

Diplomarbeit

**Einfluss eines Multispezies-Probiotikums auf die
gesundheitsbezogene Lebensqualität von
Leberzirrhose-PatientInnen**

**Eine doppelblind, randomisierte, Placebo-kontrollierte
klinische Studie**

eingereicht von

Khalida Sherzay

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

ausgeführt an der

Medizinischen Universität Graz

Universitätsklinik für Innere Medizin, Klinische Abteilung für

Gastroenterologie und Hepatologie

unter der Anleitung von

Assoz. Prof.ⁱⁿ Dr. med. univ. Vanessa Stadlbauer-Köllner

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 23.03.2016

Khalida Sherzay eh

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Frau **Prof. Dr. Vanessa Stadlbauer-Köllner** bedanken, die mir ermöglicht hat, an dieser Studie als Diplomandin teilzuhaben. Als Erstbetreuerin stand sie mir für alle meine Fragen und Probleme mit Fachkompetenz und Freundlichkeit zur Seite. Ich bin für ihre schnelle Erreichbarkeit überaus dankbar und bewundere ihr Engagement und ihre Freude bei der Arbeit. Die Zusammenarbeit mit Frau Prof. Stadlbauer-Köllner stellte eine Bereicherung für meine berufliche Zukunft dar.

Einen besonderen Dank gebührt meiner Zweitbetreuerin Frau **Mag. Angela Horvath**, die mich durch die ganze Arbeit mit nützlichen und wertvollen Tipps begleitet hat. Sie stand mir sowohl zu inhaltlichen als auch statistischen Fragen mit Geduld und Kompetenz zur Seite. Ich danke ihr für ihren besonderen Einsatz in der Betreuung der DiplomandInnen. Denn ohne ihre Mitwirkung an der Gestaltung der überaus hilfreichen DiplomandInnen-Seminare wäre die Erstellung dieser Arbeit umso mühsamer gewesen.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei meiner besten Freundin und zugleich Diplomarbeitkollegin **Özlem Yüksel**, durch die ich überhaupt von dieser Diplomarbeit beziehungsweise Studie erfahren habe. Die Zusammenarbeit mit ihr hat meinen privaten als auch fachlichen Horizont erweitert. Durch die gemeinsame Arbeit ist nicht nur unsere Persönlichkeit, sondern auch unsere Freundschaft gewachsen.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und besonders meinen Schwestern und zugleich Studienkolleginnen **Romilda und Basira Sherzay** bedanken, die mich bei wichtigen Entscheidungen beraten und unterstützt haben.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund

Der menschliche Körper und die Mikroorganismen, die verschiedene Organe kolonisieren, befinden sich in einer konstanten symbiotischen Beziehung. Die Symbiose ist notwendig um die regelrechte Funktion der wichtigsten Systeme des Körpers aufrechtzuerhalten. Der Darm enthält die größte Anzahl an Mikroorganismenspezies. Diese sogenannte bakterielle Darmflora erfüllt lebenswichtige Funktionen für den menschlichen Körper wie zum Beispiel unbrauchbare Substanzen zu metabolisieren um daraus Energie herzustellen sowie das Immunsystem für die Abwehr gegen pathogene Keime zu sensibilisieren. Die Änderung der Zusammensetzung der bakteriellen Darmflora, der Darmpermeabilität und der bakteriellen Translokation werden der Leberzirrhose zugeschrieben und sind für die Verschlechterung der Leberfunktion und ihren Komplikationen verantwortlich. Die Leberzirrhose ist das Endstadium vieler Lebererkrankungen unterschiedlicher Genese. Sie ist gekennzeichnet durch narbigen und fibrotischen Umbau des Leberparenchyms. Zusätzlich ist die Läppchen- und Gefäßstruktur zerstört, die unter anderem zu den schwerwiegenden Komplikationen wie portale Hypertension, Aszites, Ösophagusvarizenblutungen führt. Die PatientInnen erfahren dadurch massive Einschränkungen in ihrer Lebensqualität. Der Begriff der Lebensqualität bezeichnet in der medizinischen Forschung die Einheit aus psychischer, körperlicher und sozialer Gesundheit. Die gesundheitsbezogene Lebensqualität wird seit ungefähr zwei Jahrzehnten intensiv als Messparameter für Interventionsstudien, in denen der Effekt eines Therapeutikums „objektiv“ gemessen wird, verwendet.

Das Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss eines Multispezies-Probiotikums auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität bei Leberzirrhose-PatientInnen durch Modulation der bakteriellen Darmflora zu untersuchen.

Methode und Material

Die randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Studie wurde mit 80 Leberzirrhose-PatientInnen durchgeführt. Jede/r PatientIn bekam entweder ein Multispezies-Probiotikum (Winlove 849) oder ein Placebo zur Einnahme für 6 Monate. Die Messung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität erfolgte mit dem SF-36 Gesundheitsfragebogen zu vier Zeitpunkten: Baseline, nach 3 und nach 6 Monaten Intervention sowie nach 6 Monaten Follow-up. Dieser Fragebogen gilt in der medizinischen Forschung als der Goldstandard zur Messung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität.

Ergebnisse

Nach 3-monatiger Intervention zeigte die Probiotikum-Gruppe in den Subskalen „Soziale Funktionsfähigkeit“ ($p=0,042$) und „Psychisches Wohlbefinden“ ($p=0,003$) signifikant bessere Werte als die Placebo-Gruppe. Interessanterweise erreichten die ProbandInnen der Probiotikum-Gruppe in der Subskala „Soziale Funktionsfähigkeit“ nach dem Follow up ebenfalls signifikant bessere Werte im Vergleich zum Placebo ($p=0,019$). Die „Psychische Summenskala“ ergab keine signifikanten Unterschiede im zeitlichen Verlauf. Obwohl die körperliche Summenskala keine signifikanten Unterschiede im Studienverlauf zeigte, konnte ein starker Trend zu einer besseren „Körperlichen Rollenfunktion“ in der Probiotikum-Gruppe nach 3-monatiger Intervention erfasst werden.

Schlussfolgerung:

Die Verabreichung eines Multispezies-Probiotikum (Winlove 849) hatte einen positiven Effekt auf den psychischen Gesundheitszustand der Leberzirrhose-PatientInnen, der sie befähigte wieder ihre sozialen Aktivitäten des Alltags aufzunehmen. Probiotikasubstitution könnte in Zukunft als therapeutische Strategie die Lebensqualität von Leberzirrhose-PatientInnen verbessern.

Das Probiotikum ist mit wenigen Nebenwirkungen behaftet, kostengünstig zu bekommen und erfährt eine große Akzeptanz bei PatientInnen. All diese Faktoren qualifizieren das Probiotikum für eine mögliche adjuvante Therapie.

Schlagwörter: Leberzirrhose, Lebensqualität, Probiotikum, Darmflora

ABSTRACT

Influence of a multi-species probiotic on health-related quality of life of liver cirrhosis patients

Introduction

Alterations in gut microflora, intestinal permeability and bacterial translocation are described in cirrhosis and known to deteriorate liver function and its complications. Patients experience severe limitation of quality of life. This study aims to investigate the influence of a multispecies probiotic on health-related quality of life (HRQOL) through modulation of gut microflora.

Material and methods

A randomized, double-blind, placebo-controlled study was conducted including 80 liver cirrhotic patients. Each patient received either a probiotic (Winlove 849) or a placebo for 6 months. HRQOL was evaluated with SF-36 Health Survey questionnaire at four time points: baseline, after 3 and 6 months of intervention and after another 6 months of follow up.

Results

After 3 months of intervention, the probiotic group achieved higher scores than the placebo group in the subscales mental health ($p=0.003$) and social functioning ($p=0,042$). Interestingly, patients in the probiotic group showed also significantly higher scores than the placebo-group in social functioning after 6 months of follow up ($p=0,019$). The mental component did not reach any significant differences over time. Although the physical component did not show any significant differences over time, there was a high tendency to a better physical functioning in the probiotic group after 3 months of intervention ($p=0,03$).

Conclusion

The administration of a multispecies probiotic (Winclove 849) has a positive effect on the mental well-being of liver cirrhotic patients which may enable them to take part in social life again. Probiotic supplementation could be a future strategy to increase HRQOL in cirrhosis patients. Low side effects, low costs and high appreciation among patients qualify probiotics as possible additional therapy.

Keywords: liver cirrhosis, probiotic, health-related quality of life, gut microflora

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	i
KURZZUSAMMENFASSUNG	ii
ABSTRACT	iv
Inhaltsverzeichnis	vi
Glossar und Abkürzungen	ix
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xi
1 EINLEITUNG	12
1.1. Lebensqualität	14
1.1.1. Begriffsdefinition der gesundheitsbezogenen Lebensqualität	14
1.1.2. Messung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität	14
1.2. Hintergründe	15
1.2.1. Das Krankheitsbild der Leberzirrhose	15
1.2.1.1. Definition	15
1.2.1.2. Ätiologie	15
1.2.1.3. Epidemiologie	16
1.2.1.4. Diagnostik	16
1.2.1.5. Klinik – Symptome	20
1.2.1.6. Komplikationen	20
1.2.1.7. Therapie	21
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1. Studie	23
2.1.1. Studiendesign und Patientenrekrutierung	23
2.1.2. Einschluss-und Ausschlusskriterien	23
2.1.3. Studienmedikation	24
2.1.4. Randomisierung	24
2.1.5. Studiendurchführung	24

2.2. SF-36 Fragebogen	25
2.2.1. Aufbau	25
2.2.2. Datenerhebung	26
2.2.3. Auswertung	26
2.2.4. Interpretation	27
2.3. Statistische Auswertung	28
2.4. Arbeitshypothese/ Fragestellung	29
3 ERGEBNISSE	30
3.1. Deskriptive Statistik	30
3.1.1. Beschreibung der Studienpopulation	30
3.1.2. Epidemiologische Daten der Studienpopulation	31
3.2. Explorative Statistik	32
3.2.1. Vergleich der SF-36 Summenskalen beider Interventionsgruppen	32
3.2.1.1 „Physische Gesundheit“	32
3.2.1.2 „Physische Gesundheit“	33
3.2.2. Vergleich der zwei Summenskalen und 8 Subskalen des SF-36 Fragebogens im zeitlichen Verlauf	35
3.2.2.1. Vergleich der „Körperlichen Funktionsfähigkeit“	36
3.2.2.2. Vergleich der „Körperlichen Rollenfunktion“	37
3.2.2.3. Vergleich der „Körperlichen Schmerzen“	39
3.2.2.4. Vergleich der „Allgemeinen Gesundheitswahrnehmung“	40
3.2.2.5. Vergleich der „Vitalität“	42
3.2.2.6. Vergleich der „sozialen Funktionsfähigkeit“	43
3.2.2.7. Vergleich der „Emotionalen Rollenfunktion“	45
3.2.2.8. Vergleich des „Psychischen Wohlbefindens“	46
4. DISKUSSION	48
5 ZUSAMMENFASSUNG	54
6 AUSBLICK	55
Literaturverzeichnis	56

7 ANHANG	62
7.1. STUDIENPROTOKOLL	62
7.2. SF-36 FRAGEBOGEN	97

Glossar und Abkürzungen

WHO	World Health Organization
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis C Virus
NASH	Nicht-alkoholische Steatohepatitis
NAFLD	Nicht-alkoholische Fettleber
CT	Computertomographie
MRI/MRT	Magnetresonanztomographie
AST	Aspartat-Aminotransferase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
TIPS	Transjugulärer intrahepatischer portosystemischer Shunt
MELD-Score	Model for Endstage liver Disease
HRQOL	Health-related quality of life
CLDQ	Chronic liver disease questionnaire
APRI	Aspartate transaminase to platelets ratio index
BMI	Body-Maß-Index

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Zusammenhang zwischen Leberzirrhose und Lebensqualität	29
Abb. 2: Studienpopulation	30
Abb. 3: Epidemiologische Daten der Studienpopulation	31
Abb. 4: Vergleich der "Physischen Gesundheit"	33
Abb. 5: Vergleich der "Psychischen Gesundheit"	34
Abb. 6: Vergleich der "Körperlichen Funktionsfähigkeit"	37
Abb. 7: Vergleich der "Körperlichen Rollenfunktion"	38
Abb. 8: Vergleich der "Körperliche Schmerzen"	40
Abb. 9: Vergleich der "Allgemeinen Gesundheitswahrnehmung"	41
Abb. 10: Vergleich der „Vitalität“	43
Abb. 11: Vergleich der "Sozialen Funktionsfähigkeit"	44
Abb. 12: Vergleich der "Emotionalen Rollenfunktion"	46
Abb.13: Vergleich des "Psychischen Wohlbefindens"	47

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Laborchemische Parameter für Diagnostik der Leberzirrhose</i>	19
<i>Tabelle 2: Child-Pugh-Score</i>	22
<i>Tabelle 3: Vergleich der "Physischen Gesundheit "</i>	32
<i>Tabelle 4 :Vergleich der "Psychischen Gesundheit"</i>	34
<i>Tabelle 5: Vergleich der Sub-und Summenskalen des SF-36 Fragebogens im Studienverlauf</i>	35
<i>Tabelle 6 :Vergleich der "Körperlichen Funktionsfähigkeit"</i>	36
<i>Tabelle 7: Vergleich der" Körperlichen Rollenfunktion"</i>	38
<i>Tabelle 8: Vergleich der "Körperlichen Schmerzen"</i>	39
<i>Tabelle 9: Vergleich der "Allgemeinen Gesundheitswahrnehmung"</i>	41
<i>Tabelle 10:Vergleich der "Vitalität"</i>	42
<i>Tabelle 11:Vergleiche der "Sozialen Funktionsfähigkeit"</i>	44
<i>Tabelle 12:Vergleich der "Emotionalen Rollenfunktion"</i>	45
<i>Tabelle 13:Vergleich des "Psychischen Wohlbefindens"</i>	47

1 EINLEITUNG

Eine Erkrankung kann akut oder chronisch verlaufen. Plötzlicher Beginn und für die Erkrankung typische Symptomatik sprechen für einen akuten Verlauf. Ein weiteres wichtiges Kennzeichen ist die kurze Krankheitsdauer, da sie entweder durch eine Heilung mit Fortsetzung der vorhergehenden Aktivitäten oder durch den Tod limitiert ist. Im Gegensatz dazu beschreibt chronische Erkrankung einen Zustand, der progredient ohne Aussicht auf Heilung verläuft (1). Im Jahre 1956 wurde die chronische Erkrankung im „Commission on chronic illness“ anhand von bestimmten Kriterien definiert. Danach ist sie durch eine nicht reversible pathologische Änderung des Organismus definiert, der mit körperlichen und geistigen Behinderungen des Betroffenen einhergeht. Dieser Zustand bedarf eines speziellen Training-Programms im Rahmen einer Rehabilitation und einer langandauernden Betreuung und Beobachtung (1). Laut der WHO werden chronische Erkrankungen in vier Typen, nämlich kardiovaskuläre, respiratorische (zum Beispiel COPD und Asthma), maligne Erkrankungen und Diabetes Mellitus eingeteilt. Weltweit sterben etwa 16 Millionen Menschen an chronischen Erkrankungen vor dem 70. Lebensjahr. Mit einem Anteil von 82 % sind Menschen in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen am häufigsten betroffen. Das bedeutet, Menschen aus sozial und wirtschaftlich schwachen Schichten werden kränker und sterben schneller als sozial höher gestellte Schichten (2). Denn sie können sich die teuren Behandlungen meistens nicht leisten und sind dem Risiko der Führung eines ungesunden Lebensstils ausgesetzt. Chronische Erkrankungen sind somit mit 38 Millionen Toten die führende Todesursache weltweit (2). Das Zusammenspiel vieler Faktoren hat dazu beigetragen, dass die Zahl der chronischen Erkrankungen angestiegen ist. Vieler dieser Erkrankungen, die früher im Akutstadium einen letalen Ausgang fanden, können heute behandelt werden und gehen somit in ein chronisches Stadium über. Die Betroffenen sind auf eine lebenslange medizinische Betreuung angewiesen (1).

Risikofaktoren für die Entstehung von chronischen Erkrankungen stellen ungesunde Ernährung, Bewegungsmangel, Tabak- und exzessiver Alkoholkonsum dar (2, 3). Die Leberzirrhose ist ebenfalls eine chronische Erkrankung, deren Ursache zum größten Teil auf den Alkoholabusus zurückgeht.

Jedoch führen auch virale Infektionen wie Hepatitis B und C zum Krankheitsbild der Leberzirrhose (4). Eine chronische Erkrankung wie zum B. die Leberzirrhose ist mit vielen Komplikationen und einem progredienten Verlauf sowie Verschlechterung des Allgemeinzustandes verbunden. Die PatientInnen müssen ihr ganzes Leben lang Medikamente einnehmen und immer wieder Verlaufskontrollen machen lassen (1, 5). Nun spielt keine Rolle mehr, wie die PatientInnen sich bei einem akuten Ereignis fühlen, sondern wie sie im Alltag mit ihrer krankheitsbedingten Einschränkungen zurechtkommen. Die Effizienz der Langzeittherapie –und -betreuung wird mit dem Outcome der gesundheitsbezogenen Lebensqualität gemessen (1).

1.1. Lebensqualität

1.1.1. Begriffsdefinition der gesundheitsbezogenen Lebensqualität

Um im Rahmen von Studien den Therapieerfolg anhand der Lebensqualität zu messen, muss zunächst dieser Begriff eindeutig definiert werden. Doch aufgrund ihrer Eigenschaft der Mehrdimensionalität stellt sich die Erstellung einer eindeutigen Definition schwierig dar. Die WHO machte den Versuch einer Definition im Jahre 1993: „Quality of life is defined as an individual’s perception of his/her position in life in the context of the culture and value system in which they live and in relation to their goals, expectations, standard and concerns. It is a broad ranging concept affected in a complex way by the person’s physical health, psychological state, level of independence, social relationship, and their relationship to salient features of their environment“ (6). Die heutzutage durchgeführten Studien in der Medizin zur Untersuchung der Lebensqualität bei unterschiedlichen Therapien bedient sich den letzten Aspekten der WHO Definition, nämlich des körperlichen, psychischen Befindens, der Alltagsfunktionsfähigkeit und der sozialen Integration.

Auch das bio-psycho-soziale Befinden und die Funktionsfähigkeit der PatientInnen beschreibt zusammenfassend die Lebensqualität. Diese Beschreibung stimmt mit der von der WHO 1948 aufgestellten Begriffserklärung der „Gesundheit“ überein als das vollständige körperliche, seelische und soziale Wohlbefinden. Damit wird gleichzeitig die gesundheitsbezogene Lebensqualität definiert.

1.1.2. Messung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität

Der SF-36 Gesundheitsfragebogen ist ein krankheitsübergreifendes und standardisiertes Messinstrument der gesundheitsbezogenen Lebensqualität. Er ist dadurch gekennzeichnet, dass er die subjektive Gesundheit von verschiedenen Populationen unabhängig von ihrem Gesundheitszustand aus der Sicht der Betroffenen erfasst. Es gibt eine Vielzahl von Einsatzmöglichkeiten dieses Fragebogens sowohl in der somatischen Medizin als auch bei psychischen Krankheitsbildern. Gerne wird er so wie bei der vorliegenden Arbeit in klinischen Studien zur Untersuchung eines Therapieeffektes im Gruppenvergleich eingesetzt.

1.2. Hintergründe

1.2.1. Das Krankheitsbild der Leberzirrhose

1.2.1.1. Definition

Die Leberzirrhose bezeichnet das Endstadium von verschiedenen Lebererkrankungen, die im Laufe von Jahren zunehmend und langsam voranschreiten (7). Damit stellt die Leberzirrhose eine chronische Erkrankung dar. Histopathologisch ist sie gekennzeichnet durch einen narbigen und fibrotischen Umbau des Lebergewebes über mehrere Jahre. Es kommt zu einer diffusen Bindegewebsvermehrung und gleichzeitig zu einer knotenförmigen Regeneration von Lebergewebe. Die Läppchen und Gefäßstruktur der gesamten Leber ist zerstört und umgebaut. Einhergehend mit der Struktur ist auch die Funktion des Leberparenchyms verändert (8).

1.2.1.2. Ätiologie

Der Leberzirrhose können viele verschiedene Ursachen zugrunde liegen. Zu diesen zählen unter anderem sowohl exogen-toxische zum Beispiel. Alkohol, Medikamente, chemische Substanzen, infektiöse zum Beispiel. Hepatitis A, B, C , als auch autoimmune und hereditäre (Mb. Wilson, Hämochromatose, Alpha-1-Antitrypsinmangel) Ursachen (7). Anhand einer genauen Anamneseerhebung, der biochemischen Laborparametern und der histologischen Untersuchung kann eine Leberzirrhose identifiziert werden. In den westlichen Ländern ist die alkoholinduzierte gefolgt von der Hepatitis-C-Virus (HCV) ausgelöste Lebererkrankung die häufigste Ursache einer Leberzirrhose. Mit der Entdeckung des Hepatitis-C-Virus im Jahre 1989 und der Differenzierung zwischen alkoholischer und nicht alkoholischer Steatohepatitis (NASH) gibt es kaum Fälle mit ungeklärter Ursache der Leberzirrhose (4, 9). Einige Studien haben gezeigt, dass begünstigende Faktoren wie Alkoholkonsum, ein Alter über 50 Jahren und männliches Geschlecht zur Entwicklung der Leberzirrhose beitragen (10, 11). Zu den Faktoren, die die Entstehung der nicht alkoholischen Steatohepatitis begünstigen, gehören Fettleibigkeit im hohen Alter, Diabetes Mellitus Typ 2, arterieller Hypertonus und Hyperlipidämie (12, 13).

1.2.1.3. Epidemiologie

Martin Blachier et al untersuchte 2013 in einem Review 250 epidemiologische Studien der letzten fünf Jahre, inwieweit die europäische Bevölkerung mit Lebererkrankungen belastet ist. Demnach macht die Leberzirrhose laut WHO ca. 1,8% aller Todesfälle in Europa aus. Das sind 170 000 Todesfälle pro Jahr. Ungefähr 0,5-0,7% der europäischen Bevölkerung sind an Hepatitis B erkrankt. Die Gesamtprävalenz für Hepatitis C in Europa wird auf 0,13-3,26% geschätzt. Die Prävalenz der nicht alkoholischen Lebererkrankung (NAFLD) beträgt 2-44% in der Allgemeinbevölkerung Europas, während sie bei Diabetikern einen Anteil von 42,6-69,5% ausmacht (14). In einigen westlichen Ländern Europas wie zum Beispiel Irland und England hat sich die Leberzirrhose-assoziierte Mortalität in den letzten zehn Jahren erhöht. Hier stellt Alkohol den stärksten Risikofaktor für Leberzirrhose dar, gefolgt von den Virus-Hepatitis B und C (15, 16). In einer Studie von Zatonski et al, die sich auf die WHO Datenbank für Mortalität gestützt hat, wird deutlich, dass in bestimmten süd-östlichen Ländern Europas seit den 70er Jahren eine massive Zunahme der Sterblichkeitsrate für Leberzirrhose zu verzeichnen ist. Auch in den nord-östlichen Ländern Europas zum Beispiel Polen und Litauen ist eine ähnliche Veränderung zu beobachten. Erstaunlicherweise ist laut dieser Studie in den mediterranen Ländern wie Spanien, Portugal, Griechenland und Italien die Mortalität durch Leberzirrhose gesunken (17).

1.2.1.4. Diagnostik

Histopathologisch bietet die Leberzirrhose eine Umstrukturierung der Gefäß- und Zellstruktur der Leber. Durch die Verbindung von fibrotischen Septen mit Portalfeldern kommt es zur Bildung von Hepatozyten-Inseln, die von Bindegewebe umgeben und von der Zentralvene abgetrennt sind (4). Neben der klinischen Diagnostik der Leberzirrhose, zu der die Anamnese und die körperliche Untersuchung von PatientInnen zählen, stehen sowohl laborchemische als auch bildgebende (Sonographie CT, MRI oder MRA) sowie invasive Verfahren wie die Leberbiopsie zur Verfügung (7).

In der allgemeinen Labordiagnostik der Leberzirrhose werden die Serumenzyme ALT, AST, GT, GGT, Gesamtbilirubin, indirektes und direktes Bilirubin und das Serumalbumin bestimmt (vgl. Tab.1). Obwohl ALT ein leberspezifisches Enzym ist und metabolische oder toxische Leberschäden anzeigen kann, hat jedoch wie andere Leberfunktionstests einen begrenzten Aussagewert über das Ausmaß von entzündlichen Prozessen der Leber. Als Prädiktor für den Schweregrad der Zirrhose ist es nicht geeignet (18). Die Diagnose der Leberzirrhose sollte nicht allein anhand von pathologischen Leberwerten gestellt werden, sondern im Falle eines Verdachtes im Zusammenschau von klinischen und bildgebenden Befunden interpretiert werden.

Für die Leberzirrhose selbst gibt es keinen Goldstandard in der Bildgebung. Allerdings können die unterschiedlichen Manifestationen bzw. Komplikationen der Leberzirrhose zum Beispiel Aszites, Hepatosplenomegalie, Portalvenenthrombose/Leberventhrombose und hepatozelluläres Karzinom mithilfe der Bildgebung wie zum Beispiel die Sonographie dargestellt und die Diagnose der Leberzirrhose somit erhärtet werden. Die Sonographie ist ein günstiges und für den PatientInnen unschädliches, nicht-invasives Verfahren, mit dem die Leber sowohl morphologisch als auch funktionell (Blutfluss in der Portal bzw. Lebervene) beurteilt werden kann. Typische sonographische Zeichen der Leberzirrhose sind eine knotige Veränderung des Parenchyms, erhöhte Echogenität, atrophische und unregelmäßige Oberfläche der Leber. Die Computertomographie eignet sich gut in der Diagnostik der fortgeschrittenen Lebererkrankung, während die MRT für Verlaufskontrollen hilfreich ist. Nichtsdestotrotz ist die Sonographie als Routineverfahren aufgrund der obengenannten Vorteile zur Aufdeckung der Leberzirrhose und ihrer Komplikationen ausreichend. Falls die non-invasiven diagnostischen Mittel versagen sollten, könnte eine Leberbiopsie in Betracht gezogen werden. Diese Methode hat aufgrund des invasiven Eingriffs entsprechende Risiken und Komplikationen. Jedoch überwiegt der Vorteil der erhöhten Sensitivität und Spezifität mit 80-100%, sodass es bei Bedarf auch eingesetzt wird (19).

Die transiente Elastographie (Firmenname: FibroScan) beschreibt ein relativ neues Verfahren zur nicht-invasiven Bestimmung des Leberzirrhose-Stadiums. Es basiert auf dem Prinzip des Ultraschalls. Dabei wird die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Ultraschallwelle im Lebergewebe gemessen. Je

steifer das Lebergewebe desto fortgeschrittener das Leberzirrhose-Stadium. Allerdings ist die transiente Elastographie zur Diagnostik leichter Zirrhose-Stadien nicht aussagekräftig (20, 21). Die Methode ist bei Leberzirrhose unterschiedlicher Genese gut anwendbar wie zum Beispiel bei PatientInnen mit Virushepatitiden, Alkoholabusus und primär-billiärer Zirrhose als Ursache ihrer Lebererkrankung (22). Studien über die Diagnostik der Leberzirrhose zeigen eine viel höhere Sensitivität und Spezifität der transienten Elastographie gegenüber anderen nicht-invasiven Verfahren wie dem Fibrotest oder APR (22, 23). Eine Kombination anderer nicht-invasiver Verfahren mit der transienten Elastographie würde die Sensitivität und Spezifität in der Diagnostik der Leberzirrhose deutlich verbessern, sodass eine Leberbiopsie sich aufgrund der Komplikationen möglicherweise vermeiden lässt (23). Limitierende Faktoren dieses Verfahrens stellen ein hohes BMI (24), enge Interkostalräume, Aszites, akute Hepatitiden sowie PatientInnen mit Zustand nach Leberteileresektionen, da Vernarbungen ein Hindernis für die Ausbreitung der mechanischen Welle darstellen (25).

Tabelle 1: Laborchemische Parameter für Diagnostik der Leberzirrhose

Parameter	Bedeutung	Ursache
AST und ALT	Oft normal oder mäßig erhöht	Freisetzung bei Leberzellschädigung; AST/ALT >1 v.a. in alkoholischer Leberzirrhose
AP	Erhöht, aber nicht über 3-fachen Norm	Cholestase
GGT	Spezifischer für Leber als AP, erhöht bei Alkoholkonsum	Cholestase
Bilirubin	Erhöht, nach GGT und AP wichtigster Prädiktor für Mortalität	Cholestase, Sekretionsstörung bei der Leber und Niere.
Albumin	Erniedrigt in fortgeschrittener Leberzirrhose	Erniedrigte Synthese in der Leber, DD: Mangelernährung, Proteinverlust bei Enteropathie.
Prothrombinzeit	Erniedrigt in fortgeschrittener Leberzirrhose	Erniedrigte Synthese der Gerinnungsfaktoren V, VII (cave: normale Produktion von Thrombin)
Immunglobuline	Hauptsächlich IgG erhöht	Transport der intestinalen Antigene durch den portalvenösen Shunt zum lymphatischen Gewebe. Dort Aktivierung der Plasmazellen
Natriumungleichgewicht	Hyponatriämie	Unfähigkeit der Niere Wasser auszuscheiden aufgrund der erhöhten Aktivität von ADH
Anämie	Makro,-normo,-mikrozytär	Folsäuremangel, Splenomegalie, toxisch (Alkohol), GIT-Blutverlust (zum Beispiel Ösophagusvarizenblutung)
Thrombozyten/Leukozyten	Thrombozytopenie/Leukozytopenie	Splenomegalie, Störung der Fibrinogensynthese, erniedrigte hepatische Thrombopoetin

Quelle: Schuppan, Afdhal: liver cirrhosis, Lancet 2008

1.2.1.5. Klinik – Symptome

Leberzirrhose ist anfangs wegen Beschwerdefreiheit immer noch oft ein Zufallsbefund und wird nicht selten erst in Autopsien entdeckt (4). Unspezifische Allgemeinsymptome wie Leistungsminderung oder Müdigkeit können jedoch auftreten (26). Anamnestisch können weitere unspezifische Symptome wie Anorexie, Gewichtsverlust und Vitamin-D Malabsorption erhoben werden. PatientInnen mit kompensierter Leberzirrhose konsultieren erst einen Arzt, wenn bereits Symptome der Dekompensation wie zum Beispiel Haut- oder Sklerenikterus, Juckreiz, gastrointestinale Blutung, Koagulopathie, Zunahme des Bauchumfanges oder psychische Veränderungen in Erscheinung treten (19). In der klinisch-körperlichen Untersuchung finden sich oft weitere Symptome der fortgeschrittenen Leberzirrhose, die als Blickdiagnose dienen können. Dazu zählen glatte rote Lippen und Zunge, Teleangiektasien bzw. Spider Naevi, Palmar-Plantarerythem, Dupuytren-Kontraktur und Kratzefloreszenzen bedingt durch Pruritus. Am Abdomen ist außerdem als Folge der portalen Hypertension sogenannte „Caput medusae“ zu erkennen (26).

1.2.1.6. Komplikationen

Die Leberzirrhose ist aufgrund ihrer Komplikationen berechtigterweise gefürchtet. Denn kommt es zu einer Dekompensation der Leber, steigt das Risiko für lebensbedrohliche Komplikationen wie zum Beispiel Aszites, spontan bakterielle Peritonitis, hepatische Enzephalopathie und Ösophagusvarizenblutungen als Folge der Portalen Hypertension (19).

1.2.1.7. Therapie

Die Behandlung der Leberzirrhose-PatientInnen hängt von den aufgetretenen Komplikationen ab. Diese werden symptomatisch medikamentös und/oder durch invasive Eingriffe therapiert. Nach einer genauen Untersuchung zur Feststellung eines Leberzirrhose-assoziierten Aszites gilt als First-line Therapie Natriumrestriktion und Diuretikagabe wie zum Beispiel Aldosteronantagonisten oder Furosemid. Bei therapierefraktärem Aszites gibt es invasive Therapiemöglichkeiten wie die Parazentese, peritoneal-venöse Shunts oder TIPS (27). Die Bedingungen für diese Eingriffe müssen vorab genau evaluiert werden. Für die Behandlung einer möglichen spontan bakteriellen Peritonitis muss vorher die Leukozytenanzahl in der Aszitesflüssigkeit bestimmt werden. Eine empirische Antibiotikaabdeckung zum Beispiel mit Cefotaxim und Albumingabe kommt in Frage, wenn die Zellanzahl die Grenze von 250 pro Kubikmillimeter übersteigt. Das Therapieziel für die hepatische Enzephalopathie, die eine Ausschlussdiagnose darstellt und mit Gedächtnis-, Persönlichkeit-, Konzentration-, und Reaktionszeitveränderungen klinisch apparent wird, ist unter anderem die Reduktion der Stickstoffbelastung im Darm. Über eine genaue Umsetzung der Therapie gibt es kontroverse Studien. Die portale Hypertension führt zur Bildung von Ösophagusvarizen, die aufgrund des permanent hohen Drucks im Venensystem zu Blutungen führen können. Um den portalen Druck zu senken, werden von der British Society of Gastroenterology Guidelines Beta-Blocker wie Propranolol und bei Unverträglichkeit oder Kontraindikation Isosorbid-mononitrat empfohlen (27). In der Behandlung vom hepatorenenalen Syndrom (HRS) kommen potente Vasokonstriktoren in Kombination mit Albumingabe zum Einsatz. Des Weiteren begünstigt die Mitbehandlung der portalen Hypertension und des Aszites die Entwicklung des HRS (28). Als Ultima Ratio, wenn die Standardtherapie und invasive Therapie zur Eindämmung der Komplikationen der Leberzirrhose versagt, sollte eine Lebertransplantation in Erwägung gezogen werden. Als potentielle Transplantatkandidaten sind PatientInnen zugelassen, bei denen ein fulminantes Leberversagen, dekompensierte Leberzirrhose oder ein hepatozelluläres Karzinom nachgewiesen werden können (27). Der MELD Score wird zur Einschätzung der 3-Monatssterblichkeit bei Leberzirrhose-PatientInnen verwendet um damit den richtigen Zeitpunkt und die Zuweisung zur Transplantation zu

wählen (29). Ein weiteres Klassifikationssystem zur Beurteilung des Schweregrades bei Leberzirrhose stellt der Child-Pugh-Score dar (30) (vgl. Tab.2).

Tabelle 2: Child-Pugh-Score

Punkte	1	2	3
Albumin-Konzentration im Serum in g/dl	>3,5	2,8-3,5	<2,8
Bilirubin-Konzentration im Serum in mg/dl	<2,0	2,0-3,0	>3,0
Quick-Wert in %	>70	40-70	<40
Aszites	kein	mäßig	viel
Hepatische Enzephalopathie	keine	Grad I-II	>Grad II
Child A: 5-6 Punkte; Child B: 7-9 Punkte; Child C: 10-15 Punkte			

Quelle: Artikel aus American Family Physician: Cirrhosis and chronic liver failure: complications and treatment

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1. Studie

2.1.1. Studiendesign und Patientenrekrutierung

Im Rahmen der Interventionsstudie „Probiotic Modulation of Gut Microflora in Cirrhosis: Influence on immune function and infection“ wurden die PatientInnen aus der Ambulanz der Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie oder der Abteilung für Transplantationschirurgie des Universitätsklinikums Graz rekrutiert und in eine doppelblinde, randomisierte und Placebo-kontrollierte Studie eingeschlossen.

2.1.2. Einschluss-und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- PatientInnen im Alter zwischen 18-80 Jahren
- klinische und radiologische Bestätigung der Zirrhose und/ oder durch Biopsie gesicherte Leberzirrhose jeglicher Ursache
- Zustimmung der PatientInnen

Ausschlusskriterien:

- Child Pugh Score > 11
- Alkoholkarenz weniger als 2 Wochen vor dem Zeitpunkt des Screenings
- klinischer Nachweis einer aktiven Infektion
- Antibiotische Therapie innerhalb von 7 Tagen vor der Aufnahme
- gastrointestinale Blutung innerhalb der letzten 2 Wochen
- Einnahme einer immunmodulierenden Substanz innerhalb des letzten Monats
- Gleichzeitige Einnahme von anderen Nahrungsergänzungsmitteln, die die Studie beeinflussen können
- Niereninsuffizienz (wie das hepatorenale Syndrom) Kreatinin > 1,7 mg/dL
- Hepatische Enzephalopathie (Stadium 2-4)
- Pankreatitis
- Andere Organversagen
- Hepatische oder extrahepatische Tumore

- Schwangerschaft
- Vermutete Non-Compliance gegenüber des Studienmedikaments

2.1.3. Studienmedikation

Das Probiotikum (Winlove-849) enthält Bifidobakterium bifidum W23, B. lactis W52, Lactobacillus acidophilus W37, L. brevis W63, L. casei W56, L. salvarius W24, Lactococcus lactis W19, W58 bei einer Konzentration von $2,5 \times 10^9$ cfu/g. Die tägliche Dosis an Probiotikum beträgt 6g. Das Produkt wurde entwickelt um die intestinale Barriere zu stärken und die Translokation von schädigendem Inhalt aus dem Darmlumen in den Körper zu verhindern.

2.1.4. Randomisierung

Nach Erfüllung der Einschlusskriterien, werden 92 PatientInnen in 2 Gruppen zufällig mithilfe der Software Randomizer eingeteilt.

Gruppe 1: bekommt das vorher beschriebene Probiotikum

Gruppe 2: bekommt ein ähnlich aussehendes und schmeckendes Placebo ohne Bakterien. Die PatientInnen werden nach der Ätiologie ihrer Leberzirrhose (Alkohol vs. Kein Alkohol) und ob sie eine antibiotische Prophylaxe gegen spontane bakterielle Peritonitis erhalten haben unterteilt.

2.1.5. Studiendurchführung

Jede/r PatientIn wird für 6 Monate mit der beschriebenen Studienmedikation und einem Placebo behandelt. Danach wird die Intervention abgesetzt und es folgt eine 6- monatige Follow-up Periode. Die PatientInnen wurden zu vier Zeitpunkten am Institut der Inneren Medizin in der Abteilung der Gastroenterologie und Hepatologie bezüglich ihrer subjektiv empfundenen Wahrnehmung der Lebensqualität anhand des SF-36 Fragebogens befragt. Die gesundheitsbezogene Lebensqualität wurde anhand des genannten Fragebogens zur Baseline, nach 3 und 6 Monaten Intervention sowie nach 6-monatiger Follow-up Periode erhoben.

2.2. SF-36 Fragebogen

2.2.1. Aufbau

Der Fragebogen SF-36 (Short form 36) beinhaltet 36 Fragen zur subjektiven Gesundheit der PatientInnen. Fragen werden als Items bezeichnet, die sowohl mit mehreren Unterfragen als auch Einzelitems auftreten können. Die Fragen werden zu acht Subskalen bzw. Dimensionen zusammengefasst. Während alle Items sich auf die subjektive Gesundheit der letzten vier Wochen beziehen, fragt ein Item nach der Veränderung des allgemeinen Gesundheitszustandes der PatientInnen im Vergleich zum Vorjahr. Jede Skala ist durch einen Skalenwert kodiert. Dieser Wert entsteht durch die Addition von Item-Werten jeder Skala. Die Werte reichen von 0 (schlechte Lebensqualität) bis 100 (sehr gute Lebensqualität). Das bedeutet zum Beispiel für die Subskala der „Körperlichen Schmerzen“, dass ein niedriger Wert auf der Skala mit starken bzw. mehr Schmerzen verbunden ist und umgekehrt. Die Dimensionen repräsentieren die acht Bereiche der gesundheitsbezogenen Lebensqualität:

1. Körperliche Funktionsfähigkeit: bestimmte Tätigkeiten wie zum Beispiel Gehen, Treppensteigen, Heben, Bücken, sind durch den aktuellen Gesundheitszustand eingeschränkt
2. Körperliche Rollenfunktion: der aktuelle Gesundheitszustand erschwert die Durchführung von täglichen Aktivitäten. Das Ausmaß und die Qualität der geleisteten Arbeit wird als reduziert eingeschätzt.
3. Körperliche Schmerzen: Einschränkung der normalen Arbeit Zuhause und am Arbeitsplatz aufgrund von Schmerzen.
4. Allgemeine Gesundheitswahrnehmung: die subjektive Einschätzung der eigenen Gesundheit unter Berücksichtigung des aktuellen Zustandes.
5. Vitalität: subjektive Beurteilung über das Ausmaß der Lebenskraft und Energie
6. Soziale Funktionsfähigkeit: soziale Aktivitäten sind eingeschränkt aufgrund von physischen und psychischen Problemen
7. Emotionale Rollenfunktion: Leistungsminderung bei der Arbeit oder alltäglichen Aktivitäten

8. Psychisches Wohlbefinden: der psychische Allgemeinzustand zum Beispiel Depression, Angst etc.

2.2.2. Datenerhebung

Der SF-36 Fragebogens dient der Erfassung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität von PatientInnen unabhängig des Alters oder aktuellen Gesundheitszustandes.

Die Bearbeitung dauert durchschnittlich zehn Minuten. Um die Evaluierung durchzuführen, wurden die PatientInnen nach bestimmten Zeitabständen in die Ambulanz der hepatologischen Abteilung bestellt und die Fragebögen von ihnen ausfüllen lassen.

2.2.3. Auswertung

Die 36 Items wurden von PatientInnen gemäß ihrer subjektiv empfundenen Gesundheit beantwortet. Die Berechnung der Subskalen bzw. der Summenskalen erfolgte in drei Schritten: Im ersten Schritt müssen 7 Items umgepolt werden. Diese Items sind nämlich so formuliert, dass höhere Werte eine schlechte Lebensqualität wiedergeben. Davon sind die Subskalen „Allgemeine Gesundheitswahrnehmung“ (11b, 11d), „Vitalität“ (Items 9a ,9e), „Soziale Funktionsfähigkeit“ (Item 6) und „Psychisches Wohlbefinden“ (Items 9d, 9h) betroffen. Das bedeutet, dass am Ende alle Item-Werte mit höheren Werten eine bessere Lebensqualität entsprechen und somit zur Berechnung der Skalenwerte herangezogen werden können. Zwei der 10 Items bedürfen einer Rekalibrierung, da sie nicht die Voraussetzung der Skalenbildung erfüllen. Das betrifft die Subskalen der „Allgemeine Gesundheitswahrnehmung“ (Item 1) und „Körperliche Schmerzen“ (Item 7, 8). Im zweiten Schritt werden die Skalenwerte berechnet, indem alle Items einer Skala addiert werden. Diese sogenannten Skalenrohwerter werden im dritten Schritt transformiert, sodass mithilfe einer Formel jeder Skalenrohwerter in eine Skala mit Werten von 0 bis 100 umgerechnet werden (4).

2.2.4. Interpretation

Es gibt drei Ansätze zur Interpretation der Skalen:

- 1) Je größer die Werte auf einer Skala, desto besser ist die gesundheitsbezogene Lebensqualität in der betreffenden Subskala.
- 2) Vergleich der Skalenwerte einer Person bzw. Population mit den alters- und geschlechtsgleichen einer anderen Population, die an der gleichen chronischen Erkrankung leiden oder einer gesunden Normpopulation.
- 3) Eine weitere Möglichkeit ist, die klinische Interpretation. Es werden klinische Parameter und die entsprechenden Daten zur Lebensqualität in Relation zueinander gesetzt. Denn eine Veränderung der klinischen Parameter kann sich auf die subjektiv empfundene Gesundheit auswirken und umgekehrt.

2.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach vollständiger Datenerhebung mithilfe des Statistikprogramms SPSS (Version 22.). Aus den Items ergaben sich durch Berechnungen und Transformierungen für jeden Zeitpunkt 8 Subskalen und 2 Summenskalen. Zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der T-Test angewendet. Da mit diesem Test keine Normalverteilung ermittelt wurde, erfolgte zum Vergleich der Probiotikum- und Placebo-Gruppe der Mann Whitney U-Test für nicht-parametrische unverbundene Stichproben. Um Änderungen im Verlauf der Studie innerhalb der jeweiligen Gruppe festzustellen, kam der Friedmann- Test zum Einsatz. Fehlende Daten in den Fragebögen wurden nach den Empfehlungen des SF-36 Handbuchs mithilfe von Mittelwerten ersetzt. Dabei gilt die Voraussetzung für die Berechnung eines Skalenwertes, dass ProbandInnen mindestens die Hälfte der Fragen innerhalb einer Skala beantworten müssen. Nicht berechenbare Werte wurden mithilfe der „Last observation carried forward“- Methode (LOCF) ersetzt.

Sowohl die Subskalen als auch die Summenskalen wurden mit den beschriebenen Tests analysiert. Beim Friedmann-Test gilt ein p-Wert $<0,025$ als statistisch signifikant, da es ein multiples Testverfahren darstellt. Der Mann-Whitney-U-Test wird mit einem Signifikanzniveau von 0,05 angegeben.

2.4. Arbeitshypothese/ Fragestellung

Ziel der prospektiven Studie war es unter anderem den Einfluss eines Multispezies- Probiotikums auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität von Leberzirrhose PatientInnen zu untersuchen.

Diese Arbeit ist nur ein Teil der großen Studie. Sie untersucht primär die Wirkung des Probiotikums Winlove 849 auf die Phagozytenkapazität der Neutrophilen bei Leberzirrhose-PatientInnen. Viele Studien haben gezeigt, dass Leberzirrhose-PatientInnen ein abgeschwächtes Immunsystem haben. Folglich leiden sie unter häufigen Infektionen, da die bakterielle Darmzusammensetzung und die Darmbarriere bei dieser Erkrankung gestört sind. Es kommt zu einer bakteriellen Translokation in die Leber, die eine Infektion auslöst. Mit jeder Infektion verschlechtert sich die Leberfunktion und schränkt die PatientInnen in ihrer Lebensqualität massiv ein (31) (vgl. Abb. 1).

Leberzirrhose- Lebensqualität



Medizinische Universität Graz

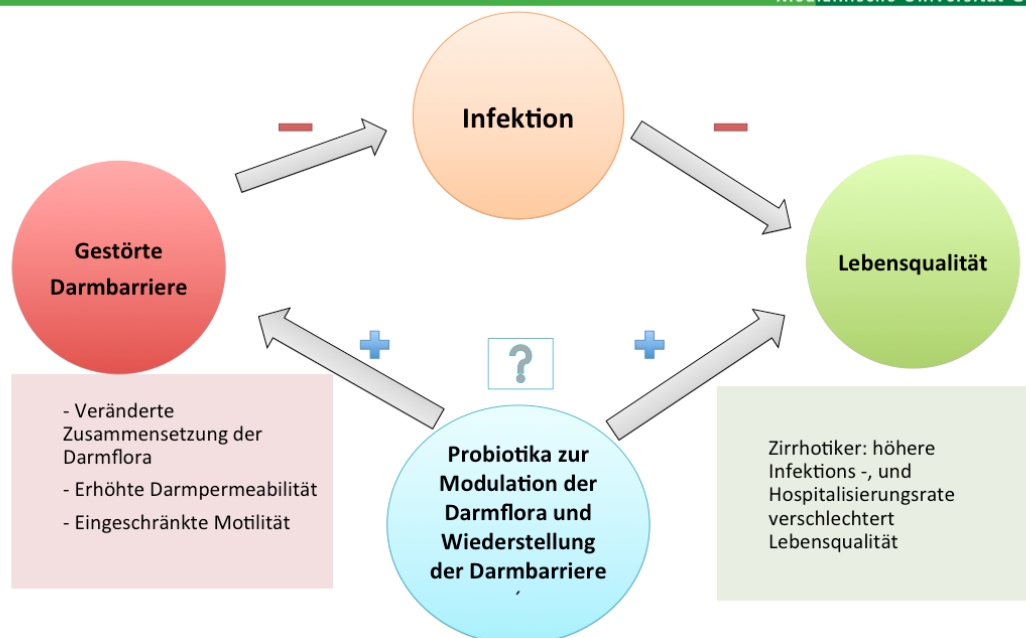


Abbildung 1 :Zusammenhang zwischen Leberzirrhose und Lebensqualität

3 ERGEBNISSE

3.1. Deskriptive Statistik

3.1.1. Beschreibung der Studienpopulation

Studienpopulation (Anzahl)

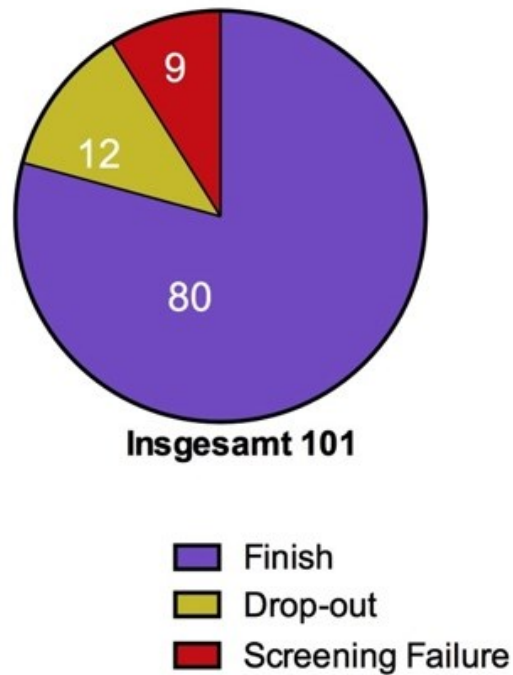


Abbildung 2: Studienpopulation

In einem Zeitraum von einem Jahr (Juli 2013 bis September 2014) wurden insgesamt 101 ProbandInnen mit Leberzirrhose unterschiedlicher Genese für die Studie rekrutiert. Im Laufe der Studie mussten 9 ProbandInnen aufgrund von Screening-Failures von der Studie ausgeschlossen werden. Weitere 12 ProbandInnen galten als Dropouts, von denen 11 der Placebo-Gruppe und ein/e ProbandIn der Probiotikum-Gruppe angehörten (vgl. Abb.2). Für den gesamten Studienzeitraum standen 80 ProbandInnen zur Verfügung. Der Probiotikum-Gruppe waren 44 und der Placebo-Gruppe 36 ProbandInnen mit Leberzirrhose zugeteilt.

3.1.2. Epidemiologische Daten der Studienpopulation

Die endgültige Studienpopulation bestehend aus 80 ProbandInnen wurde nach demographischen und klinischen Faktoren wie Geschlecht, Ätiologie, Altersgruppe und Stadium analysiert. In dieser Studie waren Männer mit 75 % (N=60) und Frauen mit 25 % (N=20) vertreten. Bei etwa der Hälfte der Studienpopulation wurde die Ursache der Leberzirrhose auf den Alkoholabusus zurückgeführt. Der restliche Anteil verteilte sich auf die Hepatitis C (18%) und andere Ursachen (31%). Die Mehrheit der ProbandInnen waren zwischen 61 und 75 Jahren alt (43%). Unter 50 Jahren machten ProbandInnen einen Anteil von 21 % und im mittleren Alter von 51-60 Jahren einen Anteil von 36 % aus. Von 80 ProbandInnen hatten 61 das Leberzirrhose-Stadium A und 17 ProbandInnen das Stadium B. Lediglich 2 TeilnehmerInnen befanden sich im Stadium C (vgl. Abb.3).

Geschlecht	Ätiologie	Altersgruppen	Stadium
<ul style="list-style-type: none">• Männer: 75% (N=60)• Frauen: 25% (N=20)	<ul style="list-style-type: none">• Alkohol:51%• HCV: 18%• Andere:31%	<ul style="list-style-type: none">• Bis-50J.:21%• 51-60 J.:36 %• 61-75 J.:43 %	<ul style="list-style-type: none">• A: 61 (76%)• B: 17 (21%)• C: 2 (3%)

Abbildung 3: Epidemiologische Daten der Studienpopulation

3.2. Explorative Statistik

3.2.1. Vergleich der SF-36 Summenskalen beider Interventionsgruppen

3.2.1.1 „Physische Gesundheit“

Die Tabelle 3 veranschaulicht den Vergleich der „Physischen Gesundheit“ zwischen den Interventionsgruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten. Nach 3-monatiger Intervention nehmen die Werte in der Probiotikum-Gruppe stärker zu als in der Placebo-Gruppe, was mit einem p-Wert von 0,08 einen tendenziellen Unterschied zwischen den Gruppen darstellt. Nach der kurzfristigen Verbesserung des physischen Gesundheitszustandes in der Probiotikum-Gruppe kommt es im Studienverlauf zu einer minimalen Verschlechterung im Vergleich zur Baseline. ProbandInnen in der Placebo-Gruppe zeigen bis zum Ende der Follow-up Periode eine minimale Verbesserung der physischen Gesundheit (vgl. Abb.4). Die Änderungen führen zu keinem Zeitpunkt zu statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Probiotikum- und Placebo-Gruppe. Über den zeitlichen Verlauf erreicht keine der Gruppen eine statistisch signifikante Änderung in der physischen Summenskala (Probiotikum: $p=0,45$; Placebo: $p=0,28$; vgl. Tab. 5)

Tabelle 3 :Vergleich der "Physischen Gesundheit "

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)			*p-Wert	PLACEBO (N=36)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil		1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	49,25	70,00	82,94	0,26	45,69	59,09	81,69
3 Monate Intervention	52,75	76,78	87,69	0,08	45,24	62,88	80,63
6 Monate Intervention	50,75	68,38	82,97	0,47	47,77	63,88	81,00
6 Monate Follow-up	43,31	68,13	82,75	0,91	40,66	67,00	89,19

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

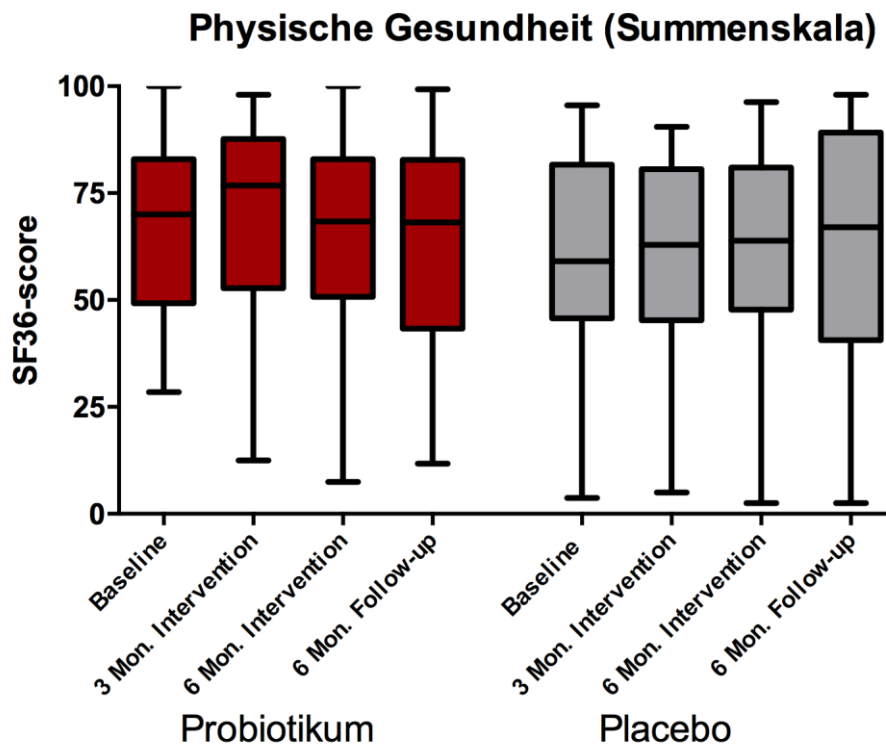


Abbildung 4: Vergleich der „Physischen Gesundheit“

3.2.1.2 „Psychische Gesundheit“

Die Tabelle 4 stellt den Vergleich der beiden Interventionsgruppen in den einzelnen Messzeitpunkten für die „Psychische Gesundheit“ dar. Die Werte für die psychische Summenskala bleiben in der Probiotikum-Gruppe im Verlauf stabil. In der Placebo-Gruppe findet kurzfristig eine leichte Verbesserung der psychischen Gesundheit nach den ersten 3 Monaten der Intervention statt, die sich noch vor Absetzen der Studienmedikation wieder verschlechtert. Es ergeben sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der psychischen Gesundheit zwischen den beiden Gruppen. Auch über den zeitlichen Verlauf erreicht weder die Probiotikum-noch die Placebo-Gruppe eine statistische Signifikanz (Probiotikum: $p=0,06$; Placebo: $p=0,88$; vgl. Tab.5).

Tabelle 4 : Vergleich der "Psychischen Gesundheit"

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)			p-Wert*	PLACEBO (N=36)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil		1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	54,27	76,94	85,22	0,23	46,40	63,96	83,75
3 Monate Intervention	57,34	77,02	88,84	0,14	50,04	69,61	81,72
6 Monate Intervention	56,05	77,63	86,09	0,26	41,56	63,38	85,47
6 Monate Follow-up	47,55	77,44	89,50	0,13	36,91	66,19	87,34

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

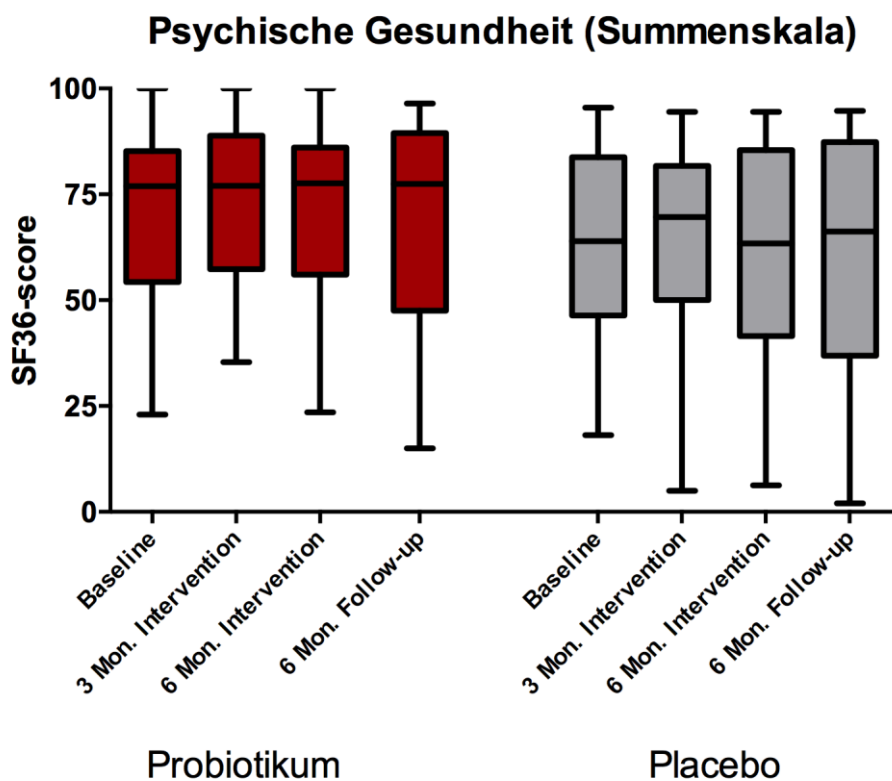


Abbildung 5: Vergleich der „Psychischen Gesundheit“

3.2.2. Vergleich der zwei Summenskalen und acht Subskalen des SF-36 Fragebogens im zeitlichen Verlauf

Die Tabelle 5 zeigt zusammenfassend die acht Subskalen und zwei Summenskalen des SF-36 mit den Ergebnissen des Friedmann-Tests für die Interventionsgruppen. Es zeigt sich in der Probiotikum-Gruppe nach 3 Monaten Intervention ein starker Trend zu einer verbesserten „Körperlichen Rollenfunktion“ ($p=0,03$), der in Tabelle 7 mit ausführlichen Daten dargestellt wird. Alle Ergebnisse sind weder in der Probiotikum-Gruppe noch in der Placebo-Gruppe über den zeitlichen Verlauf statistisch signifikant.

Tabelle 5: Vergleich der Summenskalen und Subskalen des SF-36 Fragebogens im Studienverlauf

Subskala des SF-36	p- Wert*	
	Probiotikum	Placebo
Körperliche Funktionsfähigkeit	0,87	0,64
Körperliche Rollenfunktion	0,03	0,34
Körperliche Schmerzen	0,24	0,63
Allg. Gesundheitswahrnehmung	0,95	0,66
Emotionale Rollenfunktion	0,50	0,18
Soziale Funktionsfähigkeit	0,47	0,49
Psychisches Wohlbefinden	0,32	0,35
Vitalität	0,26	0,75
Summenskala des SF-36		
Physische Gesundheit	0,45	0,28
Psychische Gesundheit	0,06	0,89

* Friedmann-Test, Signifikanz $\leq 0,025$

3.2.2.1. Vergleich der „körperlichen Funktionsfähigkeit“

Die Tabelle 6 stellt den Vergleich der Werte für die Subskala „Körperliche Funktionsfähigkeit“ zwischen den beiden Interventionsgruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten dar. Die Werte nehmen im Laufe der Studie bei beiden Gruppen stetig zu. Am Ende der Follow-up Phase haben die ProbandInnen beider Gruppen eine bessere „Körperliche Funktionsfähigkeit“ als vor der Intervention. Die Veränderungen erreichten allerdings keine statistische Signifikanz (vgl. Abb. 6).

Tabelle 6 : Vergleich der "Körperlichen Funktionsfähigkeit"

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)			p-Wert*	PLACEBO (N=36)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil		1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	52,50	75,00	95,00	0,38	50,00	70,00	93,75
3 Monate Intervention	61,25	81,75	90,00	0,44	55,00	75,00	90,00
6 Monate Intervention	57,50	80,00	90,00	0,91	55,25	77,50	90,00
6 Monate Follow-up	55,00	81,75	93,75	0,74	52,50	80,00	95,00

*Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

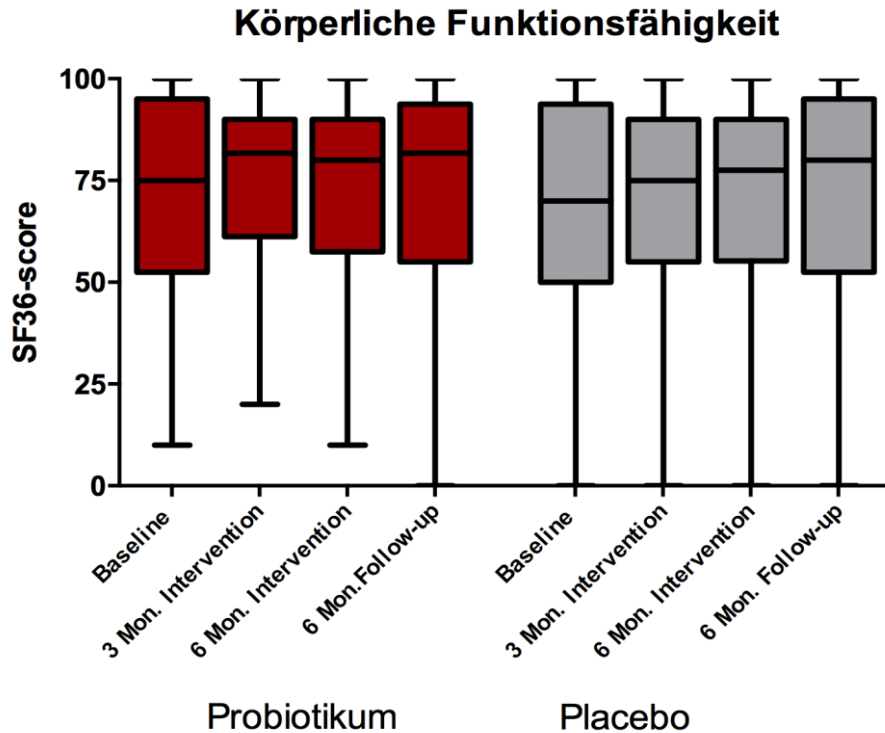


Abbildung 6: Vergleich der "Körperlichen Funktionsfähigkeit"

3.2.2.2. Vergleich der „Körperlichen Rollenfunktion“

In der Tabelle 7 werden die Werte für die Subskala des SF-36 „Körperliche Rollenfunktion“ für beide Gruppen zu den Messzeitpunkten gegenübergestellt. Interessant ist die deutliche Erhöhung der Werte in der Probiotikum-Gruppe nach drei Monaten Intervention ($p=0,03$). Besonders erwähnenswert ist, dass mehr als die Hälfte der ProbandInnen der Probiotikum-Gruppe keinerlei Einschränkungen ihrer täglichen Tätigkeiten aufgrund ihres körperlichen Gesundheitszustandes bemerken. Die Werte nehmen noch vor Absetzen des Probiotikums ab. In der Placebo-Gruppe sind keine derartigen Änderungen zu beobachten. Nach der Follow-up Phase zeigt sich in beiden Gruppen eine Abnahme der Werte im Vergleich zu 6 Monaten nach Intervention.

Tabelle 7: Vergleich der "Körperlichen Rollenfunktion"

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)			*p-Wert	PLACEBO (N=36)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil		1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	25,00	75,00	100,00	0,23	00,00	62,50	100,00
3 Monate Intervention	31,25	100,00	100,00	0,17	3,125	62,50	100,00
6 Monate Intervention	25,00	87,50	100,00	0,14	00,00	75,00	100,00
6 Monate Follow-up	00,00	71,25	100,00	0,77	00,00	62,50	100,00

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

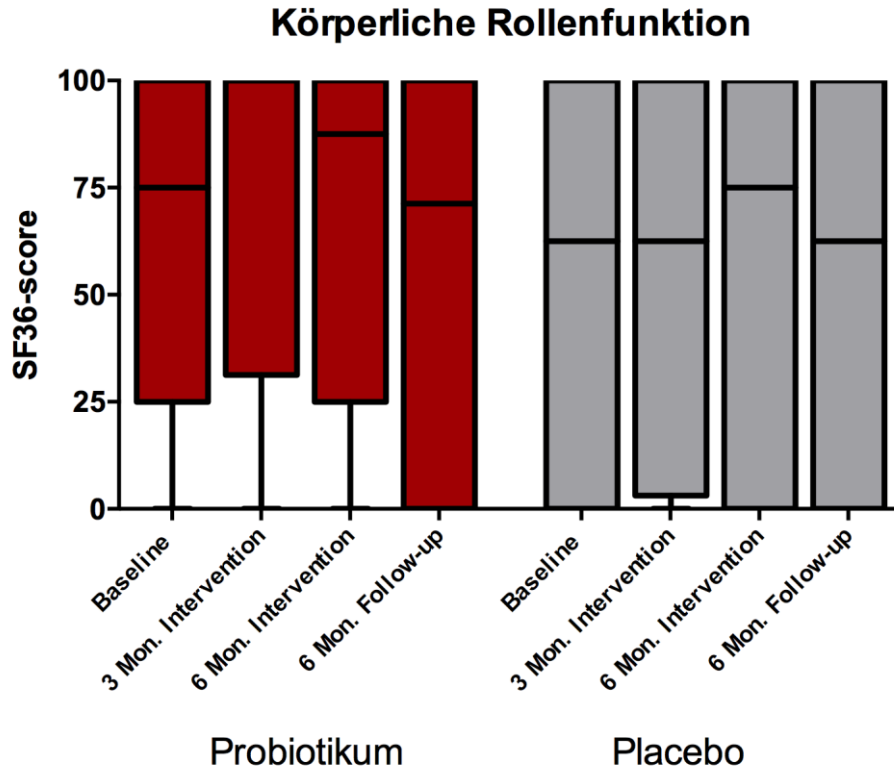


Abbildung 7: Vergleich der "Körperlichen Rollenfunktion"

3.2.2.3. Vergleich der „Körperlichen Schmerzen“

In der Tabelle 8 werden die Werte für die Subskala „Körperliche Schmerzen“ für Probiotikum- und Placebo-Gruppe zu den Messzeitpunkten dargestellt. Die Werte sagen aus, wie stark die körperlichen Schmerzen Einfluss auf die Arbeit im häuslichen Bereich oder außerhalb des Hauses ausüben. Je höher ein Wert, desto geringer die Beeinträchtigung.

In der Probiotikum-Gruppe kommt es zu einer minimalen Abnahme der Werte während des Interventionszeitraums. Dies sagt aus, dass ProbandInnen dieser Gruppe nicht nur minimal mehr körperliche Beschwerden haben, sondern auch dadurch in ihrer alltäglichen Arbeit geringgradig beeinträchtigt sind. In der Placebo-Gruppe wird 6 Monate nach der Intervention eine minimale Verbesserung der körperlichen Beschwerden im Vergleich zur Baseline beobachtet. Allerdings zeigen diese Änderungen keine statistische Signifikanz (vgl. Abb.8).

Tabelle 8: Vergleich der "Körperliche Schmerzen"

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)				*p-Wert	PLACEBO (N=36)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil	1. Quartil		Median	3. Quartil	
Baseline	54,50	80,00	100,00	0,08	51,25	67,00	84,00	
3 Monate Intervention	51,00	77,00	100,00	0,06	41,00	62,00	100,00	
6 Monate Intervention	52,00	74,00	96,00	0,92	43,50	73,00	100,00	
6 Monate Follow-up	44,25	74,00	100,00	0,55	33,50	74,00	100,00	

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

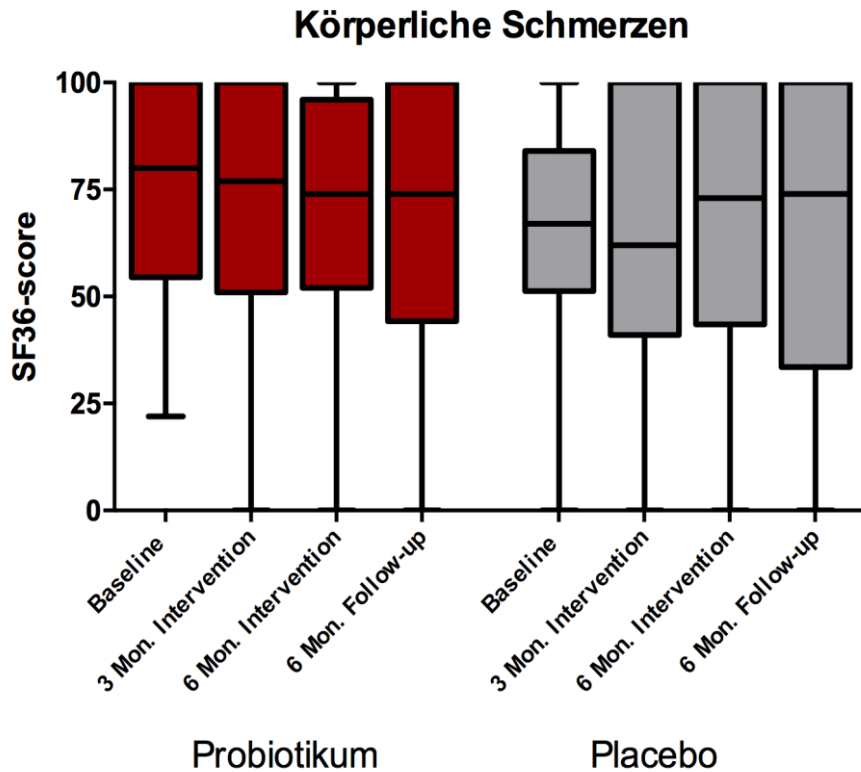


Abbildung 8: Vergleich der "Körperlichen Schmerzen"

3.2.2.4. Vergleich der „Allgemeinen Gesundheitswahrnehmung“

Der Vergleich beider Interventionsgruppen für die Subskala „Allgemeine Gesundheitswahrnehmung“ zu den Messzeitpunkten wird in Tabelle 9 veranschaulicht. Insgesamt erfahren die ProbandInnen durch die Intervention keine wesentlichen Änderungen in der Wahrnehmung ihres allgemeinen Gesundheitszustandes. Der Median für die „Allgemeine Gesundheitswahrnehmung“ ist in der Probiotikum-Gruppe am Ende der Follow-up-Periode minimal höher als im gesamten Interventionszeitraum, während sie in der Placebo-Gruppe minimal unter dem Baseline-Wert liegt. Die Testergebnisse ergeben allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (vgl. Abb.9).

Tabelle 9: Vergleich der "Allgemeinen Gesundheitswahrnehmung"

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)			*p-Wert	PLACEBO (N=36)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil		1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	45,00	57,00	72,00	0,94	47,00	59,50	67,00
3 Monate Intervention	47,00	58,50	72,00	0,54	47,00	60,38	67,00
6 Monate Intervention	44,56	57,00	72,00	0,84	40,50	62,00	72,00
6 Monate Follow-up	42,00	59,50	77,00	0,62	35,50	57,00	71,19

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

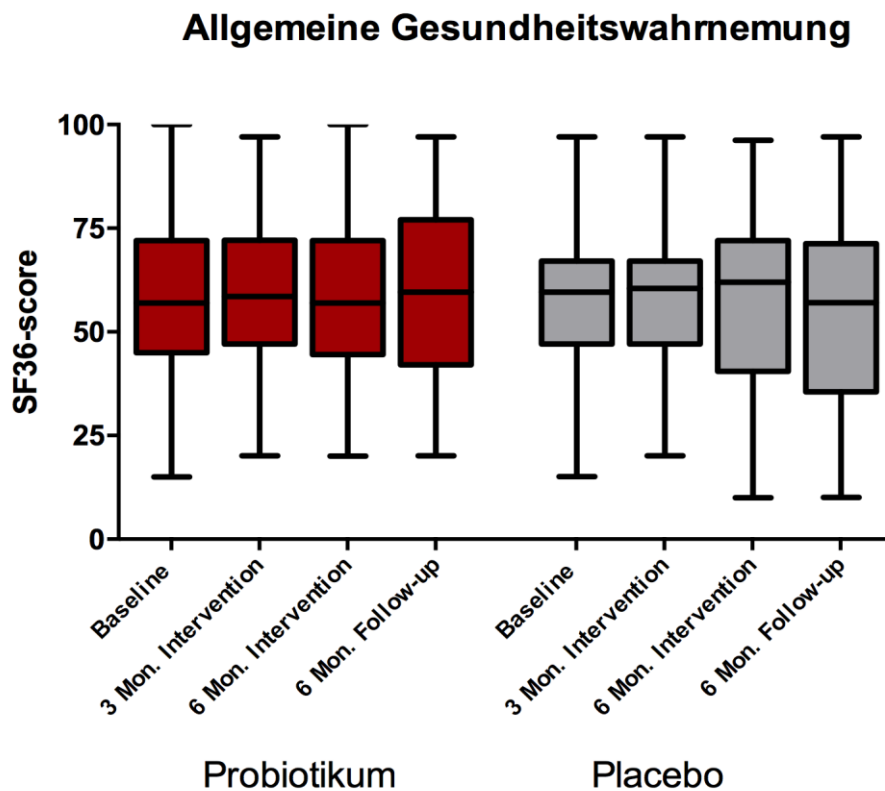


Abbildung 9: Vergleich der "Allgemeinen Gesundheitswahrnehmung"

3.2.2.5. Vergleich der „Vitalität“

Die Tabelle 10 veranschaulicht die Ergebnisse der Subskala „Vitalität“ für die Probiotikum- und Placebo-Gruppe zu den Messzeitpunkten. ProbandInnen beider Gruppen fühlen sich während der Intervention und nach der Follow-up Periode nicht wesentlich energievoller als vor der Intervention (vgl. Abb.10).

Tabelle 10: Vergleich der "Vitalität"

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)			p-Wert*	PLACEBO (N=35)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil		1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	41,25	55,00	70,00	0,288	30,00	50,00	70,00
3 Monate Intervention	50,00	60,00	75,00	0,153	40,00	50,00	70,00
6 Monate Intervention	46,25	60,00	70,00	0,195	40,00	50,00	70,00
6 Monate Follow-up	45,00	60,00	70,00	0,320	40,00	55,00	70,00

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

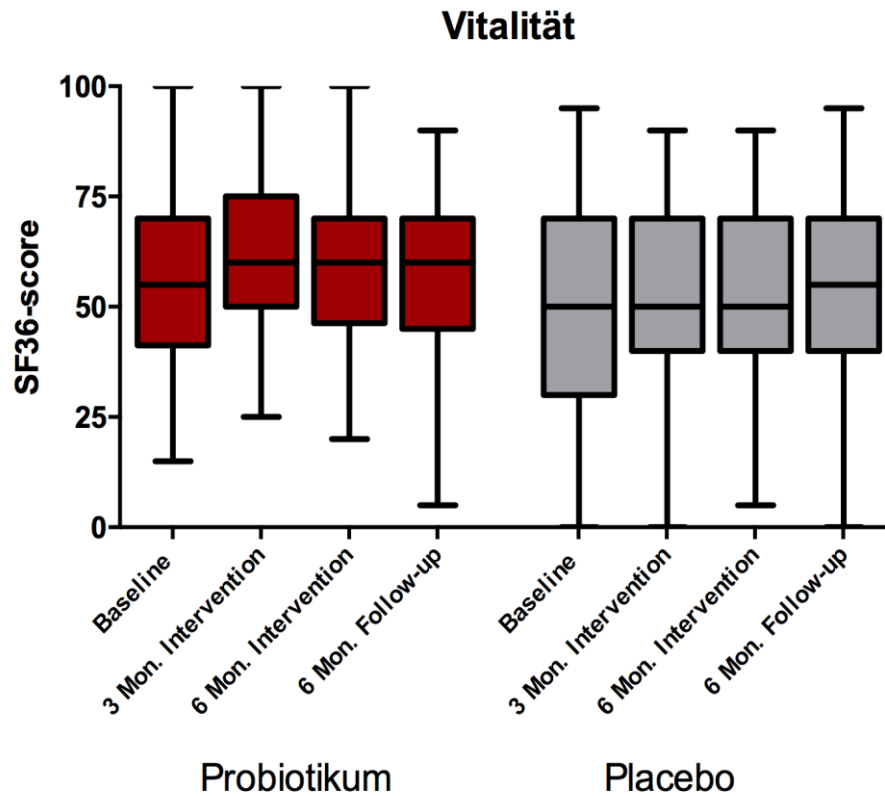


Abbildung 10: Vergleich der „Vitalität“

3.2.2.6. Vergleich der „sozialen Funktionsfähigkeit“

In der Tabelle 11 werden die Ergebnisse der Subskala „ Soziale Funktionsfähigkeit“ für die beiden Interventionsgruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten dargestellt. An zwei Messzeitpunkten zeigt die Probiotikum-Gruppe signifikant bessere Werte für die „Soziale Funktionsfähigkeit“. Nach drei Monaten ergeben sich für die Probiotikum-Gruppe signifikant bessere Werte im Vergleich zu Placebo-Gruppe ($p=0,042$). Interessanterweise zeigen sich in der Probiotikum-Gruppe auch nach dem Follow-up deutlich bessere Werte im Vergleich zur Placebo-Gruppe ($p=0,019$). Die ProbandInnen der Probiotikum-Gruppe sind nun in ihren sozialen Aktivitäten weniger beeinträchtigt als unter dem Probiotikum (vgl. Abb. 11).

Tabelle 11: Vergleich der "Sozialen Funktionsfähigkeit"

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)			*p-Wert	PLACEBO (N=36)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil		1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	65,63	87,50	100,00	0,088	62,50	75,00	87,50
3 Monate Intervention	75,00	87,50	100,00	0,042	62,50	75,00	100,00
6 Monate Intervention	62,50	87,50	100,00	0,238	50,00	75,00	100,00
6 Monate Follow-up	62,50	100,00	100,00	0,019	50,00	75,00	100,00

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

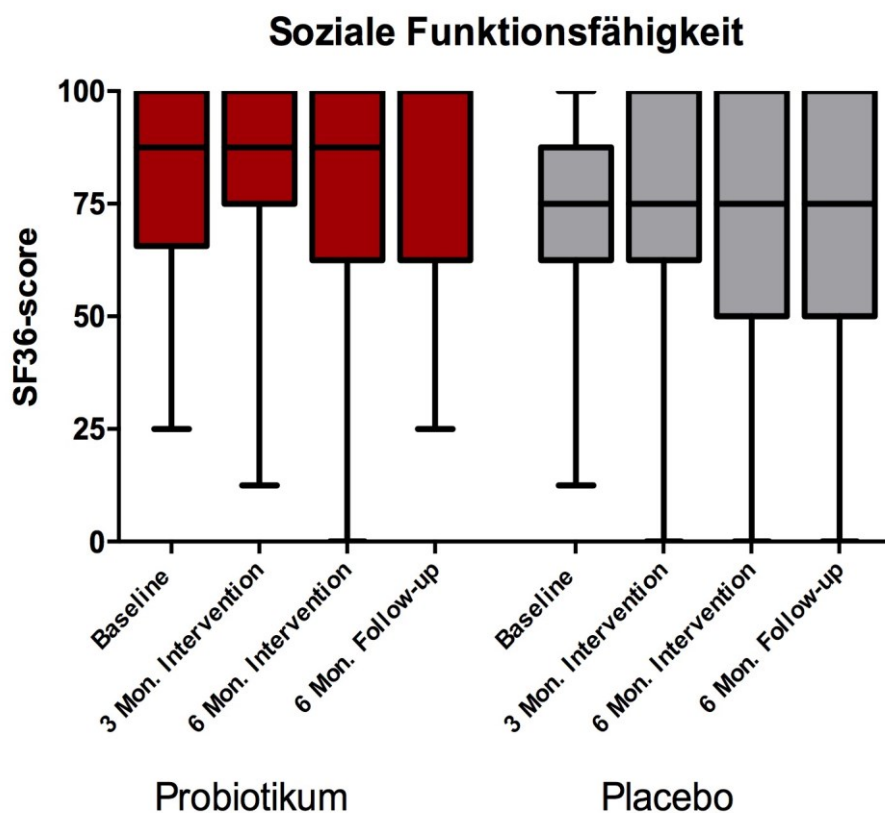


Abbildung 11: Vergleich der "Sozialen Funktionsfähigkeit"

3.2.2.7. Vergleich der „Emotionalen Rollenfunktion“

Wie die Tabelle 12 zeigt, werden die Werte der „Emotionalen Rollenfunktion“ für die Probiotikum- und Placebo-Gruppe zu den Messzeitpunkten dargestellt. Die Tests ergeben keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen. Die Studienmedikation hat bezogen auf die „Emotionale Rollenfunktion“ kaum Einfluss auf die ProbandInnen (vgl. Abb.12).

Tabelle 12: Vergleich der "Emotionalen Rollenfunktion"

Zeitpunkt	PROBIOTIKUM (N=44)			*p-Wert	PLACEBO (N=36)		
	1. Quartil	Median	3. Quartil		1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	33,33	100,00	100,00	0,651	00,00	100,00	100,00
3 Monate Intervention	33,33	100,00	100,00	0,750	41,67	100,00	100,00
6 Monate Intervention	33,33	100,00	100,00	0,471	00,00	100,00	100,00
6 Monate Follow-up	1,67	100,00	100,00	0,446	00,00	100,00	100,00

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

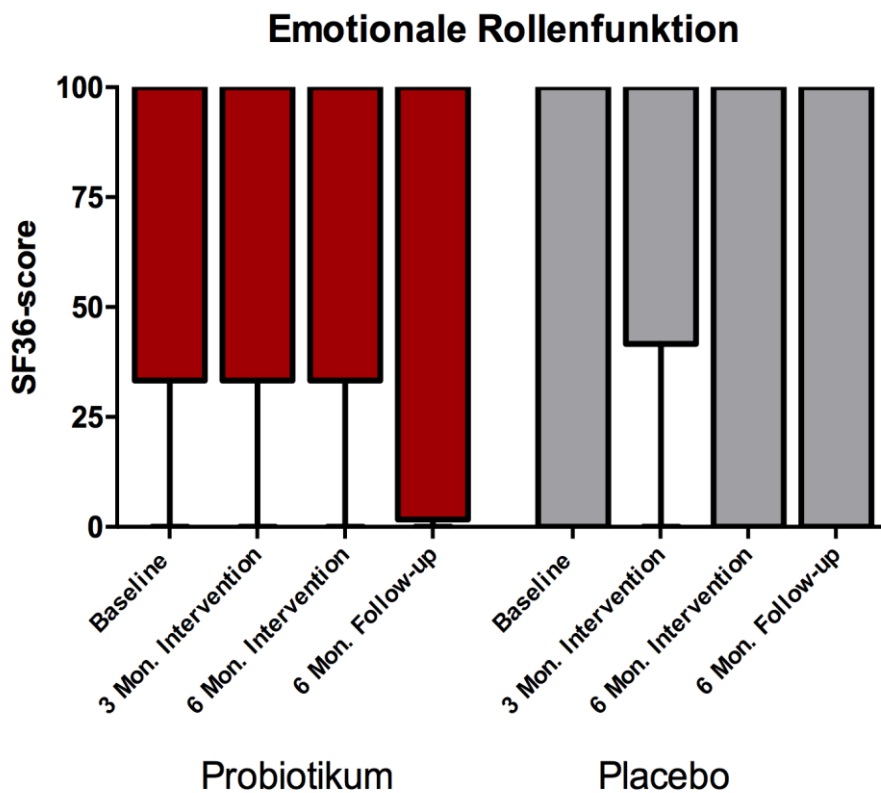


Abbildung 12: Vergleich der "Emotionalen Rollenfunktion"

3.2.2.8. Vergleich des „Psychischen Wohlbefindens“

In der Tabelle 13 wird der Vergleich der Interventionsgruppen für die Subskala „Psychisches Wohlbefinden“ an den vier Zeitpunkten dargestellt. Dabei ergibt sich nach 3-monatiger Intervention signifikant bessere Werte in der Probiotikum-Gruppe (0,003). Die ProbandInnen dieser Gruppe zeigen Verbesserungen des psychischen Wohlbefindens, d.h. sie leiden weniger unter Angst- und/oder depressiven Zuständen. Die ProbandInnen in der Placebo-Gruppe hingegen haben minimale Verbesserungen zu diesem Zeitpunkt angeben (vgl. Abb.13).

Tabelle 13: Vergleich des "Psychischen Wohlbefindens"

	PROBIOTIKUM (N=44)				PLACEBO (N=35)		
Zeitpunkt	1. Quartil	Median	3. Quartil	*p-Wert	1. Quartil	Median	3. Quartil
Baseline	64,00	75,50	84,00	0,139	55,00	64,00	84,00
Nach 3 Monaten	68,00	76,00	88,00	0,003	50,00	68,00	76,00
Nach 6 Monaten	60,00	76,00	88,00	0,213	56,00	68,00	80,00
Nach 12 Monaten	56,00	76,00	92,00	0,152	52,00	72,00	84,00

* Mann-Whitney-U-Test, Signifikanz $\leq 0,05$

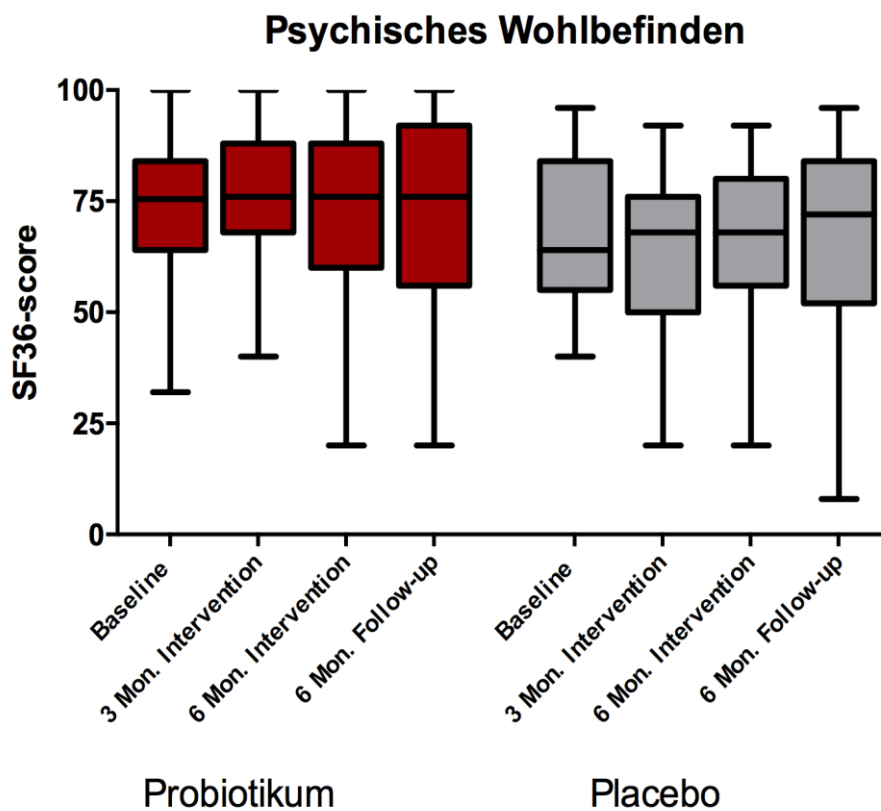


Abbildung 13: Vergleich des "Psychischen Wohlbefindens"

4. DISKUSSION

Diese Arbeit hat sich mit der Fragestellung beschäftigt, ob sich die gesundheitsbezogene Lebensqualität (HRQOL) bei Leberzirrhose PatientInnen unter Probiotikum-Gabe ändert. Die Mehrheit der ProbandInnen (43%) war zwischen 61-75 Jahre alt. Drei Viertel der Studienpopulation waren männlich. Alkohol stellt die häufigste Ursache der Leberzirrhose dar, gefolgt von den viral verursachten Leberzirrhosen. Dies ist eine typische Zusammensetzung der Studienpopulation, die man auch in anderen Zirrhose-Studien findet (32). Die HRQOL hat in den vergangenen Jahren als klinisches Messinstrument in klinischen und epidemiologischen Studien zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie ist ein wichtiger Bestandteil der Evaluierung von therapeutischen Interventionen in der Hepatologie geworden (33). Patienten die an chronischen Erkrankungen wie zum Beispiel die Leberzirrhose leiden, zeigen eine reduzierte körperliche und psychische HRQOL als die Normpopulation (34). In einer Meta-Analyse von HRQOL-Studien wurde gezeigt, dass die psychische Gesundheit bei chronisch-erkrankten Menschen einen größeren Einfluss auf HRQOL hat als die körperliche (35).

Die hier beschriebene Studie ist Teil eines größeren Projekts, in dem die Möglichkeit der Beeinflussung des Darm-Mikrobioms durch ein Probiotikum auf verschiedene Aspekte der Leberzirrhose (Immunsystem, Darmbarriere, Leberfunktion, Infektionsraten, Ernährung, Lebensqualität) untersucht wird.

Das Darm-Mikrobiom hat wichtige Funktionen wie zum Beispiel die Aufrechterhaltung der mikrobiellen Darmbarriere gegen mögliche pathogene Keime. Des Weiteren beeinflusst das Darm-Mikrobiom die Motilität und Durchblutung der Darmwand, aktiviert das intestinale Immunsystem, sorgt für Vitaminproduktion und eine Reduzierung der bakteriellen Translokation (36-38). Bei Leberzirrhose sind der Aufbau und die Funktion des Darm-Mikrobioms beeinträchtigt (39). Dies führt zu bakterieller Translokation in den extraintestinalen Raum wie mesenterielle Lymphknoten, Leber und Milz (40). Die Dünndarmfehlbesiedlung und das Phänomen der bakteriellen Translokation verursachen bei Leberzirrhose-PatientInnen Infektionen wie zum Beispiel spontan bakterielle Peritonitis (41). Eine Möglichkeit, die Zusammensetzung des Darm-Mikrobioms zu beeinflussen, ist die Gabe von Probiotika (42). Probiotika sind

lebenden Mikroorganismen, die, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden, gesundheitsfördernde Eigenschaften haben (43). Die häufigsten bakteriellen Stämme, die in einem Probiotikum verarbeitet werden, gehören der Familie der Laktobazillen, Bifidobakterien und Enterokokken an (44-46). Bei PatientInnen mit Leberzirrhose liegt eine reduzierte Anzahl an Bifidobakterien vor. Unter der Gabe eines Bifidobakterium-enthaltendes Probiotikums erhöhte sich die Anzahl dieses Bakteriums signifikant (39). Die Studie von Adawi et al zeigte, dass die Gabe von verschiedenen Laktobazillen und einem Bifidobakterien-Stamm an Ratten mit einem akuten Leberschaden unterschiedliche Auswirkung auf die bakterielle Translokation und hepatozellulärem Schaden hatte. Die Laktobazillenstämme reduzierte die bakterielle Translokation und den hepatozellulären Schaden, während der Stamm des Bifidobakterium animalis NM2 die bakterielle Translokation verstärkte und den hepatozellulären Schaden nicht beeinflusste (47). In einer Pilotstudie von Loguercio et al bekamen PatientInnen, die an einem Leberschaden unterschiedlicher Ursache (HCV, Alkohol, NASH) erkrankt waren, ein Multispezies-Probiotikum (Laktobazillus (L). acidophilus, L. bifidus, L. rhamnosus, L. plantarum, L. salvarius, L. bulgarius, L.lactis, casei, L. breve + Fructooligosacchariden + Vitamine). Das Probiotikum verbesserte die Leberwerte in allen Patientengruppen, während die Auswirkungen auf den oxidativen Stress und Zytokine nicht einheitlich waren. Den stärksten Effekt des Probiotikums wurde bei PatientInnen mit alkoholischer Leberzirrhose gesehen, bei denen sich alle Parameter der Leberfunktion deutlich verbessert hatten. Diese Studien zeigen, dass die Wirksamkeit eines Probiotikums von der Ätiologie der Leberzirrhose abhängig ist (48). Weiters lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studien herleiten, dass der Einsatz von Probiotika und die damit ausgewählten Bakterienstämme von der zu behandelnden Erkrankung abhängt. Timmerman et al untersuchte den Unterschied von Funktionalität und Wirksamkeit zwischen Einzelstamm, Multistamm und Multispezies Probiotika. Timmermans Studienergebnisse ergaben, dass ein Multispezies Probiotikum bei bestimmten Krankheitszuständen wirksamer ist als Einzelstamm-Probiotika zum Beispiel bieten sie eine bessere intestinale Adhäsion verglichen mit Einzelstamm-Probiotika (49). Chapman et al beschreibt in seinem Review die bessere Wirksamkeit eines Multispezies-Probiotikum im Vergleich zu Einzelstamm-Probiotika. Die Zahl der Studien hierfür sind jedoch begrenzt. Ob die bessere

Wirksamkeit auf die synergistische Interaktionen zwischen den einzelnen Stämmen zurückzuführen ist oder auf die hohe Dosis des Probiotikums wie in einigen Studien, ist bisher unklar (50). Laut aktueller Studienlage gibt es in der Probiotikatherapie speziell bei Leberzirrhose-PatientInnen kein Bedenken hinsichtlich der Sicherheit des Probiotikums. Nur bei immunsupprimierten und kritisch kranken Menschen sollte eine Therapie mit Probiotika nach sorgfältiger Abwägung von Vor- und Nachteilen für die PatientInnen in Betracht gezogen werden (51). In akuten Zuständen wie die akute Pankreatitis konnte ein Multispezies-Probiotikum die infektiösen Komplikationen nicht reduzieren und war im Gegenteil mit einem erhöhten Risiko an Infektionen vergesellschaftet (52). Deshalb ist es sehr wichtig, sowohl die Wirksamkeit als auch die Sicherheit für jeden einzelnen Stamm oder jede Kombination von bakteriellen Stämmen zu überprüfen bevor sie zum Einsatz kommen. Die Bakterienstämme unserer Studienmedikation Winlove-849 sind gut erforscht und ihre Charakteristika durch zahlreiche Studien beschrieben. Es ist ein Multispezies-Probiotikum mit acht Stämmen von drei Spezies (*Bifidobacterium (B) bifidum*, *B. lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. salivarius*, *Lactococcus lactis* W19, W58). All diese Bakterienstämme wurden in Studien an Leberzirrhose-PatientInnen mit äthyltoxischer Genese verabreicht und positive Effekte auf die Mortalität und Infektionsrate nachgewiesen (53-55). Das besondere an unserer Studie ist, dass nicht der klinische Outcome unter Probiotika-Therapie evaluiert wurde, sondern die gesundheitsbezogene Lebensqualität der Leberzirrhose-PatientInnen. In unserer aktuellen Studie konnten wir zeigen, dass bereits nach 3-monatiger Intervention in der Probiotikum-Gruppe die psychische Lebensqualität sich in den Subskalen „Soziale Funktionsfähigkeit“ und „Psychisches Wohlbefinden“ im Gegensatz zur Placebo-Gruppe signifikant verbessert hat. Da bislang keine Daten aus vergleichbaren Studien zu unserer Forschungsfrage vorliegen, können wir zum Vergleich indirekt auf themenverwandte Forschungsergebnisse Bezug nehmen. In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie von Dhiman et al wurden PatientInnen mit Leberzirrhose über 6 Monate das Multispezies-Probiotikum VSL#3 verabreicht. Darunter kam es nicht nur zu einer signifikanten Abnahme der Hospitalisierungsrate wegen Besserung der hepatischen Enzephalopathie, sondern auch zu einer Reduzierung des Schweregrades der Leberzirrhose auf dem Child-Pugh-Score und MELD-Score (56). Die

ProbandInnen unserer Studie erhielten ebenfalls ein Multispezies-Probiotikum für 6 Monate, das in erster Linie auf die psychische Lebensqualität positiv gewirkt hat. Der Grund könnte in einer möglichen Besserung des Leberzirrhose-Stadiums liegen wie Dhiman et al in seiner Studie gezeigt hat. Daher hatten die PatientInnen wahrscheinlich weniger Krankenhausaufenthalte und konnten stattdessen besser ihren sozialen Aktivitäten nachgehen. Dadurch fühlten sie sich im Allgemeinen psychisch wohler. Des Weiteren steht das Erklärungsmodell der sogenannten „Darm-Gehirn-Achse“ zur Diskussion. Dieser Begriff beschreibt die enge Beziehung zwischen der mikrobiellen Darmflora und dem Gehirn. Studien haben gezeigt, dass eine Änderung der bakteriellen Darmflora über die Darm-Gehirn-Achse Einfluss auf die Gehirnfunktion bzw. Stressverhalten von Individuen haben kann (57). Denn es ist mittlerweile bekannt, dass Stress die intestinale Permeabilität und somit das Risiko für bakterielle Translokation durch die Darmmukosa erhöht. Dadurch dringen Bakterien durch die Darmbarriere direkt in Immunzellen und neuronalen Zellen des enterischen Nervensystems. Aufgrund dieses Mechanismus kann das Darm-Mikrobiom bei Stress einen Einfluss auf das zentrale Nervensystem durch das Immun- und enterische Nervensystem ausüben (58, 59). Obwohl der Einsatz von Probiotika in tierischen Studien an gesunden Mäusen den positiven Einfluss auf Angst- und depressiven Zuständen bestätigt hat (60-65), gibt es eine begrenzte Anzahl an publizierten Arbeiten bezüglich der Wirkung von Probiotika auf depressive Symptomatik bei Menschen.

Steenbergen et al führte eine Studie mit gleichem Studiendesign und Multispezies-Probiotikum wie unsere Studie durch um den Einfluss des Probiotikums auf die Entstehung von Depressionen bei gesunden ProbandInnen darzustellen (66). Tatsächlich zeigten die Ergebnisse von Steenbergen et al, dass gesunde ProbandInnen unter einer 4-wöchigen Gabe des Multispezies-Probiotikums weniger depressive Zustände entwickelt haben als die Kontrollgruppe. In einer randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Studie bekam eine Gruppe gesunder ProbandInnen für 30 Tage ein Probiotikum, das *Lactobacillus helveticus* R0052 und *B. longum* R0175 enthielt, und eine andere Gruppe ein Placebo zur Kontrolle. Die Evaluierung erfolgte mittels verschiedenen Fragebögen, die gezielt Angst, Depression und Stress sowie Bewältigungsstrategien thematisierten. Die ProbandInnen in der Probiotika-Gruppe zeigten signifikant weniger Stressepisoden als die Kontrollgruppe (67). In

einer anderen ähnlichen Studie verabreichte man gesunden ProbandInnen ein Probiotikum-enthaltendes Milchgetränk für drei Wochen. Vor der Intervention sowie 10 und 20 Tage nach der Einnahme des Probiotikum-Milchgetränks wurde die Stimmungslage und Kognition evaluiert. ProbandInnen, die anfangs im unteren Drittel der Skala für depressive Stimmung lagen, zeigten signifikante Verbesserungen nach der Probiotikum-Therapie (68). Im Gegensatz zu dieser Studie mit gesunden ProbandInnen, hatten unsere Studienpopulation mit Leberzirrhose nur nach den ersten drei Monaten signifikante Verbesserungen in den Subskalen „Psychisches Wohlbefinden“ und „Soziale Funktionsfähigkeit“ im Vergleich zum Placebo. Interessanterweise hatten ProbandInnen nach 6-monatiger Follow-up Periode weniger Beeinträchtigungen in ihren sozialen Aktivitäten als zur Baseline im Vergleich zur Placebo-Gruppe. In einer nicht-klinischen Stichprobe an StudienteilnehmerInnen fand Benton et al nach einer 3-wöchigen Intervention mit einem Probiotikum-enthaltendes Milchgetränk (*Lactobacillus casei* Shirota) heraus, dass ProbandInnen dieser Gruppe eine bessere Stimmung angaben als die Placebo-Gruppe. Erwähnenswert ist, dass die Besserung der Stimmungslage nur bei ProbandInnen mit bereits zur Baseline bestehender depressiver Symptomatik beobachtet wurde (68). Dieses Ergebnis könnte unsere Resultate in den Subskalen „Psychisches Wohlbefinden“ und „Soziale Funktionsfähigkeit“ unterstützen, da diese die psychische Situation der ProbandInnen mitberücksichtigen. PatientInnen mit Leberzirrhose leiden abhängig vom Zirrhose-Stadium an depressiver Symptomatik, die zu einer schlechteren Lebensqualität führen (69, 70). Jedoch gibt es bisher keine Studiendaten über den Einfluss einer Probiotikum-Therapie auf die psychische Lebensqualität bei Leberzirrhose-PatientInnen. Die anderen Subskalen der psychischen Summenskala des SF-36 Fragebogens wie „Emotionale Rollenfunktion“ und „Vitalität“ zeigten weder zwischen den Gruppen noch im zeitlichen Verlauf signifikanten Einfluss.

Die Analyse der körperlichen Subskalen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Nennenswert ist jedoch der starke Trend zu einer besseren „Körperlichen Rollenfunktion“ in der Probiotikum-Gruppe nach drei Monaten Intervention. Anscheinend werden unter dem Multispezies-Probiotikum die alltäglichen Tätigkeiten im Haus oder außerhalb davon nicht sehr stark von der

körperlichen Gesundheit oder emotionalen Problemen beeinflusst. Unter der Probiotikum-Therapie kommt es zu einer Senkung der Komplikations- und Hospitalisierungsrate (56). Leberzirrhose-PatientInnen sind durch ihren körperlichen Gesundheitszustand in ihren täglichen Tätigkeiten nicht eingeschränkt. Ob das Probiotikum einen direkten Einfluss auf die spezifischen Symptome der Leberzirrhose hat oder die PatientInnen aufgrund des positiven Effekts des Probiotikums auf die psychische Lebensqualität ihre Arbeit besser nachgehen können, bedarf es weiterer Studien. Gut erforscht ist jedoch die positive Wirkung von Probiotika auf die Symptomatik der hepatischen Enzephalopathie (71) oder des Reizdarmsyndroms wie abdominelle Schmerzen und Meteorismus (72). Die gastrointestinale Wirkung konnte jedoch nicht in unserer Studie bestätigt werden, da unmittelbar nach der Einnahme des Probiotikums ProbandInnen über gastrointestinale Beschwerden wie Meteorismus berichteten, die sich schnell und spontan wieder zurückbildeten. Über das genaue Beschwerdebild der ProbandInnen lagen in unserer Studie keine Daten vor. Es wäre interessant zu sehen, ob die verwendeten Bakterienstämme im Multispezies-Probiotikum für Leberzirrhose-PatientInnen geeignet sind. Für zukünftige Studien in diesem Bereich wäre eine detaillierte Datenerhebung bezüglich der körperlichen Beschwerden bei Leberzirrhose-PatientInnen sinnvoll. Denn der SF-36 Fragebogen ist ein generisches Messinstrument und kann keine krankheitsspezifischen Daten erfassen (73). Younossi et al entwickelte einen Fragebogen für chronische Lebererkrankungen (CLDQ), mit dem die gesundheitsbezogene Lebensqualität für PatientInnen mit Lebererkrankung in zahlreichen Studien erfasst wurde (74). Allerdings sollte die besondere Situation von chronisch erkrankten Menschen in solchen Studien wie diese berücksichtigt werden. Eine zusätzliche Evaluierung mit einem Zweitfragebogen hätte für die PatientInnen eine weitere Belastung bedeutet, die wahrscheinlich zu einer schlechteren Compliance geführt hätte. Daher wurden auf weitere Fragebögen verzichtet. Die positive Wirkung des Multispezies-Probiotikums auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität von Leberzirrhose-PatientInnen kann auch anhand der Anzahl an Dropouts unserer Studie geschätzt werden. Denn 11 Dropouts gehörten der Placebo-Gruppe an und nur ein/e ProbandIn stammte aus der Probiotikum-Gruppe.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen einer randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Studie wurde der Einfluss des Multispezies-Probiotikums Winlove 849 auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität von Leberzirrhose-PatientInnen über 6 Monate untersucht. Anschließend fand eine 6-monatige Follow-up Periode statt. Die Studienergebnisse ergaben nach 3-monatiger Intervention mit dem Multispezies Probiotikum eine signifikante Verbesserung des „Psychischen Wohlbefindens“ und der „Sozialen Funktionsfähigkeit“. Nach 6-monatiger Follow-up Phase zeigte sich in der selben Gruppe ebenfalls eine signifikante Verbesserung in „Soziale Funktionsfähigkeit“ im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Das bedeutet, dass ProbandInnen nach der Einnahme des Multispezies-Probiotikums sich durch ihre körperliche Gesundheit oder emotionalen Probleme in ihren sozialen Aktivitäten nicht beeinträchtigt fühlten bzw. positiver gestimmt waren als vor der Intervention. In der Placebo-Gruppe kam es nicht zu solch einer Änderung. Es gibt zahlreiche klinische Studien, die den Einfluss von Probiotika auf die klinischen Parameter und Symptome der Leberzirrhose untersucht haben, jedoch fehlt es an Studiendaten für die gesundheitsbezogene Lebensqualität als Outcome der Probiotika-Therapie bei Leberzirrhose. Die gesundheitsbezogene Lebensqualität umfasst das körperliche, psychische Befinden, der Alltagsfunktionsfähigkeit und der sozialen Integration. Denn bei chronischen Erkrankungen wie die Leberzirrhose steht nicht mehr die Heilung der Erkrankung, sondern die Gewährleistung einer guten Lebensqualität im Vordergrund.

Studien belegen, dass bei Leberzirrhose-PatientInnen die Zusammensetzung der mikrobiellen Darmflora und die Permeabilität der Darmbarriere gestört ist. Dieser Zustand führt durch ein abgeschwächtes Immunsystem und einer bakteriellen Translokation zu Komplikationen der Leberzirrhose und damit einer Verschlechterung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität. Gut ausgewählte Probiotika können bekannterweise das gestörte Darm-Mikrobiom verändern bzw. wiederherstellen. Über den genauen Wirkmechanismus von Probiotika bei verschiedenen Erkrankungen gibt es bisher keine Erklärung. Die Probiotika-Studien sowohl an Mäusen als auch an gesunden Menschen belegen ihre positive Wirkung auf die psychische Komponente der gesundheitsbezogenen Lebensqualität. In der körperlichen Gesundheit ergab unsere Studie in der

Probiotikum-Gruppe einen starken Trend zur Besserung der „Körperlichen Rollenfunktion“. Vermutlich ist diese Änderung auf eine Reduzierung der Komplikationsrate und die damit ausbleibende Hospitalisierung zurückzuführen. Die Leberzirrhose-PatientInnen sind durch ihren körperlichen Gesundheitszustand nicht in ihrem Alltag beeinträchtigt.

6 AUSBLICK

Die gesundheitsbezogene Lebensqualität als Outcome für die Leberzirrhose ist kaum oder gar nicht erforscht. Dabei ist es gerade für eine chronische Erkrankung wie die der Leberzirrhose besonders wichtig, den PatientInnen eine gute Lebensqualität zu gewährleisten. Es könnten in Zukunft mehr Studien mit verschiedenen Multispezies-Probiotika bei Leberzirrhose-PatientInnen durchgeführt werden um unsere Ergebnisse zu bestätigen und vielleicht neue Erkenntnisse über den Einfluss der Probiotika bei Leberzirrhose zu gewinnen. Allerdings ist es wichtig, die Charakteristika der Bakterienstämme genau zu kennen um sie gezielt gegen bestimmte Beschwerden einzusetzen. Ein Multispezies-Probiotikum hat laut Studien aufgrund ihrer vermutlich synergistischen Interaktionen Vorteile gegenüber Einzelstamm-Probiotikum. Wenn eine richtige Kombination von bakteriellen Stämmen in einem Probiotikum verwendet wird, kann eine individuelle Therapie für ein spezifisches Krankheitssymptom vorgeschlagen werden.

Literaturverzeichnis

1. Pamala D, Larsen L. Chronic Illness. *Chronic Illness* 2009. p. 4-5.
2. Organization WH. noncommunicable diseases 2015 [Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/>].
3. Hausmann C. *Psychologie und Kommunikation für Pflegeberufe*. 2009. p. 110.
4. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet*. 2008;371(9615):838-51.
5. Falvo DR. Medical and psychosocial ASpects of Chronic Illness and Disability. 2005. p. 17.
6. Organization WH. WHOQOL: Measuring Quality of Life.
7. Wiegand J, Berg T. The etiology, diagnosis and prevention of liver cirrhosis: part 1 of a series on liver cirrhosis. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(6):85-91.
8. Classen M D, Kochsiek K. *Innere Medizin 5. völlig überarbeitete Auflage* 2004. p. 421.
9. Organization WH. Status report on alcohol and health. 2010.
10. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*. 1997;349(9055):825-32.
11. Bellentani S, Saccoccio G, Costa G, Tiribelli C, Manenti F, Sodde M, et al. Drinking habits as cofactors of risk for alcohol induced liver damage. The Dionysos Study Group. *Gut*. 1997;41(6):845-50.
12. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease in adults. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40 Suppl 1:S5-10.
13. Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S99-S112.
14. Blachier M, Leleu H, Peck-Radosavljevic M, Valla DC, Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol*. 2013;58(3):593-608.
15. Mann RE, Smart RG, Govoni R. The epidemiology of alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health*. 2003;27(3):209-19.
16. Rehm J, Taylor B, Mohapatra S, Irving H, Baliunas D, Patra J, et al.

- Alcohol as a risk factor for liver cirrhosis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Alcohol Rev.* 2010;29(4):437-45.
17. Zatonski WA, Sulkowska U, Manczuk M, Rehm J, Boffetta P, Lowenfels AB, et al. Liver cirrhosis mortality in Europe, with special attention to Central and Eastern Europe. *Eur Addict Res.* 2010;16(4):193-201.
 18. Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, Gretch DR, Koff RS, Seeff LB. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests. *Clin Chem.* 2000;46(12):2027-49.
 19. Heidelbaugh JJ, Bruderly M. Cirrhosis and chronic liver failure: part I. Diagnosis and evaluation. *Am Fam Physician.* 2006;74(5):756-62.
 20. Erhardt A, Lorke J, Vogt C, Poremba C, Willers R, Sagir A, et al. [Transient elastography for diagnosing liver cirrhosis]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2006;131(49):2765-9.
 21. de Ledinghen V, Douvin C, Kettaneh A, Ziol M, Roulot D, Marcellin P, et al. Diagnosis of hepatic fibrosis and cirrhosis by transient elastography in HIV/hepatitis C virus-coinfected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2006;41(2):175-9.
 22. Foucher J, Chanteloup E, Vergniol J, Castera L, Le Bail B, Adhoute X, et al. Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan): a prospective study. *Gut.* 2006;55(3):403-8.
 23. Castera L, Vergniol J, Foucher J, Le Bail B, Chanteloup E, Haaser M, et al. Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;128(2):343-50.
 24. Foucher J, Castera L, Bernard PH, Adhoute X, Laharie D, Bertet J, et al. Prevalence and factors associated with failure of liver stiffness measurement using FibroScan in a prospective study of 2114 examinations. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2006;18(4):411-2.
 25. Yoshioka K, Kawabe N, Hashimoto S. Transient elastography: Applications and limitations. *Hepatol Res.* 2008;38(11):1063-8.
 26. J-M H. *Checkliste der Inneren Medizin.* 7. Auflage. p. 422.
 27. Heidelbaugh JJ, Sherbondy M. Cirrhosis and chronic liver failure: part II. Complications and treatment. *Am Fam Physician.* 2006;74(5):767-76.
 28. Moller S, Henriksen JH. Review article: pathogenesis and pathophysiology of hepatorenal syndrome--is there scope for prevention? *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20 Suppl 3:31-41; discussion 2-3.

29. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. *Gastroenterology*. 2003;124(1):91-6.
30. Singal AK, Kamath PS. Model for End-stage Liver Disease. *J Clin Exp Hepatol*. 2013;3(1):50-60.
31. Preda CM, Ghita R, Ghita C, Mindru C, Vlaicu L, Andrei A, et al. A retrospective study of bacterial infections in cirrhosis. *Maedica (Buchar)*. 2011;6(3):185-92.
32. Sumskiene J, Sumskas L, Petrauskas D, Kupcinskas L. Disease-specific health-related quality of life and its determinants in liver cirrhosis patients in Lithuania. *World J Gastroenterol*. 2006;12(48):7792-7.
33. Winfried ea. Determinant of the health related Quality of life in patient with chronic liver disease. *Clinical Gastroenterology and hepatology*. 2004:157-63.
34. Marchesini G, Bianchi G, Amodio P, Salerno F, Merli M, Panella C, et al. Factors associated with poor health-related quality of life of patients with cirrhosis. *Gastroenterology*. 2001;120(1):170-8.
35. Smith KW, Avis NE, Assmann SF. Distinguishing between quality of life and health status in quality of life research: a meta-analysis. *Qual Life Res*. 1999;8(5):447-59.
36. Hill MJ. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur J Cancer Prev*. 1997;6 Suppl 1:S43-5.
37. Conly JM, Stein K. The production of menaquinones (vitamin K2) by intestinal bacteria and their role in maintaining coagulation homeostasis. *Prog Food Nutr Sci*. 1992;16(4):307-43.
38. Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology*. 2000;100(1):119-30.
39. Zhao HY, Wang HJ, Lu Z, Xu SZ. Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. *Chin J Dig Dis*. 2004;5(2):64-7.
40. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2001;34(1):32-7.
41. Lata J, Jurankova J, Kopacova M, Vitek P. Probiotics in hepatology. *World J Gastroenterol*. 2011;17(24):2890-6.

42. Fuller R, Gibson GR. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1997;222:28-31.
43. (FAO) FaAOotUN. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Bacteria, http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf . . 2001.
44. Ciorba MA. A gastroenterologist's guide to probiotics. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10(9):960-8.
45. Li F, Duan K, Wang C, McClain C, Feng W. Probiotics and Alcoholic Liver Disease: Treatment and Potential Mechanisms. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:5491465.
46. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2002;82(1-4):279-89.
47. Adawi D, Ahrne S, Molin G. Effects of different probiotic strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* on bacterial translocation and liver injury in an acute liver injury model. *Int J Food Microbiol.* 2001;70(3):213-20.
48. Loguercio C, Federico A, Tuccillo C, Terracciano F, D'Auria MV, De Simone C, et al. Beneficial effects of a probiotic VSL#3 on parameters of liver dysfunction in chronic liver diseases. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39(6):540-3.
49. Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol.* 2004;96(3):219-33.
50. C. M. C. Chapman GRG, I. Rowland. Health Benefits of probiotics: are mixtures more effective than single strains. 2011;50(1):1-17.
51. Stadlbauer V. Immunosuppression and probiotics: are they effective and safe? *Benef Microbes.* 2015;6(6):823-8.
52. Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008;371(9613):651-9.
53. Kirpich IA, Solovieva NV, Leikhter SN, Shidakova NA, Lebedeva OV, Sidorov PI, et al. Probiotics restore bowel flora and improve liver enzymes in human alcohol-induced liver injury: a pilot study. *Alcohol.* 2008;42(8):675-82.
54. Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA, Jalan R. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine

- responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol.* 2008;48(6):945-51.
55. Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology.* 2007;46(3):831-40.
 56. Dhiman RK, Rana B, Agrawal S, Garg A, Chopra M, Thumburu KK, et al. Probiotic VSL#3 reduces liver disease severity and hospitalization in patients with cirrhosis: a randomized, controlled trial. *Gastroenterology.* 2014;147(6):1327-37 e3.
 57. Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci.* 2013;36(5):305-12.
 58. Gareau MG, Silva MA, Perdue MH. Pathophysiological mechanisms of stress-induced intestinal damage. *Curr Mol Med.* 2008;8(4):274-81.
 59. Teitelbaum AA, Gareau MG, Jury J, Yang PC, Perdue MH. Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295(3):G452-9.
 60. Logan AC, Katzman M. Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses.* 2005;64(3):533-8.
 61. Cryan JF, O'Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil.* 2011;23(3):187-92.
 62. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci.* 2012;13(10):701-12.
 63. Bruce-Keller AJ, Salbaum JM, Luo M, Blanchard Et, Taylor CM, Welsh DA, et al. Obese-type gut microbiota induce neurobehavioral changes in the absence of obesity. *Biol Psychiatry.* 2015;77(7):607-15.
 64. Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(38):16050-5.
 65. Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, Bienenstock J, Dinan TG. The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *J Psychiatr Res.* 2008;43(2):164-74.
 66. Steenbergen L, Sellaro R, van Hemert S, Bosch JA, Colzato LS. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain Behav Immun.* 2015;48:258-64.

67. Messaoudi M, Violle N, Bisson JF, Desor D, Javelot H, Rougeot C. Beneficial psychological effects of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in healthy human volunteers. *Gut Microbes*. 2011;2(4):256-61.
68. Benton D, Williams C, Brown A. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *Eur J Clin Nutr*. 2007;61(3):355-61.
69. Bianchi G, Marchesini G, Nicolino F, Graziani R, Sgarbi D, Loguercio C, et al. Psychological status and depression in patients with liver cirrhosis. *Dig Liver Dis*. 2005;37(8):593-600.
70. Popovic D, Culafic DM, Tepavcevic DB, Kovacevic NV, Spuran MM, Djuranovic SP, et al. Assessment of depression and anxiety in patients with chronic liver disease. *Vojnosanit Pregl*. 2015;72(5):414-20.
71. Lunia MK, Sharma BC, Sharma P, Sachdeva S, Srivastava S. Probiotics prevent hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a randomized controlled trial. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2014;12(6):1003-8 e1.
72. Ducrotte P, Sawant P, Jayanthi V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2012;18(30):4012-8.
73. Orr JG, Homer T, Ternent L, Newton J, McNeil CJ, Hudson M, et al. Health related quality of life in people with advanced chronic liver disease. *J Hepatol*. 2014;61(5):1158-65.
74. Younossi ZM, Guyatt G, Kiwi M, Boparai N, King D. Development of a disease specific questionnaire to measure health related quality of life in patients with chronic liver disease. *Gut*. 1999;45(2):295-300.

7 ANHANG-

7.1. STUDIENPROTOKOLL

STUDY PROTOCOL

VERSION 7

12.04.2012

Probiotic modulation of gut microflora in cirrhosis: Influence on immune function and infections

A randomized, double-blind, placebo controlled trial

Study identification: PIC-2010

REC: 23-096 ex 10/11

Short title: Probiotics in cirrhosis

Principal investigator: PD Dr. Vanessa Stadlbauer-Köllner

Medizinische Universität Graz
Medizinische Universitätsklinik für Innere Medizin
Klinische Abteilung für Gastroenterologie und Hepatologie
Auenbruggerplatz 15
A-8036 Graz

Study team Graz

Principal investigator:

PD Dr. Vanessa Stadlbauer-Köllner

Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, Medical University of Graz

Co-Investigators:

Prof. Dr. Rudolf Stauber

Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, Medical University of Graz

Dr. Philipp Stiegler

Department of Surgery, Division of Transplantation Surgery, Medical University of Graz

Prof. Dr. C. Högenauer

Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, Medical University of Graz

LABORATORY Contacts:

aoUniv Prof. Karl Öttl

Institute for Physiological Chemistry, Medical University of

Graz

Mag. Bettina Leber

Center of Medical Research, Medical University of Graz

STUDY COORDINATOR:

Barbara Leopold

Center of Medical Research, Medical University of Graz
N.N

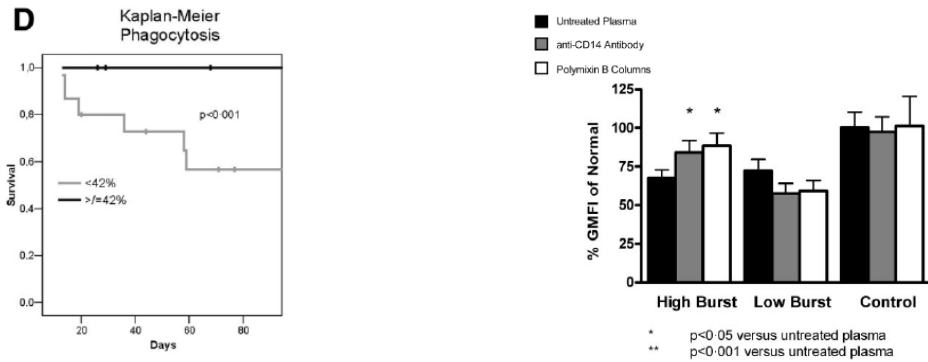
Background and state of the art

In the eight most economically leading countries in the world liver cirrhosis is the 10th most common cause of death (1, 2). Patients with end-stage liver disease are susceptible to a number of complications and have a markedly reduced life expectancy with one year mortality rates ranging between 10 and 82% depending on the stage of cirrhosis (3). The most serious complications include variceal haemorrhage, sepsis, hepatorenal syndrome and hepatic encephalopathy, often associated with a significant deterioration in liver function. Infection is the most common precipitant of this clinical decline termed acute on chronic liver failure. Long-term intestinal decontamination with norfloxacin reduces the incidence of infective episodes and complications of cirrhosis particularly hepatorenal failure (4).

The mechanisms of the increased susceptibility to infection are unclear but recent studies suggest that even in patients with compensated cirrhosis, innate immune response is defective (4, 5) We have recently shown that patients with cirrhosis have a defective neutrophil function, characterised by increased oxidative burst and decreased phagocytic capacity of the neutrophils as well as impaired albumin function, (6, 7) associated with increased risk of infection, progression to organ failure and mortality. (Figure 1) (8) Our studies have also shown that this functional defect is likely to be mediated by a humoral factor. In ex-vivo studies, we showed that treating patient's plasma with anti-CD14 antibodies, endotoxin removal columns or albumin but not with toll-like receptor antagonists prevented neutrophil phagocytic dysfunction, implicating endotoxaemia in pathogenesis. (Figure 2) (8)

Figure 1. A phagocytic capacity of less than 42%, which had the best sensitivity and specificity on AUROC analysis and was used to construct a Kaplan Meier survival curve; log-rank analysis shows a significantly higher mortality ($p < 0.001$) in the group of patients with decreased phagocytic capacity (<42%).

Figure 2. Impaired phagocytosis is reversible by passing high burst patient plasma over an endotoxin-removal column or incubation with anti-CD14 antibodies. Plasma from patients with low burst or from controls passed over the column or incubated with anti-CD14 antibodies does not influence phagocytosis.



Increased endotoxaemia in patients with cirrhosis is thought to be due to increased gut permeability leading to increased bacterial translocation and altered gut flora with a predominance of gram-negative organisms (9). It follows that alteration of the gut flora may favour decreased endotoxin levels, leading to a restoration of immune function in cirrhosis. Probiotics have been demonstrated to alter gut flora (9) and have shown positive effects on liver injury in experimental models of liver disease, dependent on the bacterial species used. (10) In patients with liver cirrhosis, probiotics have been shown to decrease hepatic encephalopathy, (11, 12) improve liver biochemistry (13) and decrease the rate of infection after liver transplantation. (14) Several meta-analyses have already supported the benefit of probiotics in preventing infections in the general hospital population, (15-17) however; the exact mechanism is still largely speculative. It has been suggested that a healthy flora promotes the integrity of the gutdefence barrier by normalizing intestinal permeability and thereby controls intestinal inflammatory responsesby modulating the release of cytokines. (18)

1 Results of a pilot controlled investigation leading up to this clinical study(19)

Twelve patients with alcoholic cirrhosis received food supplementation with *Lactobacillus casei* Shirota (6.5×10^9) 3 times daily for 4 weeks (19). Eight patients were included as disease controls. During treatment with *Lactobacillus casei* Shirota, no adverse events were noted and compliance to study medication was 86%. Baseline neutrophil function showed a significantly lower phagocytic capacity in patients compared with controls (73% versus 98%, $p < 0.05$), which normalized at the end of the study. No improvement was seen in disease controls. TNF receptor (TNFR) 1 and 2 and interleukin (IL)-10 were significantly elevated in patient's plasma compared to healthy controls and did not change during the study. (Figure 4) $\text{TNF}\alpha$, IL-6 and IL-8 were either undetectable or at non-

significant levels at baseline or following stimulation. Following ex-vivo stimulated neutrophil challenge experiments, levels of TNFR1, TNFR2 and IL-10 significantly decreased in supplemented patients ($p < 0.05$). (Figure 5)

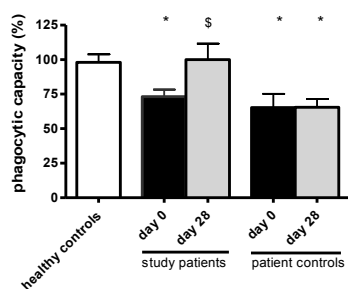


Figure 3: Phagocytic capacity of healthy controls, study patients and patient controls with alcoholic cirrhosis at baseline and at the end of the study. Phagocytic capacity is significantly reduced at baseline and increases significantly at the end of the study. * $p < 0.05$ versus healthy control, \$ $p < 0.05$ versus baseline

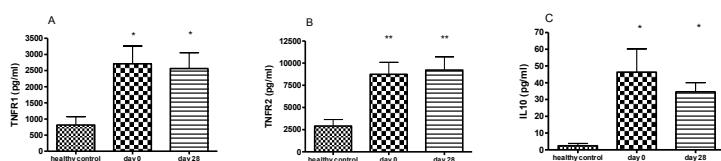
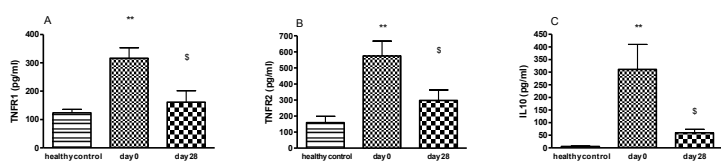


Figure 4: Plasma cytokines of healthy controls and patients with alcoholic cirrhosis at baseline and at the end of the study.

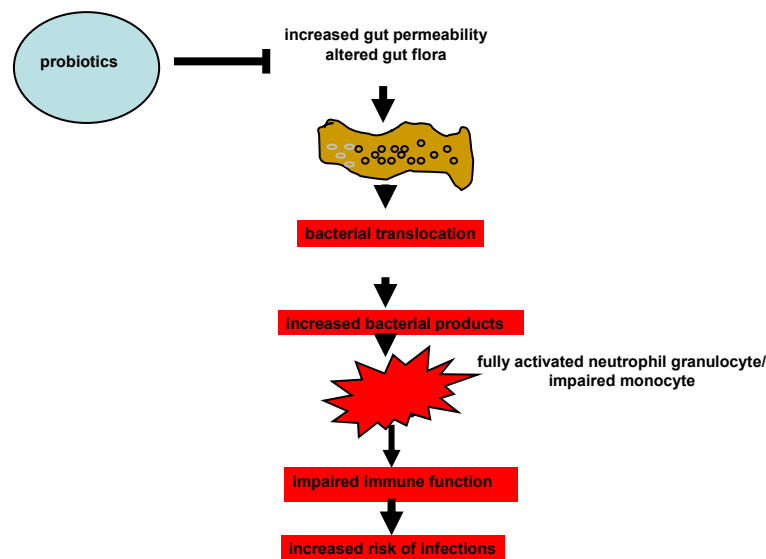


TNFR1, TNFR2 and IL10 are significantly elevated in patients and do not change during treatment. * $p < 0.05$ versus healthy control, ** $p < 0.01$ versus control
 Figure 5: Ex vivo cytokine production in LPS-stimulated whole blood. TNFR1, TNFR2 and IL10 show a significant decrease at the end of the study as compared to baseline. ** $p < 0.01$ versus healthy controls. \$ $p < 0.05$ versus baseline

These data provide novel evidence that the functional phagocytic defect and the predominant anti-inflammatory stimulated cytokine production observed in cirrhosis can be restored with *Lactobacillus casei* Shirota.

2 Hypothesis

We hypothesize that administration of a probiotic in patients with liver cirrhosis will improve innate immune function through alteration of the gut bacterial flora and gut barrier integrity.



3 Specific aims

The primary aim of this randomised, controlled study is to assess whether food supplementation with a probiotic (Winclone-849) improves neutrophil phagocytic capacity in patients with cirrhosis. Secondary aims are to test whether food supplementation with a probiotic (Winclone-849) decreases the rate of clinically significant infections and improves neutrophil and albumin function, inflammatory response, gut barrier function or gut flora and quality of life.

End Points:

Primary

Increase in neutrophil phagocytic capacity

Secondary

Clinically significant infections, endotoxin levels, neutrophil oxidative burst, neutrophil toll like receptor expression, albumin function, inflammatory response, gut barrier function, bacterial flora, quality of life

4 Innovative aspects and expected outcome

This study has the potential to enhance pathophysiological knowledge on impaired gut barrier function leading to an increased risk of infection and will be the proof of concept for a novel, low cost and low risk (except for specific patient groups as discussed below) therapeutic concept. Since infection in cirrhosis places a major burden not only on the individual patient but also on our health care system, this concept will satisfy an unmet clinical need. At the moment no other low risk prophylaxis to prevent infections in cirrhosis is established before patients develop their first complication. Thereafter antibiotic prophylaxis is well established (20) but it is our aim to start an intervention already one step ahead.

From previous studies we know that the use of a probiotic is well accepted by patients. If our hypothesis holds true, this will provide clinicians with an easily applicable prophylactic strategy for patients with cirrhosis.

5 Publication strategy

The study will be registered at www.clinicaltrials.gov before recruitment of the first patient.

The results of this study will be disseminated in the scientific community and to the general public. It is our intent to publish the results derived from this project preferably in high-impact journals, abstracts and presentations at national and international meetings. All investigators will be authors of the manuscript and the manuscript will be approved by all authors.

Furthermore the knowledge derived from this project will be used to increase networking with national and international partners. Intellectual property submission will be done before publishing. The FWF Austrian Science Foundation will be acknowledged in these publications and presentations.

6 Potential additional aspects

6.1 Implications for other branches of science

The results of this study will be important for basic scientists (molecular biology, microbiology) working on gut barrier and gut flora and for food science since most probiotics are classified as food supplement. Furthermore these data will also be important for the understanding of sepsis, where a similar mechanism with increased gut permeability and endotoxemia, leading to immune paralysis, has been hypothesized. This study will provide the pathophysiological basis for the development of novel therapeutic strategies.

6.2 Effects that will have implications beyond the field

Since probiotics are generally considered to be a low risk therapeutic strategy (except for specific patient groups as discussed below) these results may have implications for people at risk to develop a disease (suboptimal health state) who are worried about their health state and consult a doctor for prophylactic advice. When our hypothesis holds true, it might be thinkable that in such cases, if gut permeability is high, probiotics can be recommended.

6.3 Limitations

It is important to note that the results of this study are only valid for the dose and probiotic strain used in our study and can not be generalized to other doses or strains. Also safety of this dose and probiotic strain has to be tested in other patient groups before being able to derive general conclusions.

7 Material and Methods

7.1 Sample size calculation

Phagocytic capacity in the patient group at baseline is $73\pm 5\%$ and increases to $100\pm 14\%$ at the end of the study. With an alpha of 0.05 and a beta 0.2 and assuming a 20% dropout rate, 92 patients are needed for the study (46 in each arm)

7.2 Patient recruitment

Patients will be identified from the outpatient clinic at the Department of Gastroenterology and Hepatology or the Department of Transplantation Surgery, University Hospital Graz.

7.3 Randomisation

After fulfilling inclusion criteria, 92 patients will be randomised into 2 groups:

Group 1: receiving a probiotic mixture (6 g of Winclove-849 containing Bifidobacterium bifidum W23, Bifidobacterium lactis W52, Lactobacillus acidophilus W37, Lactobacillus brevis W63, Lactobacillus casei W56, Lactobacillus salivarius W24, Lactococcus lactis W19, Lactococcus lactis W58 at a concentration of 2.5×10^9 cfu/g)

Group 2: receiving a similar looking and tasting placebo without bacteria

Patient will be stratified according to their etiology of liver disease (alcoholic versus non-alcoholic) and if they take antibiotic prophylaxis for spontaneous bacterial peritonitis or not.

Each patient will be treated for 6 months.

Randomisation will be carried out using the “Randomizer” (Institute of Medical Informatics, Medical University of Graz) software after fulfilling the study criteria. The Randomizer provides a self-serve, easy to use, secure and 24 hour-a-day Randomization Service that runs exclusively on the Internet. Randomization will be performed by permuted blocks. All transactions are logged. The trial's audit trail and the list of randomizations can be downloaded and analyzed at any time by the trial monitor. At randomisation, patients will be stratified for aetiology into patients with alcoholic and non-alcoholic liver cirrhosis and for taking antibiotic prophylaxis or not.

7.4 Study product

The study product (Winclove-849) contains Bifidobacterium bifidum W23, Bifidobacterium lactis W52, Lactobacillus acidophilus W37, Lactobacillus brevis W63, Lactobacillus casei W56, Lactobacillus salivarius W24, Lactococcus lactis W19, Lactococcus lactis W58 at a concentration of 2.5×10^9 cfu/g. The product has been developed to strengthen the intestinal barrier and to reduce translocation of harmful content from the lumen of the intestine into the body. The scientific background of the product is given in Appendix 1 and the product description in Appendix 2.

The product is licensed as a food supplement in the Netherlands as Ecologic® Barrier by Winclove (Amsterdam)

7.5 Definitions

Significant Infection: Infection will be defined as microbiologically proven for bacteria or fungi or suggested by radiological imaging or the diagnosis of spontaneous bacterial peritonitis. An infection will be considered ‘significant’ if this requires hospital admission.

Spontaneous bacterial peritonitis: Ascitic fluid infection without any evidence of an intra-abdominal surgically treatable source. The diagnosis is established by an elevated ascitic fluid absolute neutrophil count ≥ 250 cells/mm³.

7.6 Inclusion/Exclusion criteria

Inclusion criteria

- Patients aged between 18-80 years
- Clinical and radiological evidence of cirrhosis, and/or biopsy proven liver cirrhosis of any cause
- Informed consent

Exclusion Criteria:

- Child-Pugh score > 11
- Abstinence from alcohol for < 2 weeks at the time of screening for inclusion
- Clinical evidence of active infection
- Antibiotic treatment within 7 days prior to enrolment (except for primary or secondary prophylaxis of spontaneous bacterial peritonitis)
- Gastrointestinal haemorrhage within previous 2 weeks
- Use of immunomodulating agents within previous month (steroids etc.)
- Concomitant use of supplements (pre-, pro-, or synbiotics) likely to influence the study
- Renal failure (such as hepatorenal syndrome), creatinine >1.7 mg/dL
- Hepatic encephalopathy II to IV
- Pancreatitis
- Other organ failure
- Hepatic or extra-hepatic malignancy
- Pregnancy
- Presumed non-compliance to the study medication

7.7 Study termination

For individual patients, the study will be terminated after 6 months treatment and a follow-up period of further 6 months. The study can be terminated for individual patients due to a) a severe adverse event b) liver transplantation c) pregnancy d) complications of liver cirrhosis or diseases that do not allow the administration of the probiotic any more e) significant protocol violations f) withdrawal of consent d) lost of follow up e) any other situation that leads to the decision for the investigator to terminate the study. The whole trial can be stopped by the investigator if adverse events occur or other unforeseeable events might influence the safety or well-being of the study participants.

All patients will be recruited within 24 months, so the minimum follow-up period for the last patient entering the study is 12 months. After termination, all study patients will be followed up according to the follow-up policy of our institution for liver cirrhosis.

Table 1: Schedule of assessment

Day	-14 - 0	0	14					
Month				1	3	6	9	12
Visit no.	1	2	3	4	5	6	7	8
Inclusion / exclusion criteria	X							
Demographics / relevant medical history / current medical conditions	X	X	X	X	X	X	X	X
Prior concomitant meds/therapies	X	X	X	X	X	X	X	X
Physical examination	X				X	X		X
Body weight/ height/ waist-hip ratio/ midarm muscular circumference	X				X	X		X
Ultrasound abdomen and alpha-Fetoprotein	X							
Chest X-Ray	X							
Renal/Liver/Electrolytes/CRP/ Ferritin/ full blood count/coagulation/amylase/lipase	X				X	X		X
blood culture (aerobe and anaerobe, 30ml)	X				X	X		X
pregnancy test (in women of childbearing age)	X				X	X		X
12 ml lithium heparin blood	X				X	X		X
6 ml EDTA blood	X				X	X		X
8 ml Serum	X				X	X		X
4 ml sodium citrate plasma	X				X	X		X
Stool	X					X		X
Sucrose/Lactulose/Mannitol Test	X					X		X
Quality of life Questionnaire (SF36)	X				X	X		X
Food Frequency Questionnaire	X				X	X		X
Subjective Global Assessment (SGA) of nutritional status	X				X	X		X
Gastroscopy with gastric/duodenal biopsy (1 each) and gastric/duodenal aspirate (not mandatory)	X				X	X		X
Dosage administration record	Ongoing data capture (probiotic will be dispensed every 2 weeks)							
Adverse Events	Ongoing data capture							
Concomitant medications/therapies	Ongoing data capture							
Infection events	Ongoing data capture							

Study Completion	Complete at any time if study drug is discontinued
------------------	--

7.8 Measurements and sampling

All studies will be undertaken after obtaining informed consent. Study visits will be on an outpatient basis. Blood will be taken at the initial screening visit and after 3, 6 and 12 months. Routine biochemistry and haematology and blood cultures will be performed together with assays to neutrophil function (phagocytosis, oxidative burst, toll-like-receptor expression) endotoxin levels, bacterial DNA, plasma and ex vivo stimulated cytokine expression. In women of childbearing age a pregnancy test will be performed.

Gut permeability studies with sucrose/lactulose/mannitol testing will be performed at the beginning and after 6 and 12 months. Stool samples will be collected at the same timepoints for assessment of gut colonisation by the ingested probiotic species of bacteria and to determine the changes in gut microflora that results.

Assessment of nutritional status, food intake and quality of life will be performed at the initial screening visit and after 3, 6 and 12 months

The probiotic or the placebo will be distributed to the patients by a study nurse at baseline and after 3 months. Patients will receive a 3-months supply in a box with one sachet containing 6 g of Winclone-849 or placebo for each day.

If a upper GI endoscopy is clinically indicated at any time point of the study, gastric and duodenal aspirate and one extra biopsy sample from duodenum and one from the stomach is collected for analysis of bacterial flora.

To ensure compliance and to confirm any infection events, the study nurse will call patients regularly to discuss any problems. The patients will receive a patient diary where they are asked to document any episode of illness during the study period.

All the assay investigators will be kept blinded to the randomisation of the sample subjects; a single operator (to limit methodological bias) will perform all non-routine measurements in batches. At the end of the study, the code will be broken and the results compared statistically.

7.9 Assessment of safety

All adverse and serious adverse events will be documented and reported in accordance with standard guidelines. Serious complications requiring hospitalisation to be anticipated in end-stage liver disease include:

- Hepatorenal syndrome
- Gastrointestinal haemorrhage
- Hepatic encephalopathy

- Infection requiring hospitalisation
- Ascites requiring paracentesis
- Cardiovascular insufficiency requiring circulatory support

Expected adverse reactions of the treatment under investigation include:

- Flatulence
- Diarrhoea
- Abdominal discomfort
- Bloating

As a safety measurement blood will be collected into 3 pairs of aerobic/anaerobic blood culture bottles according to current guidelines. Blood will be sampled from a peripheral vein.

7.10 Methodological Details about Measurements

Neutrophil phagocytosis: The Phagotest[®] (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany) is used to measure phagocytosis by using FITC-labelled opsonized E. coli bacteria as described before. (8)

Neutrophil oxidative burst

The Phagoburst[®] kit (Orpegen Pharma, Heidelberg, Germany) is used to determine the percentage of neutrophils that produce reactive oxidants with or without stimulation according to the manufacturer's instructions as previously described using fluorescence activated cell sorting (FACS; Becton Dickinson FACScan, San Jose, USA; Cellquest™ software) (8)

Toll-like receptors:

Surface expression of TLRs will be determined using the following fluorescein isothiocyanate (FITC)- and phycoerythrin(PE)-conjugated antibodies: TLR2-PE-Cy7, TLR4-APC, TLR9-PE, CD16-FITC (eBioscience, San Diego, CA). Cells will be incubated with the respective antibody pairs for 30 minutes, washed twice with PBS, lysed and fixed before FACS analysis. For TLR9 expression cells are permeabilized by incubating for 10 minutes with 500 µL of 1 x FACS Permeabilization Solution 2 (BD Biosciences, UK). Results will be confirmed by western blotting.

Gut permeability: Sucrose/lactulose/mannitol test

The patient drinks a solution of 200 ml water containing 20g sucrose, 10g lactulose and 5g mannitol. Urine is collected over 5 hours while fasting is continued for 3 hours after study

start. The urine volume collected at 5 hours is measured and 1 ml aliquots are frozen immediately at -80°C without preservative for subsequent analysis by high performance liquid chromatography. Urine samples are mixed with meso-erythrit and turanose as internal standards, sulfosalicylic acid and an ion exchange resin. After centrifugation the supernatant is diluted and used for HPLC analysis. Separation is carried out on a Hamilton RCX-10 column using 150 mM NaOH degassed with helium as mobile phase. Detection is done by a pulsed amperometric detector with a gold electrode. Quantification involves internal and external standardisation. The urinary recovery of the test sugars will be expressed as percentage of the dose ingested and the lactulose/mannitol ratio will be calculated.

Endotoxin levels: Limulus amoebocyte lysate assay

Heparinized whole blood is drawn with pyrogen-free needles into pyrogen-free tubes and the serum separated at 4°C and stored at -80°C in pyrogen-free polyethylene cryotubes (Nunc, Rochester, USA) on the day of collection. The chromogenic limulus amoebocyte lysate assay (Charles River Laboratories) is used for detection of endotoxin. (21) To measure endotoxin-binding capacity, plasma samples are spiked with 0.005, 0.05, 0.5, 5 and 50 EU of endotoxin and the percentage of recovery at the different concentrations is measured. Plasma from healthy control subjects is used as a reference.

Bacterial DNA: A PCR reaction for the universal amplification of a region of the 16S ribosomal RNA gene will be performed. Two microliters of template are added into a reaction mix containing 10 mmol/L Tris buffer (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 200 μmol/L of each deoxynucleoside triphosphate, 50 pmol of primers 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG- 3' and 5'-ACCGCGACTGCTGCTGGCAC- 3' and 1.25 U BioTaq (Bioline, London, England) to complete a final volume of 50μL. The primers located at positions 7-27 and 531-514 (Escherichia coli numbering) are universal eubacterial primers that will amplify any known bacterial 16S ribosomal RNA gene. A 35-cycle PCR will be run in a GeneAmp 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the following profile: 94°C for 30 seconds, 55°C for 30 seconds, and 72°C for 60 seconds. Total PCR reaction volume will be filtered with QIAquick Spin Columns (QIAquick PCR Purification Kit; QIAGEN) to remove rests of primers. Five microliters of purified products will be analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and UV visualization.

Plasma cytokines and ex vivo cytokine production;

Soluble tumour necrosis factor receptor (sTNFR) 1 and 2 will be determined by ELISA from ethylene-diamine-tetraacetate anticoagulated plasma samples using commercially

available antibody sets (R&D Systems, Abingdon, UK) in accordance with the manufacturer's instructions. Tumour necrosis factor alpha (TNF α), Interleukin (IL)6, IL-6R, IL8 and IL10 will be analysed by a cytometric bead array (BD Bioscience, Oxford UK) according to the manufacturers instructions. Samples will be analysed on a FACS Canto II (BD Bioscience, Oxford UK) with FACSDiva software for acquisition and FCAP array software for analysis. Pre-albumin will be measured using Cobas-MiraS.

Ex vivo stimulation of cytokines will be analysed in a whole blood assay after stimulation with endotoxin derived from E.coli (E.coli 0111:B4 Lot 085K4068, Sigma, Poole, UK) for 4 h at 37 °C.

Albumin oxidation in patients' plasma

Albumin fractions HMA, HNA-1 and HNA-2 are determined by means of high performance liquid chromatography (HPLC) (REF). Plasma samples are diluted 1:100 to a final volume of 1ml in sample-buffer (0.1M sodium phosphate, 0.3M sodium chloride, pH 6.87) and filtered through a Whatman 0.45 μ m nylon filter (Whatman International Ltd., Kent, UK). 20 μ l of the filtrate are then injected to the HPLC system. Separation process is performed by means of a Shodex Asahipak ES-502N 7C anion exchange column (Showa Denko Europe GmbH, Munich, Germany) using 50mM sodium acetate, 400mM sodium sulphate, pH 4.85 as the mobile phase. A gradient of 0 to 6% ethanol and a flow rate of 1ml/min is applied by a gradient pump (FLUX Rheos 4000; Spectronex GmbH, Vienna, Austria) and used for elution. The column is kept at a temperature of 35°C. Fractions are detected at fluorescence level at 280/340nm. As detector for fluorescence emission a Jasco 821FP detector (Spectronex GmbH, Vienna, Austria) and for UV a Waters 2487 UV/VIS detector (Waters GmbH, Eschborn, Germany) is used. Fraction quantification was done by comparing peak heights. Software used for this application is EZChrom EliteTM chromatography software (Scientific Software Inc., San Ramon, CA USA). Fractions are expressed in percent of total albumin.

Gut flora

Isolation of bacterial DNA is done from stool samples, gastric/duodenal aspirate or duodenal/stomach biopsies using QIAGEN stool DNA extraction kit according to the manufacturer's instruction. 16S rDNA variable region 4 is amplified from these DNA isolates by PCR using according primers. PCR is done in triplicates for each sample (á 20 μ l) according to the following protocol using Roche's FAST Start High Fidelity PCR system. PCR products are separated on a 1% 1xTAE agarose gel and specific bands

(~300bp) are excised and gel-extracted using QIAGEN gel extraction kit (QIAGEN, Vienna). Purified PCR products are analysed on a BioAnalyzer 2100 DNA 1000 cassettes (Agilent Technologies) for integrity and DNA concentration is determined fluorometrically using Quantidect reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA). An amplicon library is generated using equimolar amounts of PCR products derived from the individual samples and bound to the sequencing beads at a one molecule per bead ratio. Long Read Sequencing using a 70x75 PicoTiter Plate (Roche Diagnostics) is done on a Genome Sequencer FLX system (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instruction. For analysis the freely available academic software packages UniFrac and DOTUR are used

Quality of life:

SF-36 questionnaire. The SF36 (ShortForm with 36 questions), a well-documented, self-administered QoL scoring system has been widely used and validated, also in liver disease. The questionnaire includes one multi-item scale that assesses eight health concepts: 1) limitations in physical activities because of health problems; 2) limitations in social activities because of physical or emotional problems; 3) limitations in usual role activities because of physical health problems; 4) bodily pain; 5) general mental health (psychological distress and well-being); 6) limitations in usual role activities because of emotional problems; 7) vitality (energy and fatigue); and 8) general health perceptions.

Food frequency questionnaire

A food frequency questionnaire developed by the dietology team of the Medical University of Graz will be used to assess changes in eating habits throughout the study. This questionnaire consists of 33 items concerning the intake of carbohydrates, milk products, meat, fish, fruit, vegetable, fat, drinks and snacks. Each item has 6 frequencies (never/rarely, 1-3 times per months, every week, 2-6 times per week, daily, more than once a day) and the patients are asked to tick the most appropriate box.

Subjective Global Assessment

Subjective global assessment is a simple and reliable assessment tool for the screening of malnutrition (22). The standard SGA comprises a nutritionist evaluation of height, weight (current, before illness, and weight range in the previous 6 months), nutritional history (appetite, intake, gastrointestinal symptoms), physical appearance (subjective assessment of fat loss, muscle wasting, edema and ascites) and existing conditions (encephalopathy, infections, renal insufficiency). Based on this evaluation, patients are classified into three groups: (i) well nourished, (ii) mild or moderately malnourished or (iii)

severely malnourished. The SGA is available in German for the Austrian Society for Clinical Nutrition.

8 Data management, monitoring and archiving

For data management the ArchiMed software (Institute of Medical Informatics, Medical University of Graz) will be used. A data monitoring plan will be generated in cooperation with the study coordination center at the Medical University of Graz.

A Case Report Form (CRF) will be completed for each subject enrolled into the clinical study. Patient identifiers are kept confidential. Patient data are identified by a patient number and only the investigator will keep a list of patient identifiers and patient numbers. Patients will be informed about the collection of data and asked for their consent that their data might be shown to representatives of the respective legal authorities or monitors who are also obliged to keep data confidential.

All original documents from this study will be archived for 15 years.

9 Statistical methodology and data analysis

All the data will be described as mean and standard errors. All clinical data will be analysed on an intention to treat basis but will also be described on 'as treated' basis. The primary analysis will be based on a chi-sq test or a Z-test for two proportions, as advised by the project statistician. Analysis of the secondary endpoints will be done as descriptive statistics, by t-test, Mann-Whitney test, Pearson and/or Spearman correlation as appropriate. Differences in the primary outcome measure will be described using a Kaplan-Meier analysis and using the Log rank test to determine the significance of difference between groups.

10 Possible pitfalls and strategies to overcome them

Recruitment and patient adherence

One of the main problems of clinical studies is the difficulty to recruit enough patients. We have carefully assessed our capacities and found that we see 150 patients with cirrhosis potentially fulfilling the criteria for participating in this study. Therefore recruitment of 92 patients in 2 years seems to be feasible.

Once patients are recruited, the main problem is to ensure adherence to the study. The most important factors for this are that the patients are well informed, that the study is not too time consuming and that the patients feel well supported. In our study we will ensure that patients are well informed by providing written and personal information for the patients. The study has been designed with 4 visits to the outpatient clinic over a period of 12 months, which is approximately the number of visits the patients will have scheduled

due to their disease. Therefore the study does not place any further burden on the patients. Between the visits patients will be supported by the study nurse, who will call patients regularly to ensure adherence to the study protocol.

Is the effect due to the probiotic or due to improvement of nutrition?

Malnutrition is a common problem in liver cirrhosis (23). The therapeutic intervention with Winclove-849 adds only 20 kilocalories per day (341 kcal/100 gram) to the patients’ diet, therefore it is unlikely to change the nutritional status of the patients significantly. However, we will perform a detailed analysis of nutrition using a food frequency questionnaire and we will also assess the nutritional status by the Subjective Global Assessment (22).

Safety of probiotics in our patient cohort

Generally probiotics are considered as safe. Many probiotics are classified as food without any specific tests for safety. The product used in this study is commercially available since 1935 and has been used without any safety concerns. However, there have been concerns in treating patients with defective immunity with living bacteria (24, 25). Since patients with liver cirrhosis have a defective innate immunity (8), an increased awareness concerning safety of the treatment is necessary. We will perform a detailed assessment of adverse events at every study visit and the study nurse will call patients between the visits on a regular basis to assess adverse events. The patients will also be informed about the importance to report adverse events to us. If necessary, the randomization code will be broken in order to know if the patient has received the active product or the placebo.

A previous study also suggests that the administration of Lactobacillus casei Shirota in patients with alcoholic cirrhosis is safe as shown by the lack of any adverse events, and the fact that markers of inflammation/infection such as white cell count and C-reactive protein remained unchanged over the study period. (19)

As a safety measurement blood cultures will be routinely taken every 3 months during the study period and at any time an infection is suspected a full workup according to the clinical presentation will be performed.

11 Work and Time Plan

Task	Months											
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24	25-27	28-30	31-33	34-36
Study initiation	x											

Patient recruitment	x	x	x	x	x	x						
Patient follow up, assessment of quality of life, food frequency questionnaire, subjective global assessment, neutrophil function	x		x	x	x	x	x	x	x	x		
Endotoxin, bacterial DNA, cytokines, gut permeability, gut flora									x	x	x	
Evaluation of experiments; data preparation for publication												x
Data presentation on scientific meetings												x
Preparation of follow-up study												x

Table 2: Time schedule of proposed study

12 Ethical considerations

The use of a probiotic is expected to be safe for patients with liver cirrhosis. In the pilot study (19) no severe adverse events were noted, the only reported side effect was mild flatulence during the first days of therapy in a minority of the patients. The study itself only places a minimal burden on the patients. Usually patients with cirrhosis are seen in our liver outpatient clinic twice a year. When they are included in the study, two further visits within 12 months are planned. During the visits a blood sample is taken and the gut permeability test is performed. We believe that the potential benefit for the patients outweighs the minimal risk of having a blood sample taken and having to drink a sugar solution. The patients will benefit from a more detailed examination of immune function and if our hypothesis holds true, of the positive effect of the probiotic on immune function.

13 Quality control

The study will be performed in accordance to the ICH-GCP guidelines. The “Koordinierungszentrum für Klinische Studien der Medizinischen Universität Graz“ has been consulted during the planning phase of the study and will be involved during the entire study period to assure compliance with the ICH-GCP guidelines. All documents will be checked and data monitoring will be performed.

14 Cooperation

aoUniv. Prof. Dr. R. Stauber (Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, Medical University of Graz) and Dr. P. Stiegler (Department of Surgery, Division of Transplantation Surgery) will be involved in the recruitment of patients.

aoUniv. Prof. Dr. C. Högenauer (Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology and Hepatology, Medical University of Graz) will perform the gut flora analysis.

aoUniv. Prof. K. Öttl (Institute of Physiological Chemistry, Medical University of Graz) will perform the gut permeability analysis.

Institut Allergosan will provide the probiotic and the placebo at no cost for this study.

15 Human Resources

15.1 Scientific Qualifications of the applicant

PD Dr. med. Vanessa Stadlbauer-Köllner is the principal investigator of this project. She is currently a resident in internal medicine at the Department of Internal Medicine, Medical University of Graz and will finish her clinical training in September 2011. She is experienced in research related to endotoxin, innate immune function and probiotics which is highlighted by several publications in this field (refs). This shall guarantee that the aims of this project can be successfully completed within the defined time frame of the project.

Because she has an interdisciplinary field of activity, she is an excellent team player and networker. Besides she has practice in writing scientific papers and she attends a lot of national and international congresses to disseminate the outcome of her scientific work (refer to the CV of the applicant for further details).

She has also carried out several successful clinical studies in the past years. Her expertise in this field has been strengthened by an Erwin-Schrödinger fellowship. She has already received her *venia docendi* (Habilitation). As principle investigator, she will oversee the patient recruitment, laboratory work and data analysis. She has been principle investigator and co-investigator in previous projects funded by the Austrian National Bank Jubilee Funds and other national and international projects.

15.2 Scientific qualification of the partners

aoUniv. Prof. Dr. R. Stauber is the senior hepatologist at the Department of Gastroenterology and Hepatology and oversees all hepatology patients referred to the outpatient clinics and

the wards. He has led numerous clinical studies and will help the applicant with patient recruitment and he will contribute to the analysis and interpretation of the results.

Dr. Philipp Stiegler is a trainee at the Department of Transplantation Surgery of the Medical University of Graz. He is a partner of the EU Project IMPACCT of FP7 and therefore was able to establish a well functioning laboratory. He will be responsible for patient recruitment and sample logistics.

Ao.Univ.Prof. Dr.Karl Öttl is employed at the Institute of Physiological Chemistry, Medical University of Graz. He runs an excellent HPLC facility where all investigations concerning the albumin function and the gut permeability will be carried out.

Ao.Univ.Prof. Dr.Christoph Högenauer runs a laboratory specialized in microbiomic and metagenomic analysis of the intestinal flora. He will perform the gut flora analysis and the statistical interpretation of these data for our study.

15.3 Importance of the Project for the Career Development of the Participants

The proposed funding will advance the research in the field of probiotics, gut flora and gut permeability and immune function in liver cirrhosis, which has evolved through the collaboration between VS, PS, CH and KÖ in the last years. For VS and PS this project is important to be able to apply for an Associate Professorship at the Medical University of Graz. For RS, CH and KÖ the applied project is a possibility to continue their research concerning gut flora, albumin function and gut permeability.

16 Information on the research institution

16.1 Available personnel not financed by the FWF

VS, PS; CH and KÖ are full time employees of the Medical University of Graz and/or the University Hospital Graz. They will dedicate 6 hours per week each to this project.

16.2 Available infrastructure:

The research project will be carried out at the Department of Gastroenterology and Hepatology and the Department of Transplantation Surgery at the University Hospital Graz, at the Clinical Research Center of the Medical University of Graz, and at the Institute of Physiological Chemistry, Medical University of Graz. VS, RS and PS will be responsible for recruiting the patients at the above mentioned departments for the study as well as the data analysis. These departments are carrying out several clinical studies and therefore preanalytics of blood samples and data collection is well established. VS and PS

are both project leaders at the Clinical Research Center which provides the infrastructure and the laboratory equipment for the immune function and endotoxin measurements. KÖ runs a HPLC facility where the albumin and the gut permeability assays will be performed. CH runs laboratory to perform the analysis of the gut flora.

17 References

1. Bosetti C, Levi F, Lucchini F, Zatonski WA, Negri E, La Vecchia C. Worldwide mortality from cirrhosis: an update to 2002. *J Hepatol* 2007;46:827-839.
2. Leon DA, McCambridge J. Liver cirrhosis mortality rates in Britain, 1950 to 2002. *Lancet* 2006;367:645.
3. Mansour A, Watson W, Shayani V, Pickleman J. Abdominal operations in patients with cirrhosis: still a major surgical challenge. *Surgery* 1997;122:730-735; discussion 735-736.
4. Rajkovic IA, Williams R. Abnormalities of neutrophil phagocytosis, intracellular killing and metabolic activity in alcoholic cirrhosis and hepatitis. *Hepatology* 1986;6:252-262.
5. Mookerjee R, Stadlbauer V, Lidder S, Wright G, Hodges S, Davies N, Williams R, et al. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts outcome. *Hepatology* 2007;Aug 6 [epub ahead of print].
6. Jalan R, Schnurr K, Mookerjee RP, Sen S, Cheshire L, Hodges S, Muravsky V, et al. Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology* 2009;50:555-564.
7. Oettl K, Stadlbauer V, Petter F, Greilberger J, Putz-Bankuti C, Hallstrom S, Lackner C, et al. Oxidative damage of albumin in advanced liver disease. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782:469-473.
8. Mookerjee RP, Stadlbauer V, Lidder S, Wright GA, Hodges SJ, Davies NA, Jalan R. Neutrophil dysfunction in alcoholic hepatitis superimposed on cirrhosis is reversible and predicts the outcome. *Hepatology* 2007;46:831-840.
9. Wiest R, Garcia-Tsao G. Bacterial translocation (BT) in cirrhosis. *Hepatology* 2005;41:422-433.
10. Riordan SM, Williams R. The intestinal flora and bacterial infection in cirrhosis. *J Hepatol* 2006;45:744-757.
11. An H, Xu H, Yu Y, Zhang M, Qi R, Yan X, Liu S, et al. Up-regulation of TLR9 gene expression by LPS in mouse macrophages via activation of NF-kappaB, ERK and p38 MAPK signal pathways. *Immunol Lett* 2002;81:165-169.
12. Dbouk N, McGuire BM. Hepatic encephalopathy: a review of its pathophysiology and treatment. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2006;9:464-474.
13. Lirussi F, Mastropasqua E, Orando S, Orlando R. Probiotics for non-alcoholic fatty liver disease and/or steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007:CD005165.
14. Rayes N, Seehofer D, Hansen S, Boucsein K, Muller AR, Serke S, Bengmark S, et al. Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 2002;74:123-127.
15. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *Bmj* 2002;324:1361.
16. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1461-1467.
17. McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2006;101:812-822.
18. Isakow W, Morrow LE, Kollef MH. Probiotics for preventing and treating nosocomial infections: review of current evidence and recommendations. *Chest* 2007;132:286-294.

19. Stadlbauer V, Mookerjee RP, Hodges S, Wright GA, Davies NA, Jalan R. Effect of probiotic treatment on deranged neutrophil function and cytokine responses in patients with compensated alcoholic cirrhosis. *J Hepatol* 2008;48:945-951.
20. Runyon BA. Management of adult patients with ascites due to cirrhosis: an update. *Hepatology* 2009;49:2087-2107.
21. Hurley JC, Tosolini FA, Louis WJ. Quantitative Limulus lysate assay for endotoxin and the effect of plasma. *J Clin Pathol* 1991;44:849-854.
22. Detsky AS, McLaughlin JR, Baker JP, Johnston N, Whittaker S, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN. What is subjective global assessment of nutritional status? *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987;11:8-13.
23. Plauth M, Cabre E, Riggio O, Assis-Camilo M, Pirlich M, Kondrup J, Ferenci P, et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Liver disease. *Clin Nutr* 2006;25:285-294.
24. Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, Nieuwenhuijs VB, et al. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008;371:651-659.
25. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006;83:1256-1264; quiz 1446-1257.

18 Abbreviations

HMA human mercaptalbumin
HNA human non-mercaptalbumin
IL Interleukin
TNFalpha Tumor necrosis factor alpha
TNFR Tumor necrosis factor alpha receptor
TLR Toll like receptor

19 **Signature page**

Principal Investigator

Place, Date

Name

PD. Dr. V. Stadlbauer-Köllner

Appendix 1

Rationale for Winclove-849

Product proposal

Winclove Bio Industries has developed this product especially to strengthen the intestinal barrier and to reduce translocation of harmful content from the lumen of the intestine into the body.

Winclove-859 consists of the following 8 strains:

- *Bifidobacterium bifidum* W23
- *Bifidobacterium lactis* W52
- *Lactobacillus acidophilus* W37
- *Lactobacillus brevis* W63
- *Lactobacillus casei* W56
- *Lactobacillus salivarius* W24
- *Lactococcus lactis* W19
- *Lactococcus lactis* W58

The product has a concentration of $2,5 \cdot 10^9$ cfu/gram and the advised daily dosage is 2 grams.

Background

The intestinal mucosa is the largest interface between the outside world and the human internal milieu. Across a surface area that approximates the size of a soccer field, it is here where we prevent the highest concentration of bacteria from invading our internal environment while allowing nutrient and water absorption by a single cell layer of epithelium.

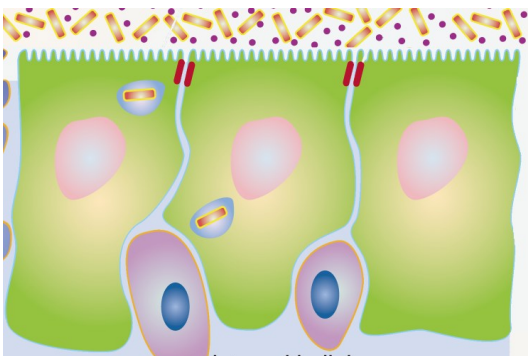


Figure 1 : Intestinal epithelial cells play a crucial role in barrier function

The ability to control the invasion of harmful content from the lumen is called *intestinal mucosal barrier function*. While the epithelial layer forms the most obvious physical boundary between inner and outer environment, the full complexity of factors that control intestinal barrier function reaches beyond the epithelium and is not fully understood. Throughout the intestine a single layer of epithelial cells covers the inner surface

and is responsible for this barrier function.

Tight junctions are protein structures that allow selective passage of ions and small molecules, but form, in healthy subjects, a tight barrier to protein sized molecules and bacteria. To make matters more complicated, the task of the epithelium is not only to keep bacteria and antigens out while absorbing nutrients, but also to allow contact between luminal contents and immune cells. This occurs through limited and highly controlled uptake of antigen and bacteria. This seemingly paradoxical task is, however, crucial in the induction of targeted and protective mucosal immune responses to pathogens as well as to the development of oral tolerance to commensals and food antigens

The barrier function of the intestine (before described as actions on level 2) can be influenced by different factors, like heredity, bacterial flora, diet, psychological stress, oxidative stress, exercise, and drugs [1]. Increased permeability of the epithelial barrier has been associated with many gastrointestinal inflammatory disorders, like inflammatory bowel diseases (Crohn's disease, ulcerative colitis and pouchitis), celiac disease [2]. An increased permeability can also lead to increased levels of endotoxins in the blood, which are linked to systemic inflammatory diseases, like metabolic syndrome, diabetes, atherosclerosis, chronic fatigue syndrome, autism, migraine and rheumatoid arthritis. Probiotics have proven capabilities to enhance the epithelial barrier, due to different working mechanisms [3].

Development Winlove-849

Winlove-849 is specially designed to improve the epithelial barrier and to increase the resistance to disturbances of the intestinal barrier. The probiotic strains were selected based on the following criteria:

- *In vitro* strengthening of the epithelial barrier
- Inhibition of mast-cell activation
- Inhibition of pro-inflammatory cytokines
- Decreasing lipopolysaccharide load

In vitro strengthening of the epithelial barrier

Trans epithelial electrical resistance (TEER) is an *in vitro* measurement of the movement of ions across the paracellular pathway. Maintenance of the intestinal integrity is critical for essential physiological processes. Therefore, a reduction in TEER may represent an early expression of cell damage and indicates that the barrier function of the intestine is decreased. Pathogenic bacteria, like *Salmonella enteritis* 857 have shown to decrease the

relative TEER in Caco-2 cells. In a small experiment with six bacterial strains, an epithelial cell-line (CaCo-2) was damaged by a pathogenic bacterium, *Salmonella enteritidis*. Three of the 6 strains were able to diminish the decrease in transepithelial resistance (and thus strengthen the barrier function) due to the *Salmonella* significantly, see figure 2. These three strains are present in Ecologic®Barrier.

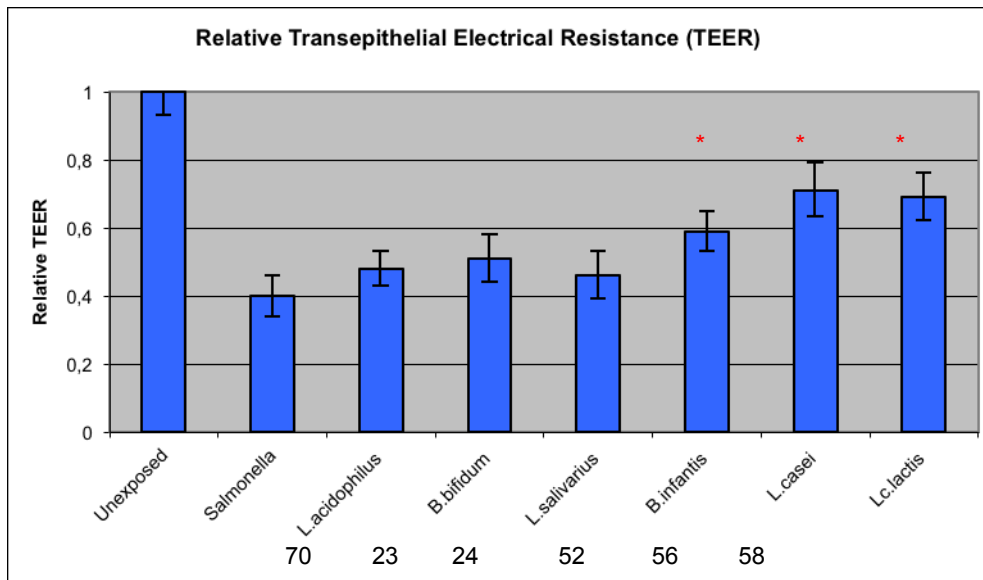


Figure 2: Probiotic effect of *Salmonella*-induced decrease in transepithelial electrical resistance..

A larger TEER screening of 31 strains with an inflammatory stressor (a combination of TNF- α and IL1- β) instead of *Salmonella enteritidis* has been performed. The cells were two hours pre-incubated with the probiotic strains, after which the inflammatory stressor was added. After 24 hours of incubation with the stressors, the TEER was measured (figure 3).

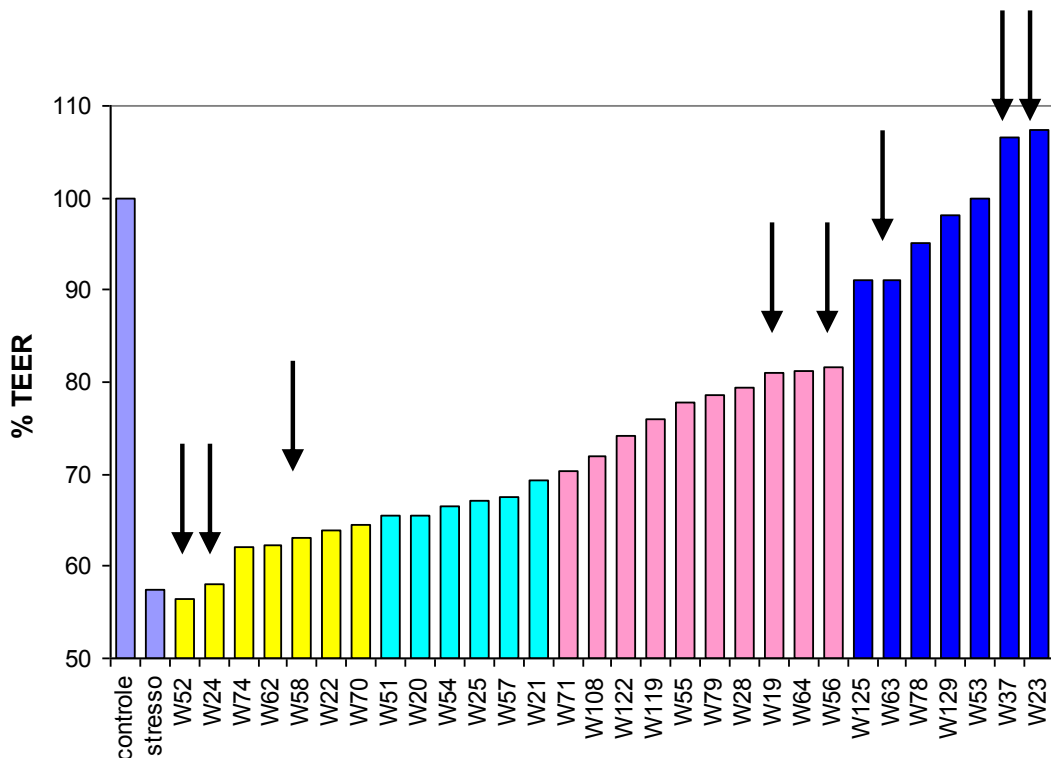


Figure 3: : Effect of different probiotic strains on cytokine induced barrier dysfunction after 24 hours incubation with $TNF-\alpha$ and $IL-1\beta$. The value of the control, without the addition of any stressor, was set at 100%

Three strains in Winlove-849 could for more than 90% protect the epithelial cell against the cytokine induced dysfunction of the barrier, whereas two others had a partial effect. 3 strains did not show an effect in this assay.

Inhibition of mast-cell activation

Tight junctions are important proteins in the epithelial cells to maintain the barrier. They can open by the activation of mast cells. These mast cells can be triggered by the hormone Corticotropin-Releasing Hormone (CRH), which is released during stress. Triggering of the mast-cells by CRH results in granulation of mediators like nerve growth factor, different cytokines or β -hexosaminidase. These effects are presented in figure 5. Upon the release of these mediators, the tight junction will open resulting in increased permeability of the small intestine [4]. Research has shown that certain probiotic strains can decrease the CRH-induced degranulation of mast-cells and thereby the opening of the epithelial barrier due to stress.

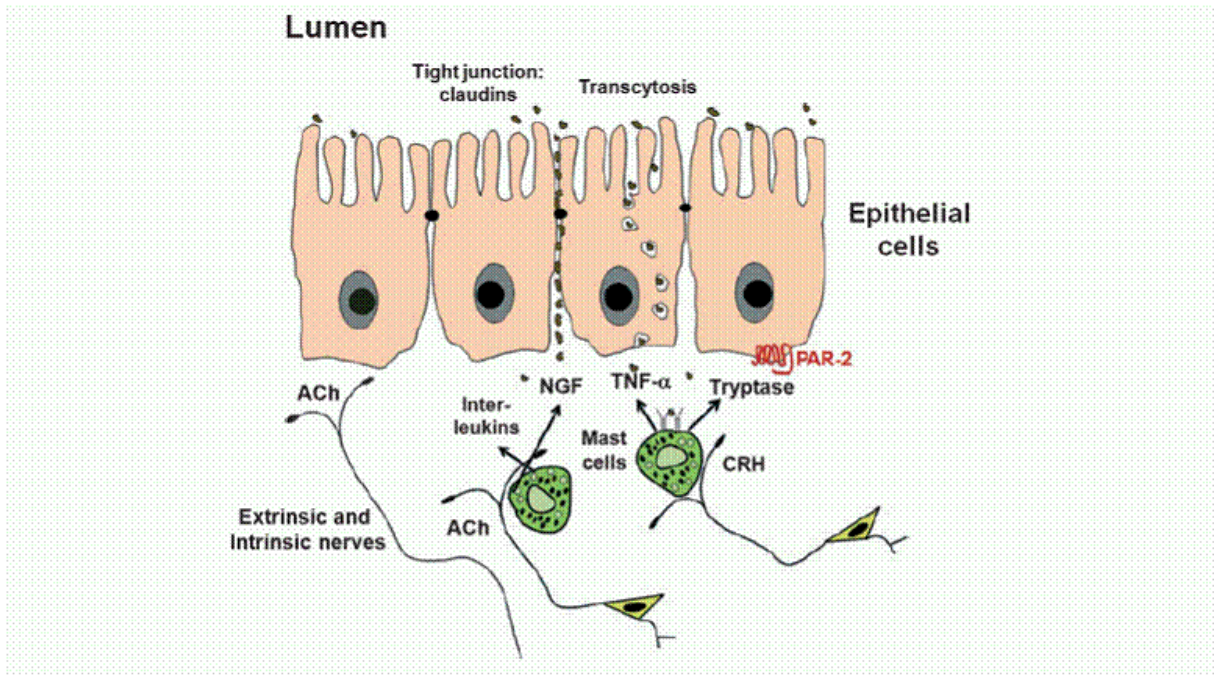


Figure 5: A simplified scheme of potential mechanisms involved in neuro-immune modulation of the intestinal barrier function.

In this experiment mast-cells were pre-treated with probiotic strains and subsequently stimulated with CRH. The amount of released β -hexosaminidase was measured to get insight on the protective effects of probiotics to inhibit the increase of the permeability. The results are shown in figure 6. The strains W23, W24, W52 and W56 (which are also selected to be present in Ecologic®Barrier) have a positive effect to prevent the release of β -hexosaminidase upon CRH treatment. W19 had no preventive effect. The other strains of Winclove-849 were not tested in this assay.

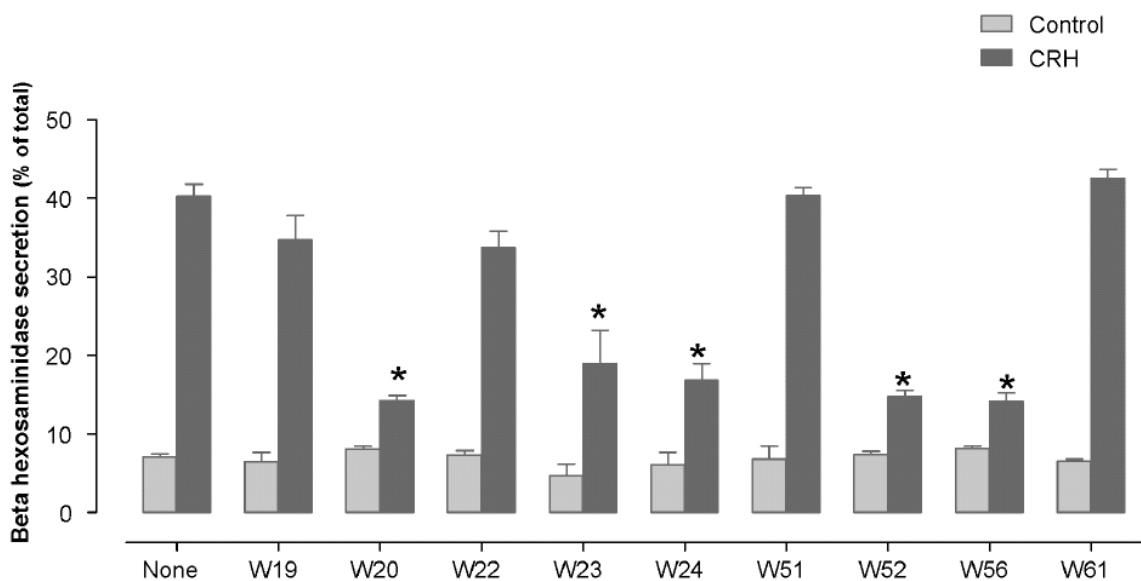
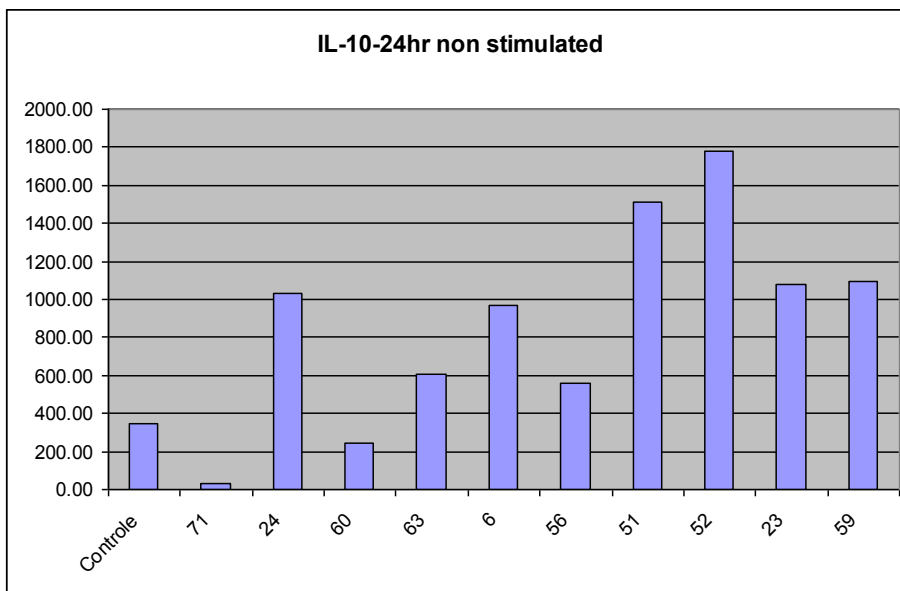


Figure 6: probiotic effect on mast-cells stimulated with CRH (from ref [5], chapter 10).

Inhibition of pro-inflammatory cytokines

A large part of the immune system (approximately 80%) is concentrated in and around the intestinal mucosa. The intestinal microbiota is involved in maturation of the immune system as demonstrated in studies in germ-free mice [6]. In turn the microbiota in the intestine plays an important role in the regulation of functions in the immune system [7]. The immune system can be modulated by probiotic bacteria and these effects are highly species- and strain-specific [7-9]. Inflammatory signals cause disruption of the epithelial barrier. Interleukin-10 (IL-10) is an important cytokine to regulated immune responses and to prevent excessive pro-inflammatory responses. Induction of IL-10 by different probiotic strains was measured with an *in vitro* test with peripheral blood mononuclear cells (figure 7) .



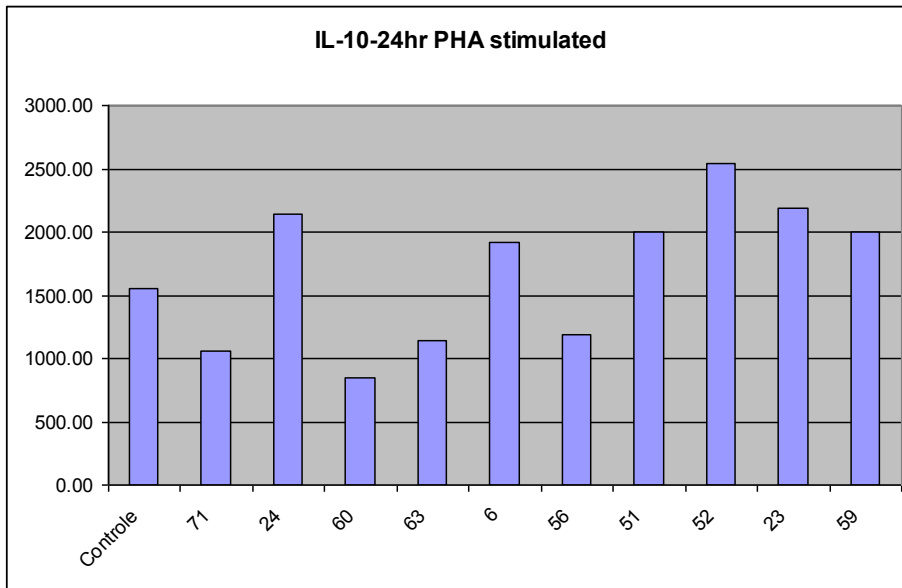
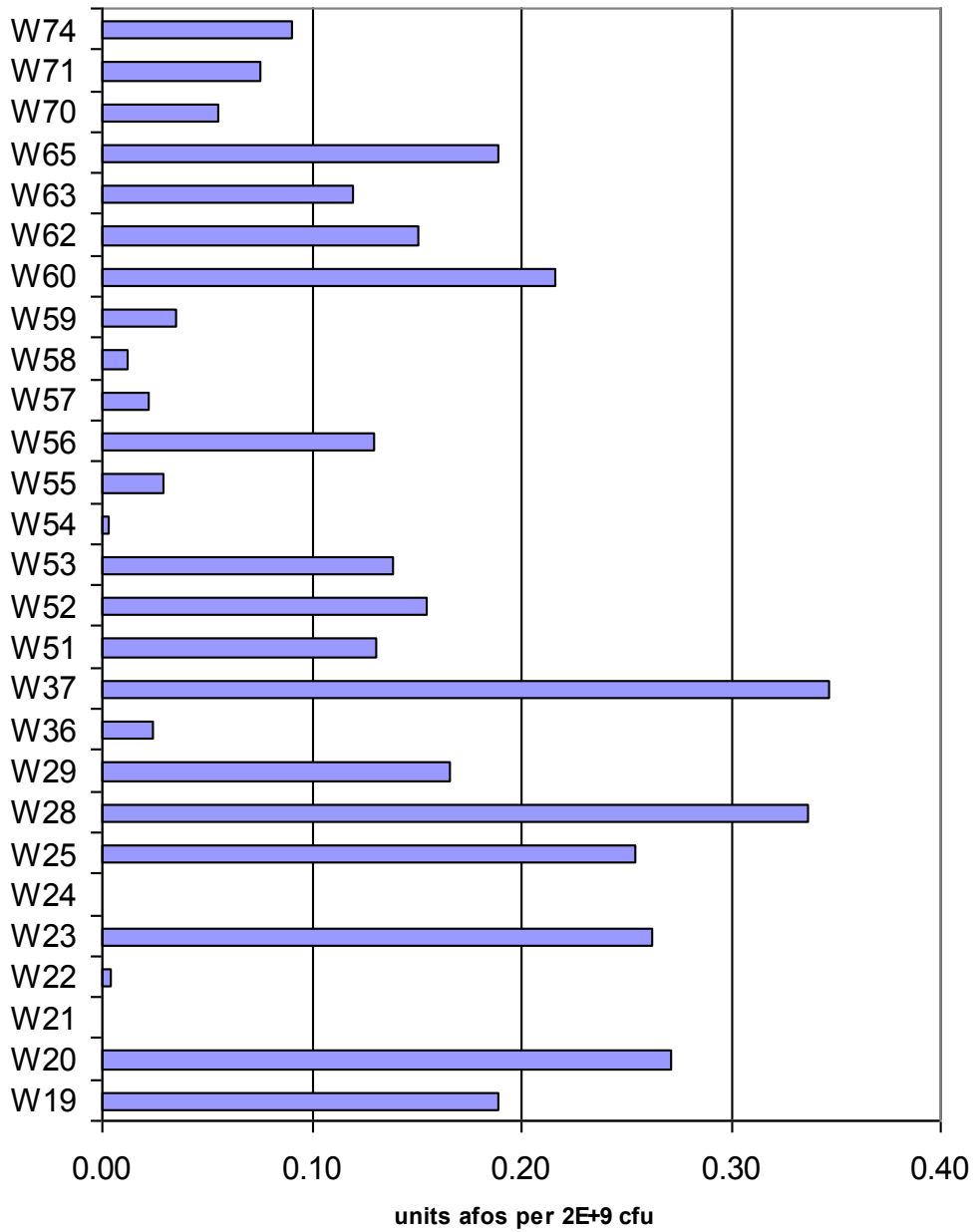


Figure 7: Stimulation of IL-10 production by bacterial strains.

Strains in Winlove-849 which stimulate IL-10 production are W23, W52 and W24.

Decreasing lipopolysaccharide (LPS) load

Lipopolysaccharide (LPS) is part of the cell wall of Gram-negative bacteria and is a very pro-inflammatory component. Leaky gut syndrome is associated with increased levels of LPS in blood plasma and lowering of the uptake of LPS is an important aspect of a good intestinal barrier function. Some probiotic bacteria have the capacity to break down LPS by the activity of the enzyme alkaline phosphatase. In an *in vitro* experiment the activity of this enzyme has been measured. In this assay the substrate p-nitrophenylphosphate is split into p-nitrophenol, which has a yellow colour. The colour intensity is measured with a spectrophotometer. The results are shown in figure 8. From the strains present in Winlove-849, W19, W23 and W37 are among the most active strains with regard to alkaline phosphatase activity.



f

Conclusions

Probiotic bacteria can have an effect on the epithelial barrier via different molecular pathways and routes. Therefore a multispecies product is a very good choice to support these different routes. All the strains present in Winclove-849 were carefully selected based on their *in vitro* capacities to improve the epithelial barrier in at least two different assays. In the near future, the effect of combining this product with other active ingredients will be investigated.

A probiotic product which improve the epithelial barrier might have positive effects on systemic inflammatory diseases and diseases associated with increased pro-inflammatory cytokines, like migraine, autism, diabetes type II, arthritis, liver cirrhosis and inflammatory bowel diseases. There are plans to test the effect on epithelial barrier function *ex vivo*, or *in vivo*.

References

1. A. Farhadi, A. Banan, J. Fields, and A. Keshavarzian, "Intestinal barrier: An interface between health and disease," *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 18, no 5, pp. 479-497, 2003.
2. A.M. Marchiando, W.V. Graham, and J.R. Turner, "Epithelial Barriers in Homeostasis and Disease," *Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease*, vol. 5, no pp. 119-144, 2010.
3. C.L. Ohland and W.K. Macnaughton, "Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol., no, 2010.
4. P.Y. Zheng, B.S. Feng, C. Oluwole, S. Struiksmā, X. Chen, P. Li, S.G. Tang, and P.C. Yang, "Psychological stress induces eosinophils to produce corticotrophin releasing hormone in the intestine," *Gut*, vol. 58, no 11, pp. 1473-1479, 2009.
5. F. Lutgendorff, *Defending the barrier. Effects of probiotic on endogenous defens mechanisms*. 2009, Universiteit Utrecht: Utrecht.
6. L.V. Hooper and J.I. Gordon, "Commensal host-bacterial relationships in the gut," *Science*, vol. 292, no 5519, pp. 1115-1118, 2001.
7. V. Delcenserie, D. Martel, M. Lamoureux, J. Amiot, Y. Boutin, and D. Roy, "Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract," *Curr Issues Mol Biol*, vol. 10, no 1-2, pp. 37-54, 2008.
8. H. Gill and J. Prasad, "Probiotics, immunomodulation, and health benefits," *Adv Exp Med Biol*, vol. 606, no pp. 423-454, 2008.
9. E. Nova, J. Warnberg, S. Gomez-Martinez, L.E. Diaz, J. Romeo, and A. Marcos, "Immunomodulatory effects of probiotics in different stages of life," *Br J Nutr*, vol. 98 Suppl 1, no pp. S90-95, 2007.

7.2. SF-36 FRAGEBOGEN

(1) SF36 - Fragebogen zum Gesundheitszustand			
Name:		Unters.-Datum:	
Vorname:		ID-Nr.:	
Geb.-Datum:		Tel.-Nr.:	

In diesem Fragebogen geht es um Ihre Beurteilung Ihres Gesundheitszustandes. Der Bogen ermöglicht es, im Zeitverlauf nachzuvollziehen, wie Sie sich fühlen und wie Sie im Alltag zurechtkommen.

Bitte beantworten Sie jede der folgenden Fragen, indem Sie bei den Antwortmöglichkeiten die Zahl ankreuzen, die am besten auf Sie zutrifft.

1. Wie würden Sie Ihren Gesundheitszustand im allgemeinen beschreiben? (Bitte kreuzen Sie nur eine Zahl an)

Ausgezeichnet	1
Sehr gut	2
Gut	3
Weniger gut	4
Schlecht	5

2. Im Vergleich zum vergangenen Jahr, wie würden Sie Ihren derzeitigen Gesundheitszustand beschreiben? (Bitte kreuzen Sie nur eine Zahl an)

Derzeit viel besser als vor einem Jahr	1
Derzeit etwas besser als vor einem Jahr	2
Etwa so wie vor einem Jahr	3
Derzeit etwas schlechter als vor einem Jahr	4
Derzeit viel schlechter als vor einem Jahr	5

3. Im folgendem sind einige Tätigkeiten beschrieben, die Sie vielleicht an einem normalen Tag ausüben. Sind Sie durch Ihren derzeitigen Gesundheitszustand bei diesen Tätigkeiten eingeschränkt? Wenn ja, wie stark? (Bitte kreuzen Sie in jeder Zeile nur eine Zahl an)

Tätigkeit	Ja, stark eingeschränkt	Ja, etwas eingeschränkt	Nein, überhaupt nicht eingeschränkt
a. anstrengende Tätigkeiten, z.B. schnell laufen, schwere Gegenstände heben, anstrengenden Sport treiben	1	2	3
b. mittelschwere Tätigkeiten, z.B. einen Tisch verschieben, staubsaugen, kegeln, Golf spielen	1	2	3
c. Einkaufstaschen heben oder tragen	1	2	3
d. mehrere Treppenabsätze steigen	1	2	3
e. einen Treppenabsatz steigen	1	2	3
f. sich beugen, knien, bücken	1	2	3
g. mehr als 1 Kilometer zu Fuß gehen	1	2	3
h. mehrere Straßenkreuzungen weit zu Fuß gehen	1	2	3
i. eine Straßenkreuzung weit zu Fuß gehen	1	2	3
j. sich baden oder anziehen	1	2	3

4. Hatten Sie in den vergangenen 4 Wochen aufgrund Ihrer körperlichen Gesundheit irgendwelche Schwierigkeiten bei der Arbeit oder anderen alltäglichen Tätigkeiten im Beruf bzw. zu Hause? (Bitte kreuzen Sie in jeder Zeile nur eine Zahl an)

Schwierigkeiten	Ja	Nein
a. Ich konnte nicht so lange wie üblich tätig sein	1	2
b. Ich habe weniger geschafft, als ich wollte	1	2
c. Ich konnte nur bestimmte Dinge tun	1	2
d. Ich hatte Schwierigkeiten bei der Ausführung (z.B. ich mußte mich besonders anstrengen)	1	2

5. Hatten Sie in den vergangenen 4 Wochen aufgrund seelischer Probleme irgendwelche Schwierigkeiten bei der Arbeit oder anderen alltäglichen Tätigkeiten im Beruf bzw. zu Hause (z.B. weil Sie sich niedergeschlagen oder ängstlich fühlen)? (Bitte kreuzen Sie in jeder Zeile nur eine Zahl an)

Schwierigkeiten	Ja	Nein
a. Ich konnte nicht so lange wie üblich tätig sein	1	2
b. Ich habe weniger geschafft, als ich wollte	1	2
c. Ich konnte nicht so sorgfältig wie üblich arbeiten	1	2

6. Wie sehr haben Ihre körperliche Gesundheit oder seelischen Probleme in den vergangenen 4 Wochen Ihre normalen Kontakte zu Familienangehörigen, Freunden, Nachbarn oder zum Bekanntenkreis beeinträchtigt? (Bitte kreuzen Sie nur eine Zahl an)

Überhaupt nicht	1
Etwas	2
Mäßig	3
Ziemlich	4
Sehr	5

7. Wie stark waren Ihre Schmerzen in den vergangenen 4 Wochen? (Bitte kreuzen Sie nur eine Zahl an)

Ich hatte keine Schmerzen	1
Sehr leicht	2
Leicht	3
Mäßig	4
Stark	5
Sehr stark	6

8. Inwieweit haben die Schmerzen Sie in den vergangenen 4 Wochen bei der Ausübung Ihrer Alltagstätigkeit zu Hause und im Beruf behindert? (Bitte kreuzen Sie nur eine Zahl an)

Überhaupt nicht	1
Etwas	2
Mäßig	3
Ziemlich	4
Sehr	5

9. In diesen Fragen geht es darum, wie Sie sich fühlen und wie es Ihnen in den vergangenen 4 Wochen gegangen ist. (Bitte kreuzen Sie in jeder Zeile die Zahl an, die Ihrem Befinden am ehesten entspricht).

Wie oft waren Sie in den vergangenen 4 Wochen ...

Befinden	Immer	Meistens	Ziemlich oft	Manchmal	Selten	Nie
a. ... voller Schwung?	1	2	3	4	5	6
b. ... sehr nervös?	1	2	3	4	5	6
c. ... so niedergeschlagen, daß Sie nichts aufheitern konnte?	1	2	3	4	5	6
d. ... ruhig und gelassen?	1	2	3	4	5	6
e. ... voller Energie?	1	2	3	4	5	6
f. ... entmutigt und traurig?	1	2	3	4	5	6
g. ... erschöpft?	1	2	3	4	5	6
h. ... glücklich?	1	2	3	4	5	6
i. ... müde?	1	2	3	4	5	6

10. Wie häufig haben Ihre körperliche Gesundheit oder seelischen Probleme in den vergangenen 4 Wochen Ihre Kontakte zu anderen Menschen (Besuche bei Freunden, Verwandte usw.) beeinträchtigt? (Bitte kreuzen Sie nur eine Zahl an)

Immer	1
Meistens	2
Manchmal	3
Selten	4
Nie	5

11. Inwieweit trifft jede der folgenden Aussagen auf Sie zu? (Bitte kreuzen Sie in jeder Zeile nur eine Zahl an)

Aussagen	Trifft ganz zu	Trifft weitgehend zu	Weiß nicht	Trifft weitgehend nicht zu	Trifft überhaupt nicht zu
a. Ich scheine etwas leichter als andere krank zu werden	1	2	3	4	5
b. Ich bin genauso gesund wie alle anderen, die ich kenne	1	2	3	4	5
c. Ich erwarte, daß meine Gesundheit nachläßt	1	2	3	4	5
d. Ich erfreue mich ausgezeichneter Gesundheit	1	2	3	4	5