

Untersuchungen zur immunologischen Wirkung von SANUKEHL® Coli auf Blasenepithelzellen

von HP Dr. rer. nat. Dieter Sonntag

Eine Dysbiose im Harntrakt geht oft mit einer Vermehrung von bestimmten Erregern einher, wodurch sich z.B. eine Zystitis entwickeln kann. Meist handelt es sich hierbei um fakultative pathogene *E. coli* Stämme, welche sich auch zu intrazellulären Formen entwickeln können (1; 2). Um den natürlichen Heilungsprozess zu initiieren, wird das angeborene Immunsystem u.a. durch die Bindung von uropathogenen Bakterien an TLR4 (Toll-Like Receptor) und damit die Akute Phase Reaktion aktiviert (Abb. 1) (4). Durch die Bindung über Lipopolisaccharide (LPS) der Bakterienwände an TLR4 der Blasenepithelzellen (Urothel) wird in den Zellen eine Signalkaskade ausgelöst, welche zu einer Aktivierung von NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) führt und eine Entzündungsreaktion einleiten kann. NF- κ B reguliert die Expression verschiedener immunmodulatorischer Zytokine, wie TNF- α (Tumornekrosefaktor α), IL-6 (Interleukin), IL-8 und IL-10 (5; 6; 7). TNF- α stimuliert die Induktion der Apoptose von Epithelzellen, welche zu einem Abschilfern (Exfoliation) der infizierten Zellenoberfläche und zur Gesundung des Urothels führt (Abb.1) (8). Darüber hinaus initiiert es die Abwehr von intrazellulären Erregern. Dieser "natürliche" Heilungsprozess kann durch andere Stoffwechselerkrankungen im Organismus und durch unbedachte Antibiotikagaben beeinträchtigt werden. Insbesondere durch eine Mehrfachgabe von Antibiotika in kurzen Zeitabständen können pathogene Keime entstehen, die ein verändertes, stark verlangsamtes Wachstum aufweisen, vom Immunsystem nicht mehr als pathogen erkannt werden und eine Antibiotikaresistenz aufweisen. Ein

Beispiel hierfür sind die Small Colony Variants (SCV) und einige intrazelluläre Erreger, die dann eine Ursache für chronische infektiöse Erkrankungen der Harnorgane sein können (Abb. 2).

In der isopathischen Therapie wird SANUKEHL® Coli D6 (Escherichia (E.) coli extractum) *E. coli* (DSMZ Nr. 14345) gemeinsam mit anderen Iso-pathika zur Behandlung von chronischen Infektionen und Zystitiden eingesetzt (3). Ziel dieser Untersuchung war es, erste Hinweise auf den immunologischen und zellbiologischen Wirkmechanismus von SANUKEHL® Coli zu gewinnen.

In dieser Studie wurde deshalb der *in vitro* Effekt von SANUKEHL® Coli in den Potenzen D4 bis D8 auf Blasenepithelzellen untersucht. Als Zelllinie wurden T 24 human bladder cancer cells (T24) eingesetzt und die Freisetzungsrates der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6, IL-8 sowie des entzündungshemmenden Zytokins IL-10 bestimmt. TNF- α und IL-8 sind verantwortlich für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Die Wirkung von IL-6 reicht jedoch weiter. IL-6 stimuliert u.a. die Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen; also das humorale Im-

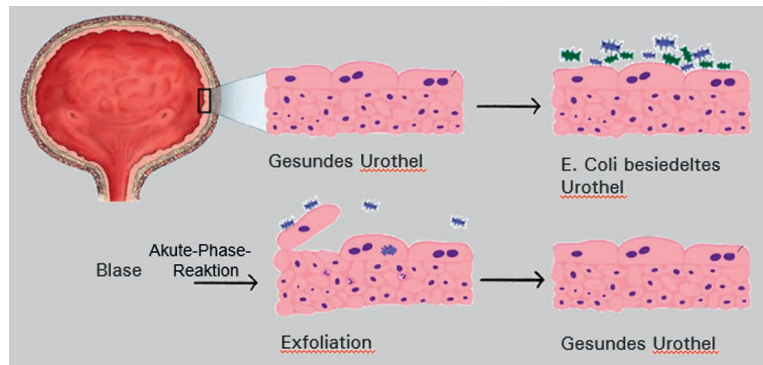


Abb. 1: Pathophysiologie der Zystitis nach Rosen et al. (1)

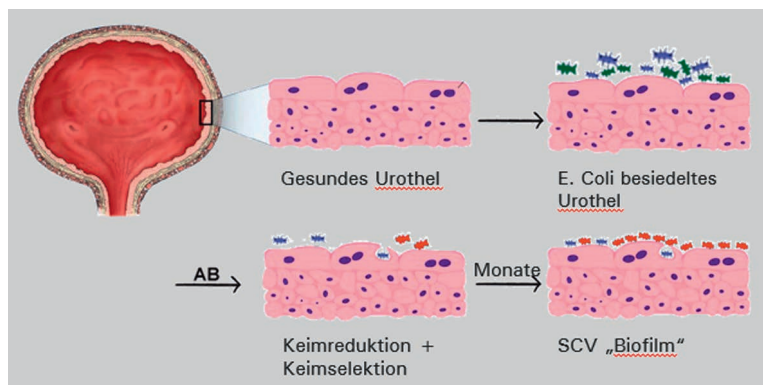


Abb. 2: Modell für die Entwicklung von Small Colony Variants auf den Endothelzellen (Urothel) der Blase nach mehrfacher Antibiotikagabe. AB= Antibiotika (1)



munsystem. IL-10 zählt dagegen zu den antiinflammatorischen Zytokinen.

Im Folgenden sind die Ergebnisse für SANUKEHL® Coli D6 angegeben. Untersucht wurde die *in vitro* Zytokinproduktion bei nicht entzündeten, also immunologisch inaktiven T24 Zellen (Situation nach SCV-Besiedlung) und bei immunologisch aktivierten, entzündeten T24 Blasenepithelzellen; Letztere sind *in vivo* eine Voraussetzung für den Heilungsprozess. In diesem Zellkultursystem wurden nicht entzündliche Zellen als solche definiert, welche ohne LPS kultiviert wurden. Dagegen erlangten T24 Zellen die zusammen mit LPS kultiviert wurden, den Status von entzündeten Zellen. Diese beiden Zellkulturen wurden mit den verschiedenen Potenzen von SANUKEHL® Coli für 24h inkubiert. Anschließend wurde ein MTT Assay durchgeführt (s.u.). Keine der getesteten Potenzen war nach 24h zytotoxisch für die Zellen.

MTT Assay

Mittels des MTT Assay kann die metabolische Aktivität von Zellen bestimmt werden. Unter den Versuchsbedingungen des Testes korreliert die metabolische Aktivität der Zellen mit der Zellviabilität. Die Zellen werden zunächst mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Anschließend wird MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) für ca. 4 Stunden mit hinzugegeben. MTT ist ein gelbes Reagenz, welches durch lebende Zellen gespalten wird. Als Spaltprodukt entsteht purpurfarbendes Formazan. Bei 550nm kann die Extinktion und damit die Menge des gebildeten Formazans bestimmt werden. Nur lebende Zellen mit intakten Mitochondrien können MTT zu Formazan spalten. Tote und kürzlich verstorbene Zellen spalten keine signifikanten Mengen an MTT.

Diskussion und Schlussfolgerung

In nicht entzündeten Zellen (ohne LPS) erhöhen SANUKEHL® Coli D6 Tropfen signifikant die Expression von IL-6 und IL-8. Eine Freisetzung von TNF- α konnte in den T24 Zellen ebenfalls beobachtet werden (Abb. 3). Die Freisetzungsstärke der Zytokine war von der untersuchten Potenz abhängig (Daten nicht gezeigt).

In entzündeten Zellen (in Anwesenheit von LPS) kam es durch SANUKEHL® Coli D6 zu einer leichten Verminderung der Expression von IL-6 und IL-8. Die TNF- α -Expression wurde dagegen in der Gegenwart von LPS signifikant vermindert (Abb. 4). Das anti-entzündliche Zytokin IL-10 (9) konnte dagegen nicht im

Überstand der T24 Blasenepithelzellen nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass SANUKEHL® Coli D6 einen immunmodulierenden Effekt hat. In entzündeten T24 Zellen wurde die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine reduziert. Nicht entzündete, immunologisch inaktive Zellen, werden hingegen stimuliert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen in der therapeutischen Anwendung der SANUKEHL® Coli D6 Tropfen. Bei chronischen Infektionen, welche z.B. durch SCV oder intrazelluläre *E. coli* ausgelöst werden und wo die immunologische Abwehr nicht aktiv ist, stimuliert hiernach SANUKEHL® Coli D6 das Immunsystem, speziell auch die Akut-Phase-Reaktion

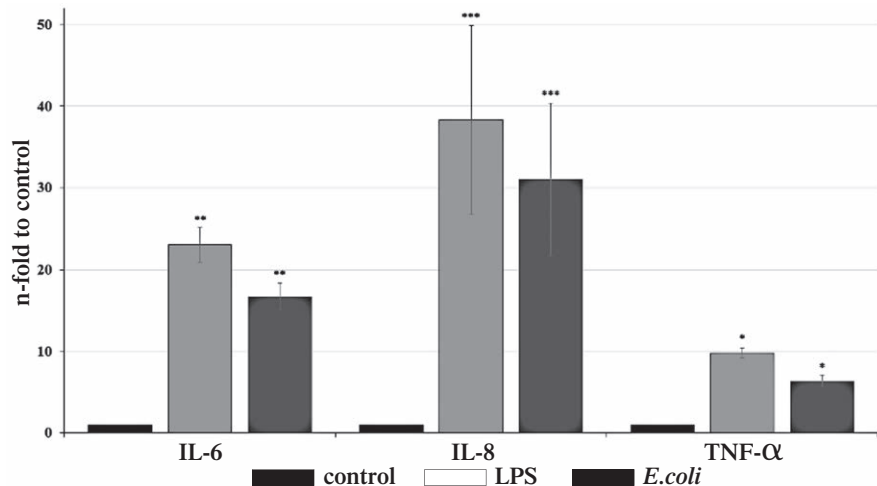


Abb. 3: Effekt von SANUKEHL® Coli D6 auf die Ausschüttung von IL-6, IL-8 und TNF- α in nicht entzündeten T24 Zellen.

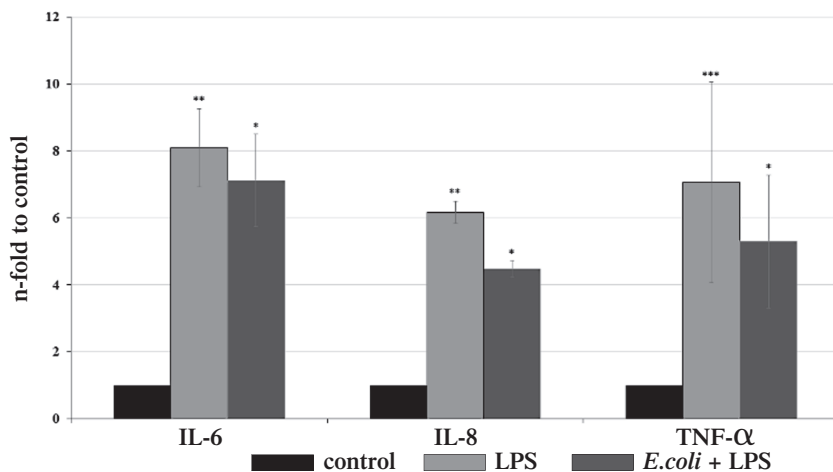


Abb. 4: Effekt von SANUKEHL® Coli D6 auf die Ausschüttung von IL-6, IL-8 und TNF- α in entzündeten T24 Zellen.

(Abb. 5). Hierdurch wird vermutlich der Heilungsprozess bei chronischen „stillen“ Infektionen angeregt, was im Detail in weiteren Studien zu klären ist. □

Teile dieser Arbeit wurden publiziert im *Journal of Complementary Medicine & Alternative Healthcare* J1(4), 2017

Literaturverzeichnis

1. Rosen DA, Thomas MH, Walter ES, Peter AH, Scott JH. Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med.* 2007, 4(12): e329.
2. Hummers-Pradier E, Ohse AM, Koch M, Heizmann WR, Kochen MM. Management of urinary tract infections in female general practice patients. *Fam Pract.* 2005, 22(1): 71-77
3. R. Heidl. Statistische Auswertung einer Anwendungsbeobachtung mit der Präparateserie Sanukehl Coli. *Sanum-Post* 2007, 79: 14-20.
4. WC. Reygaert. Innate Immune Response to Urinary Tract Infections Involving Escherichia coli. *J Clin Cell Immunol.* 2014, 5: 280.

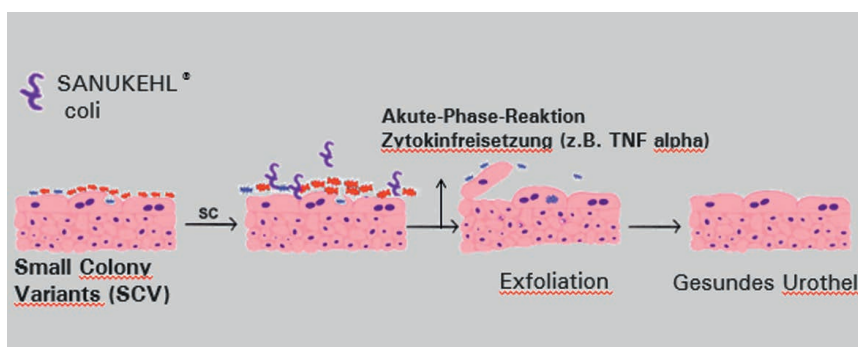


Abb. 5: Hypothese zum Wirkmechanismus von SANUKEHL® Coli. Immunologisch hypoaktive mit SCV infizierte Urothelzellen werden durch SANUKEHL® Coli aktiviert, sodass die Akute-Phase-Reaktion initiiert und der Heilungsprozess angeregt wird. SC = SANUKEHL® Coli

5. Backhed F, Söderhäll M, Ekman P, Normark S, Richter-Dahlfors A. Induction of innate immune responses by Escherichia coli and purified lipopolysaccharide correlate with organ- and cell-specific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. *Cell Microbiol.* 2001, 3(3): 153-158.
6. Abdel-Mageed AB, Bajwa A, Shenassa BB, Human L, Ghoniem GM. NF-KB-dependent gene expression of proinflammatory cytokines in T24 cells: possible role in interstitial cystitis. *Urological Research* . 2003, 31(5): 300-305.
7. Masmudur MR, Grant MF. Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathogens.* 2006, 22(2): e4.
8. Polunovsky VA, Wendt CH, Ingbar DH, Peterson MS, Bitterman PB. Induction of endothelial cell apoptosis by TNF alpha: modulation by inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res.* 1994, 214(2): 584-594.
9. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* . 2008, 226: 205-218.