, Fabris N. Restorative effect of thymomodulin and zinc on interferon-gamma production in aged mice. Ann NY Acad Sci 1992; 673:256-259.

15) Stossel TP. Phagocytosis. In: Manual of Clinical Immunology (eds. N. Rose and H. Friedman), 2nd edn, pp. 313.315. Am Soc Microbiol, Washington DC, USA.

16) Conchie J, Findlay J, Levvy G. Mammalian glycosidases. Distribution in the bosy. Biochem 1959; 71: 318-322.

17) Perdigon G, Nader de Macias ME, Alvarez S, Oliver G, Pesce e Ruiz Holgado AA. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. Infect Imm 1986; 53: 404-410.

18) Sugioka K, Nakano M, Kurashige S, Akuzawa Y, Goto T. A chemiluminescent probe with Cipridina luciferin analog 2-methyl-6-phenyl-3,7-dehydroimidazol (1,2-a) pyrazin-3-one, specific and sensitive 02 production in phagocytizing macrohages. FEBS Lett 1986; 197: 27-30.

19) Marotta F, Kimura H, Hayakawa K, Nakamura T, Ono K, Barbi G. Patients with chronic pancreatitis have an impaired oxidative burst ability of blood monocytes. Pathophysiology 1994; 1:235-239.

20) Cembrynska-Nowak M. Interferons from mouse lymphocytes produced at various temperatures (26C and 37C). Arch Immunol Ther Exp 1986; 34: 525-532.

21) Wietzerbin J, Kolb JP, Senik A, Der Stepani L, Andreu G, Falcoff E, Falcoff R. Studies on purification of human gamma interferon chromatografic behavior of accompanying IL-2 and B cell helper activity. J IFN Res 1984; 4:141-152.

22) Miller RA. Aging and immune function. Int Rev Cytol 1991; 124: 187-215.

23) De Mayer E, De Mayer-Guignard J. Influence of animal genotype and age on the amount of circulating interferon induced by Newcastle disease virus. J Gen Virol 1968; 24: 133-136.

24) Blach-olszewska Z, Cembrynska- Nowak M, Kwasniewska E. Age-related synthesis of spontaneous interferon in Balb-c mice. Contr Oncol 1984; 20: 224-232.

25) Stinebring Wr, Youngner JS. Patterns of interferon appearance in mice injected with bacteria or bacterial endotoxin. Nature 1964; 204: 712.

26) Hirt H, Schwenteck M, Becker H, Hirchner H. Interferon production and lymphocyte stimulation in human leukocyte cultures stimulated by Corinebacterium parvum. Clin Exp Immunol 1978; 32: 471-476.

27) Barot CR, Wietzerbin J, Petit JF, Chedid L, Falcoff E, Leadered E, Induction of interferon synthesis in mice by fractions from Nocardia. Infect Imm 1978; 19: 353-356.

28) Ronnblom L, Forsgren A, Alm GV. Characterization of interferons induced by bacteria and interferon producing leukocytes in human peripheral blood. Infect Imm 1983; 40: 126-132.

29) Merlin G, Vanderhoven C, Stefanos S, Wietzerbin J, Girard JP, Page Y, Falcoff E. Evidence for interferon induction in mice and humans by a fraction of bacterial extracts in vitro and after oral administration in vivo. Antiviral Res 1985; 161-166.

30) Klimpel GR, Niesel DW, Asuncion M, Klimpel KD. Natural killer cell activation and interferon production by peripheral blood leukocytes after exposure to bacteria. Infect Imm 1988; 56: 1436-1441.

31) Blebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagovytes. Ann Intern Med 1980; 93: 480-489.