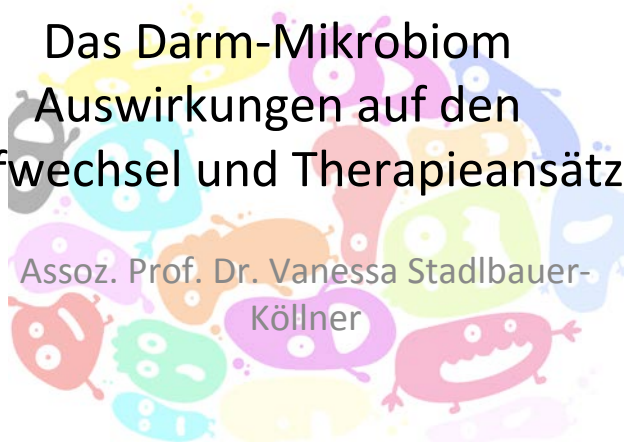


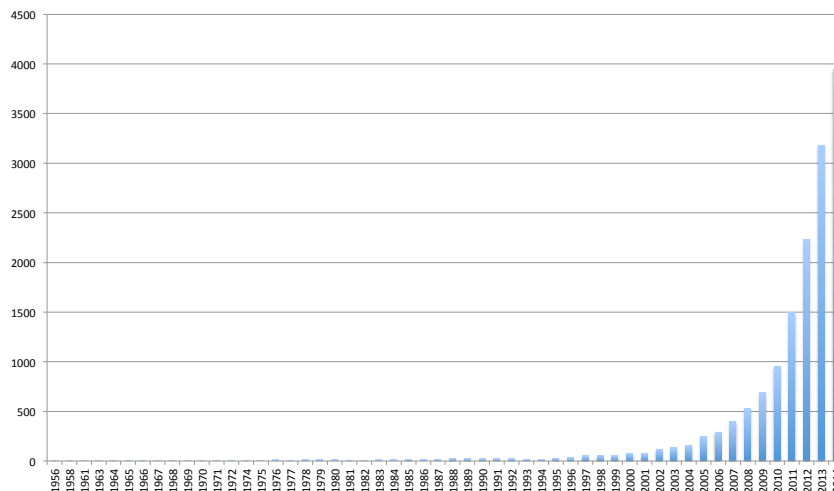


Das Darm-Mikrobiom Auswirkungen auf den Stoffwechsel und Therapieansätze

Assoz. Prof. Dr. Vanessa Stadlbauer-
Köllner



Pubmed “Microbiome”



Inhalt

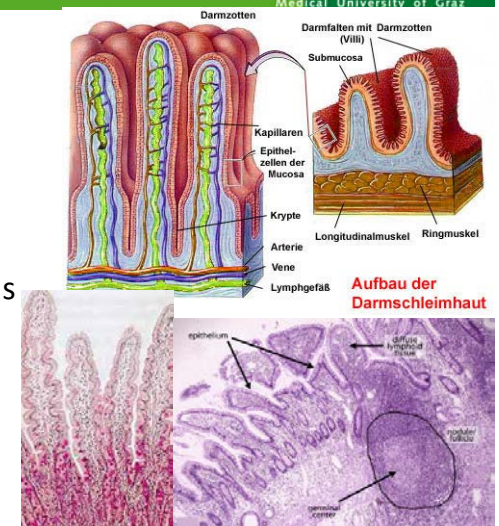


- Darm-Mikrobiom
- Probiotika
- Erkrankungen
 - Adipositas – metabolisches Syndrom – Steatose/Steatohepatitis
 - Leberzirrhose

Organ der Superlative



- Darm ist das größte Organ – 200-400 m² Oberfläche
- Größte Immunorgan
30-70% der Immunzellen im Darm
- 4-5x mehr Neuronen als im Rückenmark (100 Millionen)

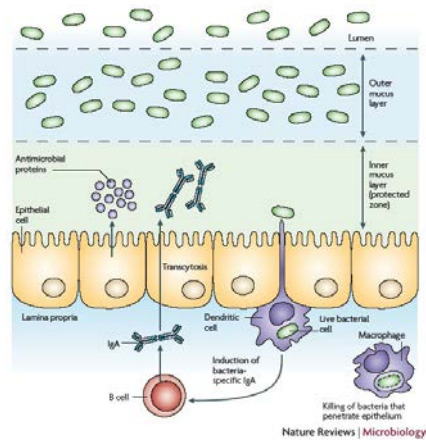


Darmbarriere



Medical University of Graz

- Mikrobiom
- Schleimschicht
- Antimikrobielle Proteine
- IgA
- Tight Junctions
- Immunzellen



www.nature.com

Bakterielle „Mitbewohner“



Medical University of Graz

Mund
(ca. 10^{11} Keime)

Bakterienarten
Streptokokken
Veillonellen
Aktinomyzeten
Porphyromonas
Fusobakterien
Eubacterium
Prevotella

Magen und Zwölffingerdarm
(10^1 – 10^3 Keime)

Laktobazillen
Streptokokken
Hefen

Dünndarm
(10^4 – 10^8 Keime)

Laktobazillen
Klostridien
Streptokokken
Bacteroides
Bifidobakterien
Fusobakterien

Dickdarm
(10^{10} – 10^{12} Keime)

Bacteroides
Bifidobakterien
Streptokokken
Eubacterium
Fusobakterien

Klostridien
Clostridien
Veillonellen
Laktobazillen
Proteus

Staphylokokken
Pseudomonaden
Hefen / Protozoen

Mikrobiom

- 10x mehr Bakterien als menschliche Zellen
- 100 Billionen Bakterien (10^{14})
- Mehr als 1000 Spezies
- ohne Bakterien Leben unmöglich
- Großteil nicht pathogen

Bakterielle „Mitbewohner“



Medical University of Graz

Heart

Brain

Probiotics

Liver



0.8 lbs.

3 lbs.

3.5 lbs.

4 lbs.

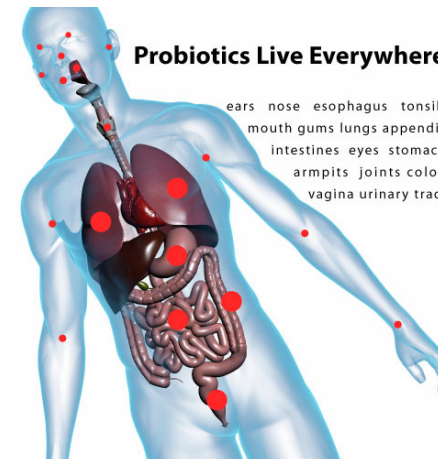
www.probiotics.org

Bakterielle „Mitbewohner“



Medical University of Graz

Probiotics Live Everywhere



www.probiotics.org

Analysemethoden



Medical University of Graz

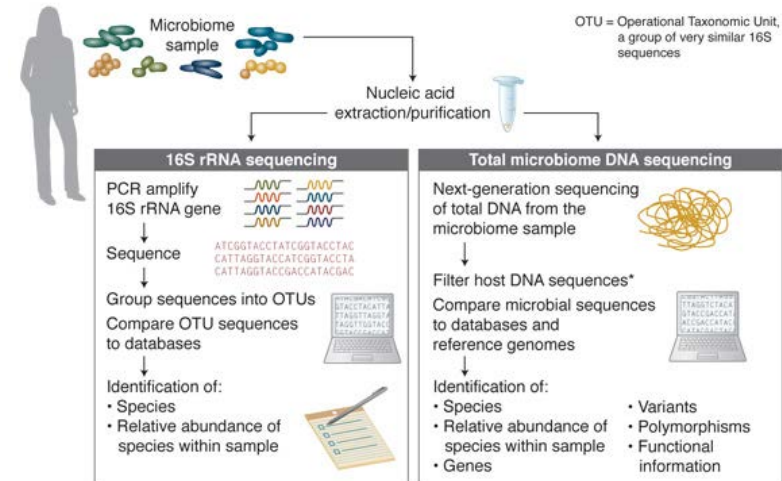
- Isolation und Kultur
 - nicht kultivierbare Keime
 - keine Quantifizierbarkeit
 - langwierig, ressourcenaufwendig
 - nicht automatisierbar



Analysemethoden



Medical University of Graz



Entwicklung



Medical University of Graz

- Alter
- Geschlecht
- Ernährung
- Aufenthaltort
- Antibiotikagabe

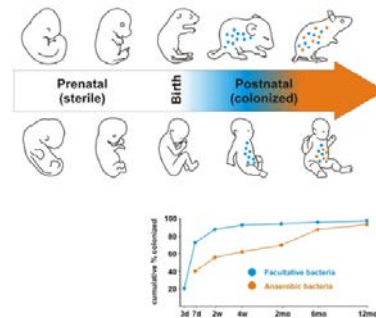


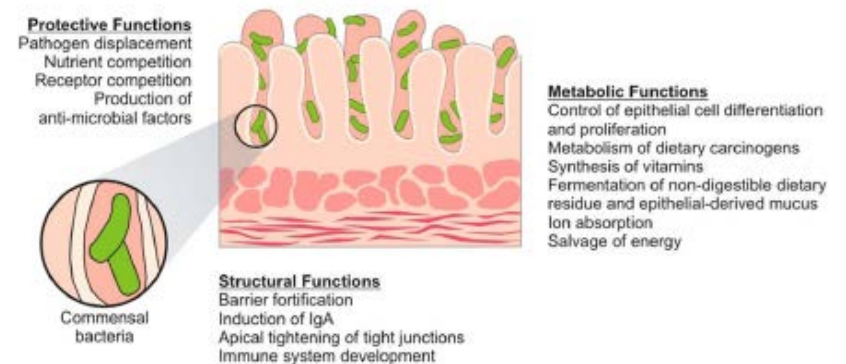
FIGURE 1 | Development of the microbiome in early life. Subsequent to the sterile uterine environment, colonization begins at birth with facultative bacteria (blue) colonizing the GIT immediately. The anaerobic bacteria colonize later (orange). By 1 year of age the microbiome has a stable adult-like signature. Rodents follow a similar colonization pattern to humans and this forms the rationale for the use of germ free animals to study the impact of the microbiota.

(Grenham 2011)

Aufgaben Mikrobiom - Barriere



Medical University of Graz



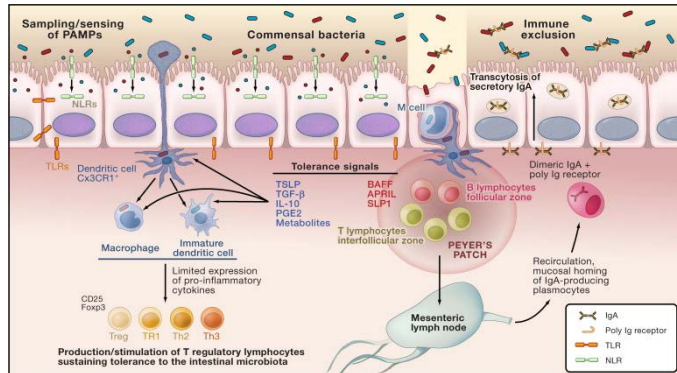
(Grenham 2011)

Aufgaben Mikrobiom - Immunsystem



Medical University of Graz

- „Trainingslager“ für Immunzellen
- Balance zwischen Inflammation und Toleranz

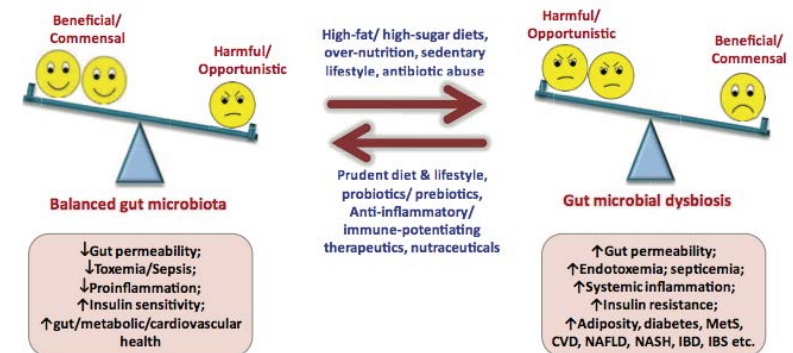


(Sansonetti 2009)

Dysbiose



Medical University of Graz



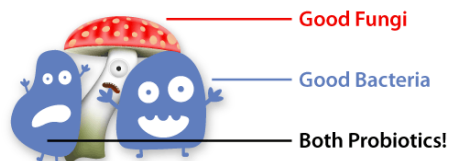
(Nagpal 2014)

Definitionen



Medical University of Graz

- Probiotika „lebende Mikroorganismen, die, in ausreichender Menge konsumiert, einen gesundheitsfördernden Effekt haben“
- Präbiotika: Substanzen, die eine wachstumsfördernde Wirkung auf bereits im Darm vorhandene Bakterien haben (zB Oligofruktosaccharide)
- Synbiotika: Kombination auf Prä – und Probiotikum

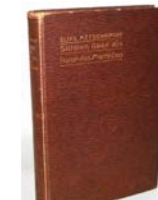
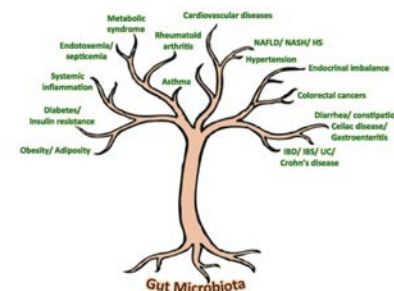


Probiotika



Medical University of Graz

- Meistens von gesunden Menschen isoliert
- Wirksamkeit bei unterschiedlichsten Erkrankungen untersucht

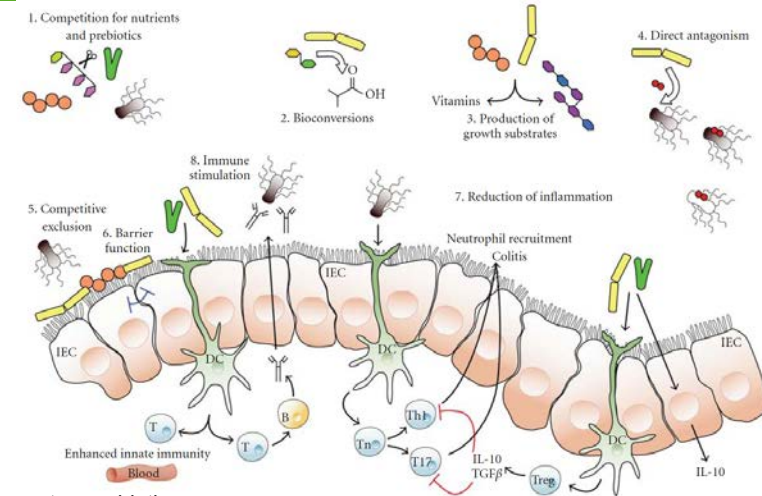


Eigenschaften

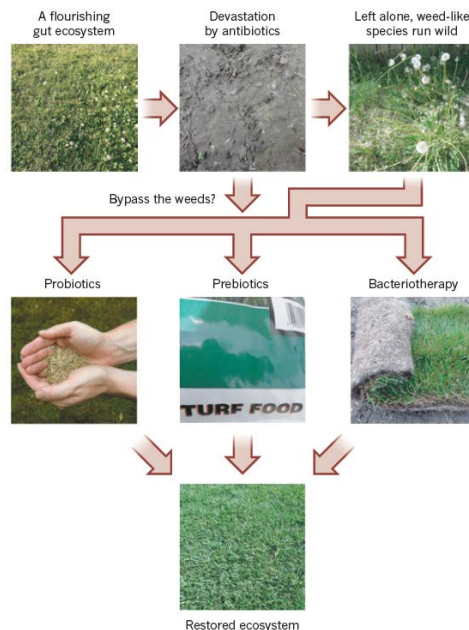
- Darmpassage überleben (Säure- und Enzymresistent)
- Ausreichende Anzahl
- Mucosa-Adhärenz
- Keine/wenig Nebenwirkungen
- Resistent gegen andere pathogene Keime
- Genetisch stabil



Wie wirken Probiotika?



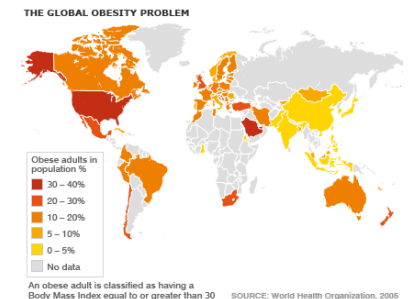
www.customprobiotics.com



(Nature, Sept 2012)

Adipositas

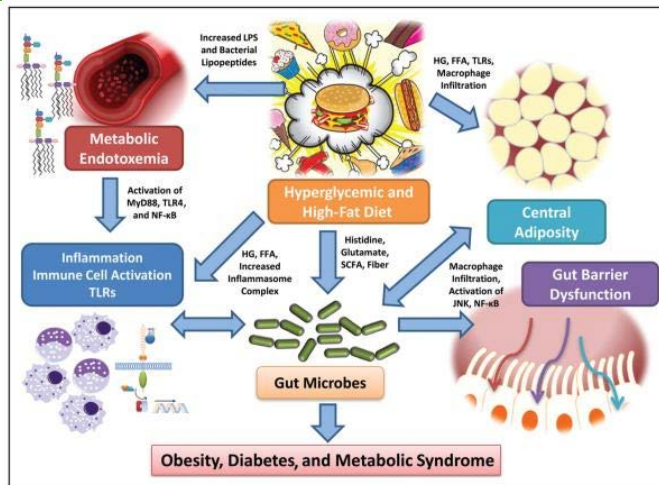
- Pandemie
 - 300 Millionen Menschen weltweit
 - 155 Millionen Kinder weltweit
 - Starker Anstieg in Schwellenländern
 - In Österreich 11% der Bevölkerung
 - Lebenserwartung bei 40-jährigen um 7 Jahre verringert
- enge Assoziation mit metabolischem Syndrom



Missing link: Darmflora?



Medical University of Graz

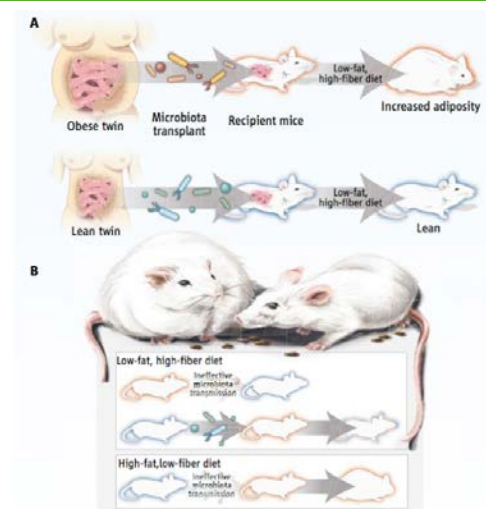


(Devaraj 2013)

Adipositas: eine Infektionskrankheit?



Medical University of Graz

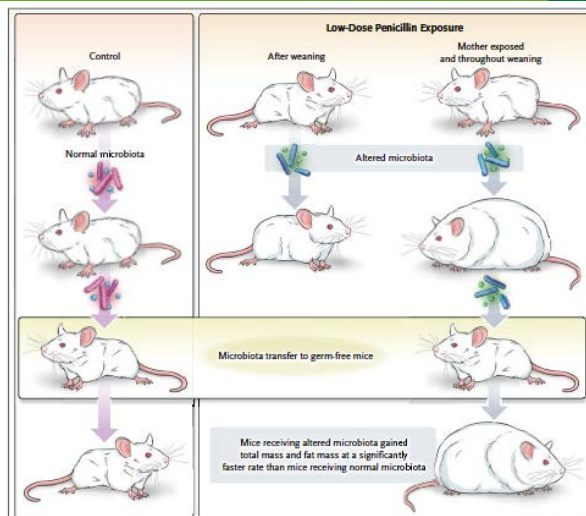


(Ridaura 2013)

Darmflora und Adipositas



Medical University of Graz



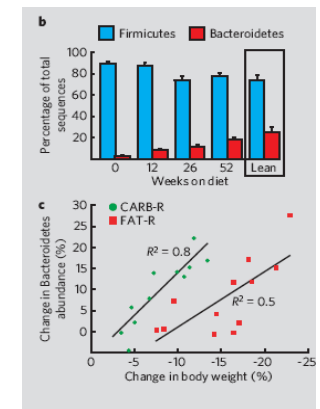
(Cox 2014)

Darmflora und Adipositas



Medical University of Graz

- Unterschiede in der Zusammensetzung der Darmflora (Backhed 2005)
 - verminderte Diversität
 - relativer Mangel an Bacteroidetes und Überschuß an Firmicutes
 - Diät steigert Anzahl an Bacteroidetes und vermindert Firmicutes (Ley 2006)
- Bakterien helfen dabei, die Energie aus der Nahrung zu extrahieren (Backhed 2004 +2007, Turnbaugh 2006)

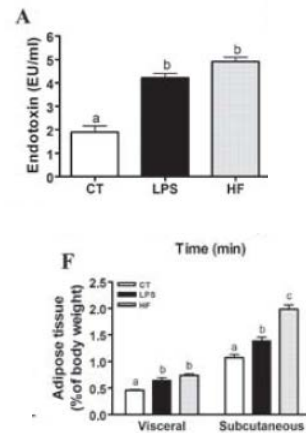


Darmpermeabilität und Endotoxin



Medical University of Graz

- Fettreiche Diät
 - erhöht Darmpermeabilität (Cani 2008, Volynets 2011)
 - „metabolic endotoxemia“ (Cani 2007, Creely 2007, Dixon 2008)
- Chronisch erhöhte Endotoxin-Spiegel führen zu Gewichtszunahme und Insulinresistenz (Cani 2007)
- Prebiotika senken Darmpermeabilität – GLP-2 mediert (Cani 2009)

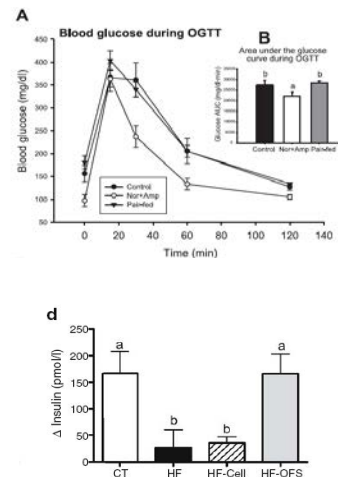


Modulation der Darmflora



Medical University of Graz

- Antibiotische Therapie
 - verbessert Insulinresistenz (Membrez 2008, Cani 2008)
 - Änderung der Genexpression
 - Entzündung
 - Stoffwechsel
- Prä- und Probiotika
 - Verbesserte Glukosetoleranz und Insulinsekretion (Cani 2008)
 - Vermindert hepatische Insulinresistenz und Entzündungsreaktion (Li 2003)



Fruktose



Medical University of Graz

- Fruktosekonsum steigend – HFCS
- Fruktose zu 100% beim first-pass aus Pfortaderblut extrahiert – oxidiert – Lipogenese oder Glykogensynthese
- keine Insulinproduktion – keine Leptinausschüttung
- Fiaf reduziert – Lipoproteinlipase nicht inhibiert – FFA steigen an
- Endotoxinämie - Steatose

Compound	Microbial species
Fructose	Lactic acid bacteria, <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Faecalibacterium</i>
Sorbitol	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>
Mannitol	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>
Xylitol	Generally unfavourable for microbial metabolism; Metabolism by some <i>Streptococcus mutans</i> sp.
Artificial sweetener: aspartame	<i>Streptococcus mutans</i>
Stevioside	<i>Bacteroides</i>
D- Psicose	<i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Ruminococcus</i>
D-Tagatose	<i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , Lactic acid bacteria

Studie an der Meduni Graz



Medical University of Graz

- Hypothese: *Lactobacillus casei* Shirota verbessert Immunfunktion und Insulinresistenz bei Patienten mit metabolischem Syndrom durch Modulation der Darmpermeabilität und/oder Darmflora
- 30 Patienten mit metabolischem Syndrom
- LcS für 12 Wochen

Ergebnisse



Medical University of Graz

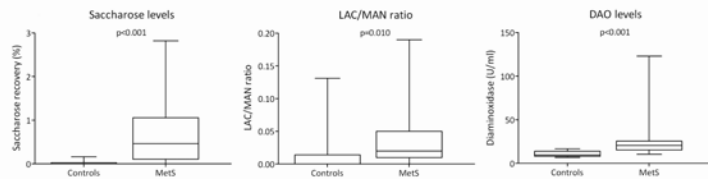


Figure 1: Gut permeability in patients with metabolic syndrome and controls.
Recovery of saccharose (gastroduodenal permeability) and lactulose/mannitol (LAC/MAN) ratio (small intestinal permeability) as well as diaminoxidase levels in serum are significantly increased in patients with metabolic syndrome (MetS) compared to healthy controls.

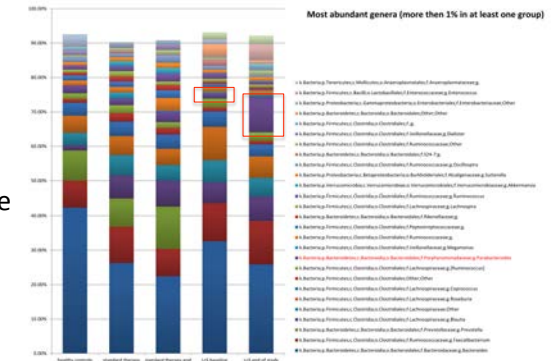
- Keine Unterschiede zwischen Standardtherapie und Probiotikagruppe, keine Änderung über die Zeit

Ergebnisse



Medical University of Graz

- kein Effekt auf
 - Glukosestoffwechsel
 - Fettstoffwechsel
 - Inflammation
 - Immundefunktion
- Anstieg von CRP in der Probiotikagruppe
- fettreiche Diät mit veränderten Gallensäureprofil assoziiert
- Anstieg von *Parabacteroides* durch *LcS*



Nichtalkoholische Fettleber (NAFLD)



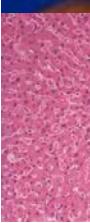
Medical University of Graz

- Betrifft bis zu ¼ der Bevölkerung (Lonardo 1999; Angulo 2002; Clark 2006)
- Spektrum von Fettleber, Fettleber-hepatitis (NASH), Fibrose, Zirrhose, hepatozelluläres Karzinom (Angulo 2002; Neuschwander-T 2003; Liou 2006)
- Assoziiert mit **metabolischen Syndrom**, Zöliakie, selten durch Toxine, gastro-jejunalen Bypass (Burt 1998; Angulo 2002; Chitturi 2002; Younossi 2002)
- Natürliche Verlauf
 - NAFLD benigne
 - NASH – bis zu 1/3 Zirrhose (Angulo 1999; Ratzl 2000; Dixon 2001; Day 2006)

Nichtalkoholische Fettleber (NAFLD)



Medical University of Graz

-  Chitturi 2002;
- 
- 2002; Clark 2006)
- **NASH**, (Angulo 2002;
- Zöliakie, (Angulo 2002;
- Natürli
 - NAFLD benigne
 - NASH – bis zu 1/3 Zirrhose (Angulo 1999; Ratzl 2000; Dixon 2001; Day 2006)

Mechanismen - NASH



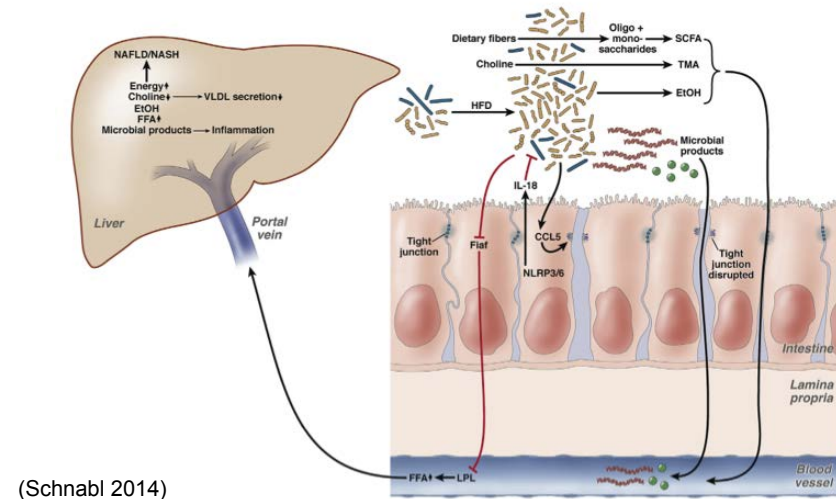
Medical University of Graz

- Pathogenese: „2-hit“ Hypothese
 - Insulin Resistenz – Lipolyse - Steatose
 - Oxidativer Stress – proinflammatorische Zytokine – Fettleberhepatitis
- Adipositas und Fettleber: höhere Inzidenz an bakteriellem Overgrowth (Sabate 2008)
- erhöhte intestinale Permeabilität (Miele 2009)
- Mikrobiom: weniger Ruminococcus, mehr E. coli und Clostridien (Schnabl 2014)
- Stoffwechselprodukte

Mikrobiom und NAFLD/NASH



Medical University of Graz



Probiotika bei NAFLD/NASH



Medical University of Graz

- Vielversprechende Ergebnisse aus Tierversuchen
- bisher Pilotstudien und 4 kleinen randomisierten Studien (n=134)
 - möglicherweise positiver Einfluss auf Leberwerte und oxidativen Stress
 - teilweise widersprüchlich
- große randomisierte Studien sowie Untersuchungen des Mechanismus notwendig

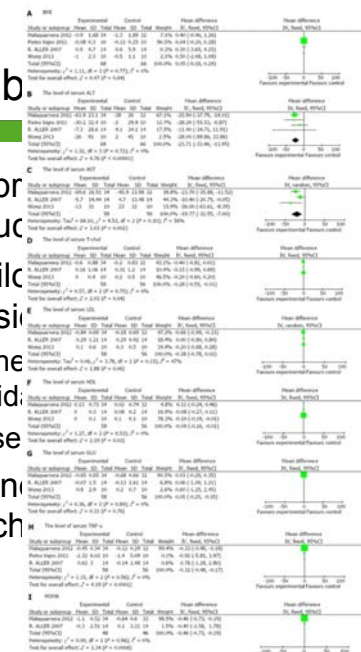
(Ma 2013)

Probiotika bei NAFLD/NASH



Medical University of Graz

- Vielversprechende Ergebnisse aus Tierversuchen
- bisher Pilotstudien und 4 kleinen randomisierten Studien (n=134)
 - möglicherweise positiver Einfluss auf Leberwerte und oxidativen Stress
 - teilweise widersprüchlich
- große randomisierte Studien sowie Untersuchungen des Mechanismus notwendig



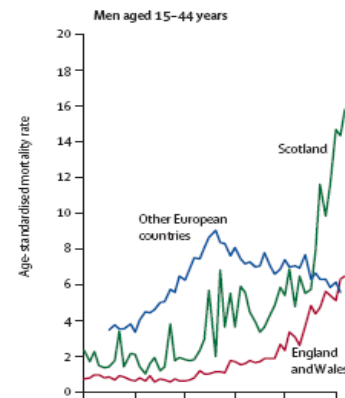
(Ma 2013)

Leberzirrhose



Medical University of Graz

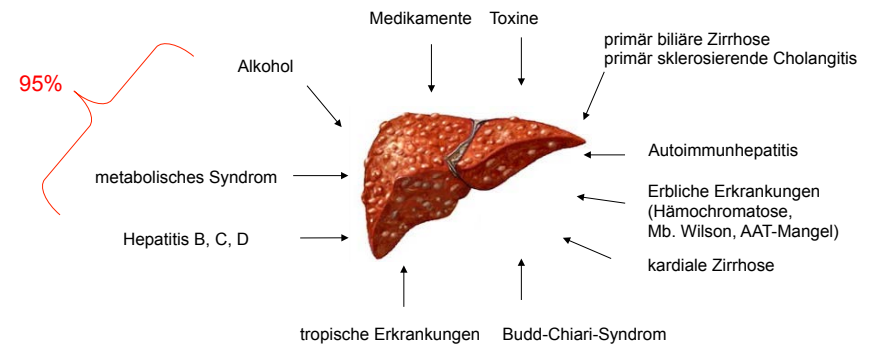
- 10. häufigste Todesursache in den westlichen Ländern (Leon 2006)
- Patienten sterben hauptsächlich an Komplikationen
- 1-Jahres-Sterblichkeit 10-82% (Mansour 1997)



Ursachen



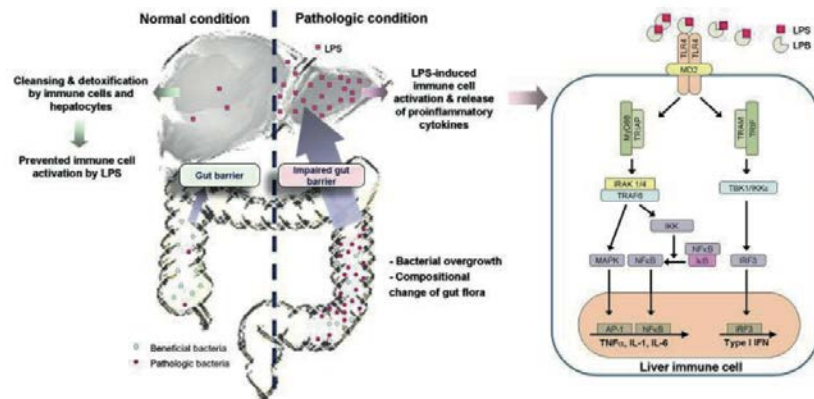
Medical University of Graz



Darm-Leber Achse



Medical University of Graz

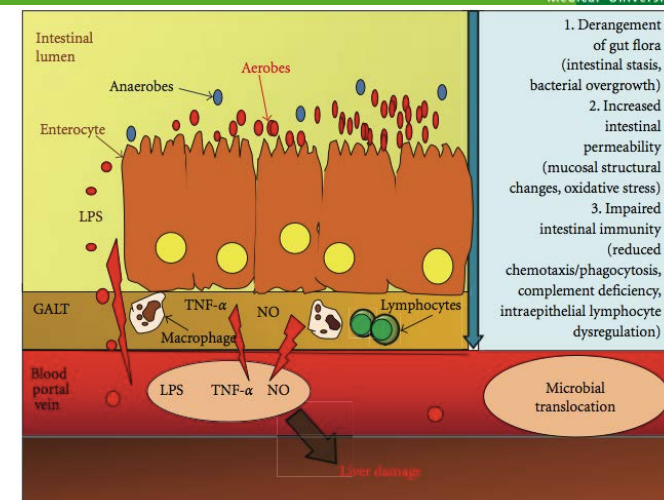


(Seo 2012)

Problem



Medical University of Graz



(Pinzone 2012)

Probiotika bei alkoholischem Leberschaden



Medical University of Graz

- Hypothese: Probiotika senken Endotoxinspiegel im Blut
- Pilotstudien zur Verbesserung der Leberfunktion bei Leberschädigung
 - Verbesserung von Leberwerten, Child-Pugh score und Endotoxinspiegel
 - Probiotische Keime steigen im Stuhl an

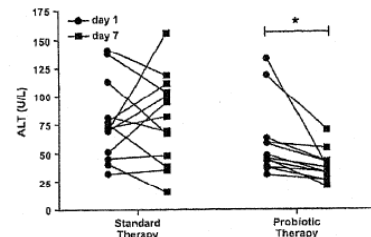


Fig. 1. Paired analysis of alanine aminotransferase (ALT) before and after treatment.

(Liu 2004; Lata 2007; Kirpich 2008)

Probiotika bei hepatischer Enzephalopathie



Medical University of Graz

- Bei manifester HE
 - Erste Studien aus den 60iger Jahren erfolgreich
 - Verbesserung psychometrischer Tests
 - Sekundärprophylaxe
- Bei minimaler HE
 - Große Studien
 - Verbesserung von psychometrischen Tests, Ammoniak, EEG, evozierten Potentialen
- Probleme
 - Unterschiedliche Studiendesigns, oft kein Placebo-Arm
 - Kein klarer Vorteil gegenüber Laktulose
 - Therapeutische Relevanz noch unklar

(Read, 1965; Mcbeth, 1965; Fenton, 1966, Loguerico 2009, Malaguarnera 2007 u. 2010, Liu 2004, Sharma 2008, Lunia 2013, Aggarwal 2012)

Empfehlungen ISHE



Medical University of Graz

Table 4. Summary Statements and Recommendations Regarding Fiber and Micronutrient Provision in Patients With Cirrhosis and HE

Prebiotics	
Ingestion of diets containing 25-45 g of fiber daily should be encouraged.	2B
Micronutrients	
A 2-week course of a multivitamin preparation could be justified in patients with decompensated cirrhosis or those at risk for malnutrition. Clinically apparent vitamin deficiencies should be treated specifically.	2A
Hyponatremia should always be corrected slowly.	1A
Long-term treatment with manganese containing nutritional formulations should be avoided.	2B
Issues Requiring Additional Research	
Better definition of the neuropsychiatric, nutritional, and cost-effectiveness of dietary fiber supplements in patients with cirrhosis, particularly in comparison to standard treatment options	
Benefits and harms of probiotics in randomized trials with a low risk of systematic and random errors	
Comparative efficacy of various probiotics and optimal doses and duration of treatment	
Role of zinc in the pathogenesis of HE and the effects of supplementation	

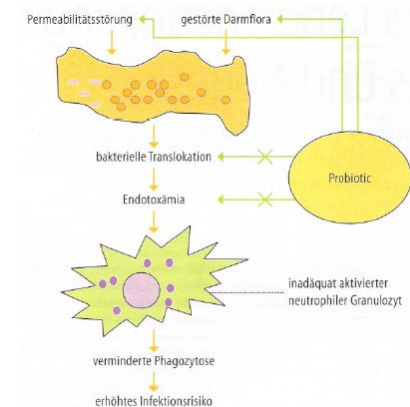
(Amodio 2013)

Infektionen bei Leberzirrhose



Medical University of Graz

- Hauptursache für die Dekompensation einer Leberzirrhose (Jalan 2002, Sen 2002, Sort 1999)
- bis zu 50% der stationären Aufnahmen von Zirrhotikern (Navasa 1999)
- bis zu 35% nosokomiale Infektionen (Fernandez 2002)
- Ursache:
 - erhöhte Darmpermeabilität und Dysbiose
 - vermehrt bakterielle Produkte im Serum
 - Neutrophilendysfunktion durch inadäquate Aktivierung



Probiotika nach Lebertransplantation



Medical University of Graz

- Infektionen nach Lebertransplantation
 - längerer Spitalsaufenthalt, hohe Kosten
 - 10% zusätzliche Mortalität

Table 3: Post-operative bacterial infections and isolated bacteria

Group	A	B
Patients with infection	1/33* (3%)	16/33 (48%)
Urinary tract	1	12
Wound	0	1
Pneumonia	0	1
Cholangitis	0	2
Bacteria		
<i>E. faecalis/faecium</i>	1	11
<i>E. coli</i>	0	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	1

*Difference between groups significant.

(Rayes 2002, 2005)

Studie



Medical University of Graz

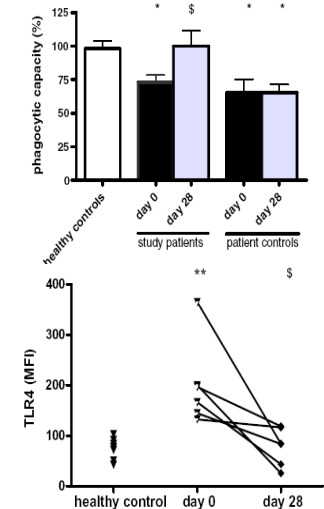
- Hypothese: Die Gabe von Winclove 849 bei Leberzirrhose verbessert die Funktion der neutrophilen Granulozyten durch eine Verbesserung der Darmpermeabilität und/oder der Darmflora und senkt damit die Infektionsrate
- 101 Patienten
- 6 Monate Multispezies-Probiotikum/Placebo

Probiotika und Neutrophilenfunktion



Medical University of Graz

- Die eingeschränkte Phagozytosefunktion der neutrophilen Granulozyten normalisiert sich
- Die überschießende Produktion von Zytokinen auf einen Stimulus reduziert sich
- Die Überexpression von TLR4 normalisiert sich



(Stadlbauer et al, J Hep, 2008)

Ergebnisse



Medical University of Graz

- 12 dropouts (13%)
 - 1 in Probiotikagruppe
 - 11 in Placebogruppe (p<0.01)
- Exzellente Compliance: 98,9% der Dosen wurden eingenommen

(Horvath A, unpublished)

Patientencharakteristika



Medical University of Graz

	Probiotikum (n=44)	Placebo (n=36)
Alter	60 (54;64)	56 (50;63)
MELD	12 (9;15)	9 (8;14)
Child-Pugh Score A/B/C	29/12/3	32/4/0*
Ätiologie (Alkohol/HCV/others)	22/9/13	19/5/12
Geschlecht (m/f)	32/12	26/10
Protonenpumpenhemmer	27	19
Antibiotikaprophylaxe	1	0

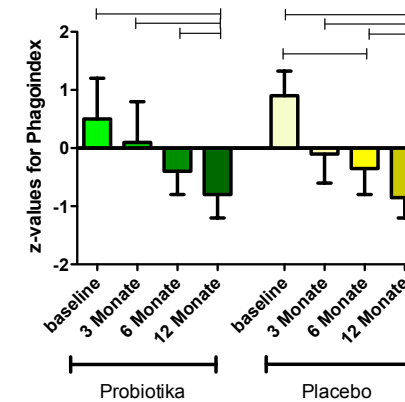
*p<0.05

(Horvath A, unpublished)

Phagozytose



Medical University of Graz

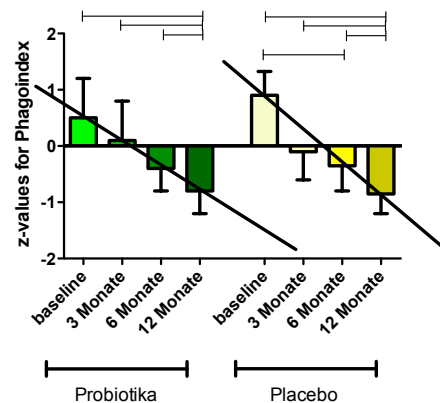


(Horvath A, unpublished)

Phagozytose



Medical University of Graz



(Horvath A, unpublished)

Infektionen



Medical University of Graz

- während der Therapie

	leichte Infektionen	schwere Infektionen
Placebo	17	2
Probiotika	12	0

- in der Nachbeobachtungszeit

	leichte Infektionen	schwere Infektionen
Placebo	7	4
Probiotika	7	5

(Horvath A, unpublished)

Für die Praxis



Medical University of Graz

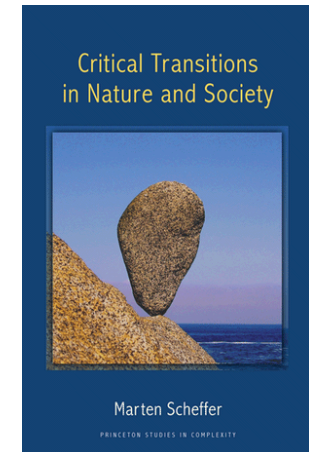
- Adipositas/metabolisches Syndrom/NAFLD/NASH
 - Wenn möglich, Teilnahme an klinischen Studien
- Zirrrose
 - Probiotikum zur Prophylaxe einer AAD parallel zu jeder Antibiotika-Verordnung
 - Wenn möglich, Teilnahme an klinischen Studien
 - Multispeziesprobiotikums zusätzlich zu ärztlicherseits verordneten Therapie (vor allem bei hepatischer Enzephalopathie)

Ausblick



Medical University of Graz

- Paradigmenwechsel
- Methodische Fortschritte
- Bessere Studiendaten
- Verständnis der Pathophysiologie
- Gezielte und effektivere Strategien
- Translationale Forschung



Danke



Medical University of Graz

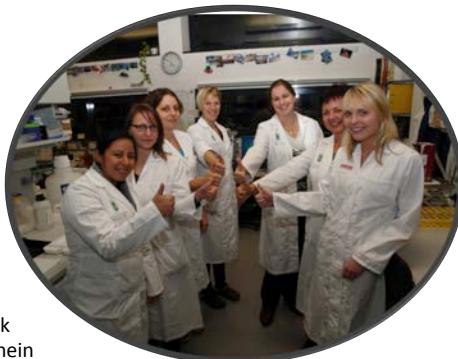
Bettina Leber
Angela Horvath
Sandra Lemesch
Monika Tawdrous
Gabriele Zettel

FWF
Der Wissenschaftsfonds.

**Das Land
Steiermark**
→ Wissenschaft und Forschung

Slave Trajanoski
Mina Bashir
Ingeborg Klymiuk

Peter Fickert
Rudolf Stauber
Gernot Zollner
Elisabeth Krones
Walter Spindelböck
Franziska Durchschein
Philipp Douschan
Florian Rainer



Harald Sourji
Norbert Tripolt
Gernot Schilcher
Werner Ribitsch

Tatjana Stojakovic
Günther Fauler

Barabara
Obermayer-Pietsch

Philipp Stiegler
Karl Öttl
Gunther Marsche
Seth Hallström

**Institut
AllergoSan**

WINCLOVE
BIO INDUSTRIES BV

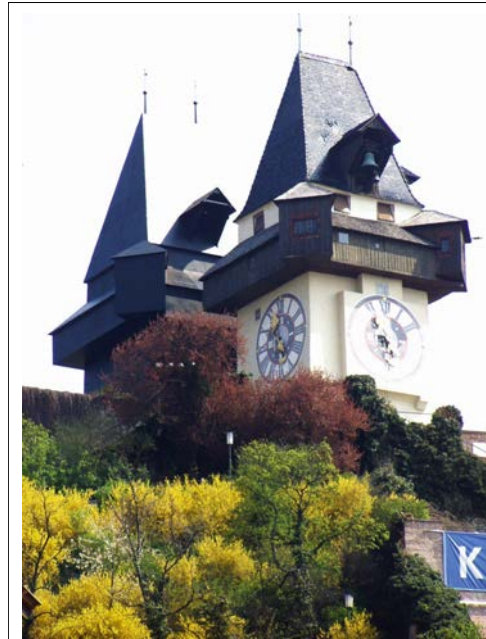
GRAZ
WISSENSCHAFT

Wir suchen!



Medical University of Graz

- Patienten mit **Typ 2 Diabetes** ($\text{HbA1c} \geq 6.5 \%$ / 48 mmol/mol) und **Adipositas** ($\text{BMI} 30\text{-}40 \text{ kg/m}^2$)
- Studie mit Synbiotikum zur Modulation der Darmflora versus Placebo
- Vorteil: genaueste Stoffwechseluntersuchung, möglicherweise positiver Effekt durch Probiotikum
- Kontakt: vanessa.stadlbauer@medunigraz.at



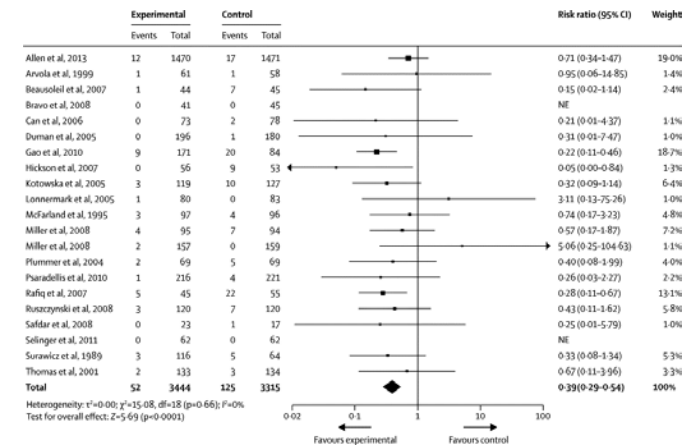
vanessa.stadlbauer@medunigraz.at

Offenlegung: Die Referentin führt Studien mit Probiotika zur Modulation des Darm-Mikrobioms durch. Fördergeber: FWF, FFG, Land Steiermark, Stadt Graz, Institut Allergosan. Die Referentin erhielt Vortragshonorare von den Firmen Institut Allergosan, Yakult Österreich, MSD Europe, Biotest.

Antibiotikaassoziierte Diarrhoe



Medical University of Graz



Antibiotikaassoziierte Diarrhoe



Medical University of Graz

- Welches Produkt?
 - Lactobacillus (rhamnosus, casei)
 - Bifidobakterien
 - Enterococcus faecium
 - Saccharomyces boulardii
 - Multispeziesprobiotika