

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

„Der Einfluss des Probiotikums
Enterococcus faecium NCIMB 10415
auf die absorptiven und sekretorischen
Eigenschaften des Jejunumepithels beim Schwein“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Anja Dillenseger
Tierärztin aus Pirmasens

Berlin 2012

Journal-Nr. 3626

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Holger Martens
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Reinhard Fries
Dritter Gutachter: PD Dr. Petra Reinhold

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs, probiotics, Enterococcus faecium, jejunum, secretion, absorption,
ion transport, digestive tract mucosa

Tag der Promotion: 20. November 2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-407-0

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

A. Inhaltsverzeichnis

A. Inhaltsverzeichnis	3
B. Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
2. Literaturübersicht	12
2.1 Der Darm des Schweins und seine Eigenschaften	12
2.1.1 Anatomische und histologische Grundlagen	12
2.1.2 Einteilung der Epithelien	12
2.1.3 Funktionelle Eigenschaften des Dünndarmepithels	13
2.1.4 Die Verdauung	14
2.1.4.1 Die Kohlenhydrat-Verdauung	14
2.1.4.2 Die Fett-Verdauung	14
2.1.4.3 Die Protein-Verdauung	14
2.1.5 Die Keimflora des Verdauungstraktes	15
2.1.6 Schutzfunktionen des Darmepithels	17
2.1.6.1 Das darmeigene Immunsystem	17
2.1.6.2 Nicht-immunologische Darmabwehr	18
2.1.6.3 Die Entwicklung des darmeigenen Immunsystems bei Schwein	19
2.1.6.4 Induktion der intestinalen Immunantwort	21
2.2 Die Phase des Absetzens	22
2.3 Antibiotika und Futtermittelzusatzstoffe	24
2.4 Probiotika: Alternative Leistungsförderer?	26
2.4.1 Definition und Einordnung	26
2.4.2 Anforderungen an probiotische Keime	28
2.4.3 Kriterien zur Auswahl von Keimen als Probiotikum	29
2.4.4 Verwendung von Probiotika in Human- und Tiermedizin sowie Nutztierhaltung	30
2.4.4.1 Einsatz in der Humanmedizin	30
2.4.4.2 Einsatz in Tiermedizin und Nutztierhaltung	31
2.4.5 Beeinflussung der Transportphysiologie im Dünndarm	32
2.4.5.1 Probiotikawirkung auf die Absorptionsleistung des Dünndarms	32
2.4.5.2 Probiotikawirkung auf die Sekretionsleistung des Dünndarms	33
2.4.6 Probiotikawirkung auf die Barrierefunktion des Dünndarms	34
2.4.7 Beeinflussung der Epithelmorphologie und –differenzierung	35
2.4.8 Beeinflussung der Immunität	36

2.4.9 Die Gattung <i>Enterococcus</i>	39
2.4.9.1 Taxonomie	39
2.4.9.2 Eigenschaften von Enterokokken	39
2.4.9.3 <i>Enterococcus faecium</i>	40
2.5 Interleukin-1 α	41
2.5.1 Wirkungsweise des proinflammatorischen Zytokins IL-1 α	42
2.5.2 IL-1 α und epithelialer Transport	43
2.5.3 Laktobazillen und Zytokinexpression	44
2.6 Prostaglandine und Indomethacin	45
2.7 Transportmechanismen	46
2.7.1 Glucosetransport	46
2.7.2 Phlorizin: Hemmung des Na ⁺ -abhängigen Glucose-Transporters	49
2.7.3 Chloridtransport über den CFTR-Chloridkanal	50
2.7.4 Der L-Glutamintransport	52
2.8 Zusammenfassung der Literatur – Arbeitshypothesen	53
3. Tiere, Material und Methoden	55
3.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung	55
3.1.1 Versuchstiere	55
3.1.2 Haltung und Fütterung der Versuchsferkel	55
3.1.3. Haltung und Fütterung der Muttersauen	56
3.2. Tötung der Versuchstiere	56
3.3 Probengewinnung und Gewebepräparation	57
3.4 Versuchsdurchführung mittels Ussing-Kammer-Methode	57
3.4.1 Die Ussing-Kammer-Methode	58
3.4.2 Versuchsablauf	60
3.5 Lineare und nicht-lineare Regression, Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max}	63
3.5.1 Lineare Regression	63
3.5.2 Nicht-lineare Regression	65
3.6 Statistische Auswertung	65
3.6.1 Kriterien zur Aufnahme in die Auswertung	65
3.6.2 Auswertung und Berechnung der Daten	66
3.6.3 Datenanalyse	67
3.6.4 Kinetik	68

4. Ergebnisse	69
4.1 Beeinflussung des I_{sc} im mittleren Jejunum von Schweinen durch die Zugabe von PGE ₂ , Glucose und L-Glutamin	69
4.1.1 Reaktion des Kurzschlussstroms auf serosale Zugaben steigender PGE ₂ -Konzentrationen	69
4.1.2 Reaktion des Kurzschlussstroms auf mukosale Zugaben aufsteigender Glucosekonzentrationen	82
4.1.3 Reaktion des Kurzschlussstroms auf mukosale Zugaben von 12 mmol • l ⁻¹ L-Glutamin	94
4.2 Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max}	96
4.2.1 Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} für die Reaktion des Jejunumepithels auf die Zugabe von PGE ₂	96
4.2.2 Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} bezüglich der Reaktion des Jejunumepithels auf die Zugabe von Glucose	97
4.3 Die Wirkung von IL-1 α auf Jejunumepithelien von Schweinen	98
4.3.1 Vorversuch: Antwort des Kurzschlussstroms auf die serosale Zugabe steigender IL-1 α -Konzentrationen	98
4.3.2 Antwort des Kurzschlussstroms auf die serosale Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α	99
4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	111
4.4.1 Ergebniszusammenfassung: PGE ₂	111
4.4.2 Ergebniszusammenfassung: Glucose	112
4.4.3 Ergebniszusammenfassung: L-Glutamin	112
4.4.4 Ergebniszusammenfassung: diverse Konzentrationen von Interleukin-1 α	113
4.4.5 Ergebniszusammenfassung: Interleukin-1 α mit Phlorizin	113
5. Diskussion	114
5.1 Diskussion der Methode	114
5.1.1 Haltung und Fütterung der Versuchstiere	114
5.1.2 Versuchstiertötung und Versuchsablauf	115
5.1.3 Berechnung und Auswertung der Daten	116
5.2 Diskussion der Ergebnisse	117
5.2.1 Diskussion der Beeinflussung der PGE ₂ -stimulierten Sekretion durch <i>E. faecium</i> NCIMB 10415	117
5.2.1.1 Reaktion des Kurzschlussstroms auf serosale Zugaben steigender PGE ₂ -Konzentrationen	118
5.2.1.2 Kinetik der PGE ₂ -stimulierten Sekretion	119

5.2.2 Diskussion der Beeinflussung der Absorption durch <i>E. faecium</i> NCIMB 10415	121
5.2.2.1 Diskussion der Versuche mit steigenden Glucose-Konzentrationen	121
5.2.2.1.1 Reaktion des Kurzschlussstroms auf mukosale Zugaben steigender Glucose-Konzentrationen	121
5.2.2.1.2 Kinetik der Glucose-Absorptionsversuche	123
5.2.2.2 Diskussion der Versuche mit L-Glutamin	125
5.2.3 Mögliche Beeinflussung des Natriumabhängigen Glucosetransporters SGLT-1 durch IL-1 α	126
5.3 Überblick über die Ergebnisse der Forschergruppe FOR 438	129
5.4 Diskussion des Zeitpunktes der probiotischen Supplementierung	134
5.5 Schlussfolgerung	135
6. Zusammenfassung	137
7. Summary	139
8. Anhang	141
8.1 Verwendete Puffer	141
8.1.1 Glucosepuffer	141
8.1.2 Mannitpuffer	141
8.1.3 Transportpuffer	142
8.2 Firmenverzeichnis	142
8.3 Lösungen und Firmenadressen	143
8.4 Diätfutter	146
8.5 Berechnungen für die Kinetik	147
8.5.1 Startwerte der Kinetik	147
8.5.2 Umrechnung des Kurzschlussstromes I_{scmax} in die Transportgeschwindigkeit V_{max}	148
8.6 ΔI_{sc} bei Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α serosal und 500 μ mol/l Phlorizin mukosal	149
9. Literaturverzeichnis	152
10. Publikationsverzeichnis	165
11. Danksagung	166
12. Selbständigkeitserklärung	167

B. Abkürzungsverzeichnis

ABC-Proteine	ATP-binding cassette membrane transporter gene superfamily
Ag/AgCl	Silber/Silberchlorid
AJ	Adherens Junctions
AJC	Apical Junctional Complexes
ASFs	Antisekretorische Faktoren
BBMV	Brushborder Membrane Vesicles
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
CFU	Koloniebildende Einheiten
cGMP	zyklisches Guanosin-3'-5'-Monophosphat
Cl ⁻	Chlorid
COX-1 und -2	Cyclooxygenase-1 und -2
d	Tag
ddP0, ΔdP0	Differenz der Gewebepotentialdifferenzen zu den I _{sc} -Zeiten
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dI _{sc} , ΔI _{sc}	Differenz des Kurzschlussstromes berechnet aus der Differenz der I _{sc} -Werte eine Minute vor Zugabe der entsprechenden Substanzen und nach Zugabe der Substanzen wobei je Substanz unterschiedliche Zeitpunkte gewählt wurden)
dP	Elektroden-Eigenpotentialdifferenz
dP0	Gewebepotentialdifferenz
dR _t , ΔR _t	Differenz des transepithelialen Widerstandes (Berechnung analog zum dI _{sc})
E. faecium	<i>Enterococcus faecium</i> NCIMB 10415 (syn. SF68)
ER	endoplasmatisches Retikulum
EU	Europäische Union
F	Faradaykonstante
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GALT	darmassoziiertes lymphatisches Gewebe
GIT	Gastrointestinaltrakt
GLUT	Natrium-unabhängiger Glucose-Transporter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
G _t	transepitheliale Gewebeleitfähigkeit (1 R _t ⁻¹)

HMIT	H ⁺ -gekoppelter Myo-Inositol-Transporter
HSC 70	Heat Shock Cognate 70
HSE	Heat Shock Elemente
HSFs	Heat Shock Faktoren
Hsps	Heat Shock Proteine
IgA, IgM bzw. IgG	Immunglobulin A, M bzw. G
ICE	IL-1 β -Converting Enzyme
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
IL-1Ra	IL-1-Rezeptorantagonist
IL-1RAcP	IL-1 Rezeptor-akzessorisches Protein
IL-1RI und II	IL-1-Typ-I- und II-Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickoxid-Synthase
I _{sc}	Kurzschlussstrom
I _{sc max}	maximaler Kurzschlussstrom
IU	Internationale Einheiten
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LAB	Milchsäurebakterien
LT	Lebenstag
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Monozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MDT	Magen-Darm-Trakt
MG	Molekulargewicht
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mmol	Millimol
MRL	Maximum Residue Limit
μ l	Mikroliter
n	Stoffmenge
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natrium-Chlorid
NaHCO ₃	Natriumbicarbonat
NaH ₂ PO ₄	Natrium-Dihydrogenphosphat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natrium-Hydrogenphosphat

NFκB	Nuclear Factor-Kappa B
nm	Nanometer
NO	Stickoxid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PD _t	Gewebepotentialdifferenz
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGs	Prostaglandine
PKC	Proteinkinase C
PLA ₂ II	Typ II Phospholipase A ₂
PMN	polymorphkernige Leukozyten
PP2C, PP2A	Proteinphosphatase 2C und 2A
R _t	transepithelialer Widerstand
S	Substrat
SGLT-1	Natrium-gekoppelter Glucosetransporter 1
sHsp	small Hsp
slgA	sekretorisches IgA
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TJ	Tight junction
TGF-α	Transforming-Growth-Factor
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
V ₀	Transportgeschwindigkeit [transportierte Stoffmenge/Fläche und Zeit]
V _{max}	maximale Transportgeschwindigkeit
ZO-1	Zonula Occludens-1
α = 5 % bzw. p ≤ 0,05	Alpha-Fehler bzw. Signifikanzniveau

1. Einleitung

Was sind 'Probiotika'? Laut Fuller (1992) versteht man darunter „lebende Mikroorganismen, die beim Wirt nach der Aufnahme die mikrobielle Darmflora positiv beeinflussen“. Eine Schlüsselrolle des derzeit auch in der Humanernährung sehr erfolgreichen Einsatzes probiotischer Keime spielt der russische Bakteriologe und Nobelpreisträger Ilja (Elie) Metschnikoff. Er vermutete bereits zu Beginn des Zwanzigsten Jahrhunderts einen Zusammenhang zwischen dem Konsum fermentierter Milchprodukte und den hohen Lebenserwartungen bulgarischer Bürger (Fuller, 1992), und machte dafür eine Verdrängung pathogener Keime durch die zugeführten probiotischen Mikroorganismen als Wirkmechanismus verantwortlich (Davidson und Hirsh, 1976). Aufbauend auf diesen Ansatz werden bis zum heutigen Tag zunehmend die positiven Effekte probiotischer Keime auf den menschlichen und tierischen Organismus untersucht.

Durch das seit dem 01. Januar 2006 geltende Verbot der Verwendung von Antibiotika als Leistungsförderer werden neben z.B. organischen Säuren und Prebiotika zunehmend Probiotika als potentieller Ersatz im Großtierbereich diskutiert. Die in der Humanernährung seit längerem eingesetzten probiotischen Keime zeigen bereits positive Effekte hinsichtlich ihrer Wirksamkeit, unter anderem bei Erkrankungen des Magen-Darm-Traktes (Heyman, 2000; Marteau et al., 2001; Ouwehand et al., 2002; Resta-Lenert und Barrett, 2003).

Um die möglichen positiven Effekte zu objektivieren, ist es essentiell, die genauen Wirkmechanismen der probiotischen Mikroorganismen zu untersuchen. Ist es beispielsweise beim Schwein durch die Supplementierung von Probiotika möglich, das Auftreten von Durchfallerkrankungen bei Absatzferkeln zu reduzieren oder eine Steigerung der Aufnahme an Nährstoffen aus dem Darm zu bewirken? Kann die mikrobielle Darmflora beeinflusst werden? Zeigen sich durch die Supplementierung mit Probiotika immunologische Veränderungen des darmeigenen Immunsystems?

Mit diesen Fragen befasst sich zurzeit ein interdisziplinäres Projekt, welches die veterinärmedizinischen Institute Physiologie, Anatomie, Biochemie, Tierernährung, Mikrobiologie und Immunologie der Freien Universität Berlin im Rahmen der DFG Forschergruppe (FOR) 438 einbezieht. Der Fokus liegt dabei auf den möglichen Auswirkungen, die durch eine Supplementierung mit *Enterococcus (E.) faecium* NCIMB 10415 bei Ferkeln unterschiedlicher Lebensstage beobachtet werden können (siehe Kapitel 5.3 *Überblick über die Ergebnisse der Forschergruppe FOR 438*). Die einzelnen beteiligten Institute untersuchen dabei die Einflussnahme des Probiotikums auf die Stoffwechselaktivität

gastrointestinaler Mikrobiota sowie auf die epitheliale Oberflächenintegrität des Darmes (Sharbati, 2010). Darüber hinaus sind die möglichen Veränderungen der immunologischen Verhältnisse (Scharek-Tedin, 2009) sowie der mikrobiellen Besiedlung des Dünndarmes (Klär 2008; Schierack et al., 2007) von Interesse.

Schwerpunkt der eigenen Arbeit als Teilprojekt im Rahmen der DFG Forschergruppe 438 ist die Untersuchung möglicher Effekte des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 auf absorptive und sekretorische Eigenschaften des mittleren Dünndarmes. Konkret steht im Fokus der Untersuchungen, ob *E. faecium* NCIMB 10415 einen positiven Einfluss auf die Chloridsekretion (als möglicher Parameter der sekretorischen Diarrhöe) haben könnte. Des Weiteren ist von Interesse, ob durch Einsatz des Probiotikums eine Steigerung der Glucose- und Glutaminabsorption und damit eine Erhöhung der Nährstoffaufnahme erreicht werden kann. Darüber hinaus wird die Wirkung des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-1 α auf den Natriumabhängigen Glucosetransporter SGLT-1 von Ferkeln untersucht. Dazu werden Ferkel des 14., 28., 31., 35. und 56. Lebensstages mit *E. faecium* NCIMB 10415 supplementiert (Probiotika-Gruppe) und mit un-supplementierten Tieren (Kontroll-Gruppe) gleichen Alters verglichen. Die beiden unterschiedlich supplementierten Gruppen werden nachfolgend als Fütterungsgruppen bezeichnet. Alle genannten Untersuchungen werden dabei mit der von Ussing und Zerahn (1951) entwickelten Ussing-Kammer-Methode durchgeführt.

2. Literaturübersicht

2.1 Der Darm des Schweins und seine Eigenschaften

2.1.1 Anatomische und histologische Grundlagen

Der Dünndarm nimmt im Rahmen der Verdauung eine wichtige Rolle ein, da hier die Absorption der meisten Nährstoffe erfolgt. Beim neugeborenen Ferkel misst der Dünndarm, bestehend aus *Duodenum*, *Jejunum* und *Ileum*, ca. dreieinhalb Meter und kann bei adulten Schweinen bis zu 20 Metern Länge erreichen (Zhang und Xu, 2003). Da der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit auf der Transportphysiologie und Barrierefunktion des Dünndarmes liegt, wird für detaillierte Informationen bezüglich des Dickdarmes auf die entsprechende Fachliteratur verwiesen.

Der Wandaufbau des Magen-Darm-Traktes ist, trotz funktionsbedingter Spezialisierungen einzelner Abschnitte, grundsätzlich gleich und gliedert sich von luminal nach serosal in die *Tunica mucosa* (Mucushaut; Oberflächenvergrößerung durch Zotten und Krypten), *Tela submucosa* (unter der Mucushaut liegendes lockeres Bindegewebe; fungiert als Gleit- und Verschiebeschicht), *Tunica muscularis* (glatte Muskulatur mit innerer zirkulärer und äußerer longitudinaler Schicht; die Stimulation erfolgt über das autonome Nervensystem), *Tunica adventitia* (lockeres Bindegewebe als Verbindeschicht), *Tela subserosa* (lockeres Bindegewebe) und die *Tunica serosa* (einschichtiges Plattenepithel als Deckschicht) (Liebich, 1999a).

2.1.2 Einteilung der Epithelien

Die Aufgabe von Epithelien ist nicht allein auf den Transport von Nährstoffen, Elektrolyten und Wasser beschränkt, vielmehr dienen Epithelien auch als Barrieren zwischen der Außenwelt und dem inneren Milieu (Powell, 1981). Transportphysiologisch existieren zwei Wege, über die gelöste Stoffe ein Epithel passieren können: zum einen transzellulär über die apikale und basolaterale Membran, zum anderen parazellulär (Powell, 1981). Dieser parazelluläre Weg schließt entweder eine Barriere (Tight junction; TJ) oder zwei Barrieren (Tight junction und Interzellularraum) ein (Powell, 1981). Tight Junctions stellen dabei Zell-Zell-Kontakte her. Sie bestehen aus einem Proteincluster, zu dem zum Beispiel Zonula Occludensprotein 1, 2 und 3, Cingulin und 7H6 sowie die Transmembranproteine Occludin und Claudin gehören und können die Festigkeit bzw. Permeabilität des Zell-Zell-Kontaktes über den Grad ihrer Phosphorylierung sowie durch Kalzium den jeweiligen Erfordernissen des Epithels anpassen (Baumgart und Dignass, 2002). Für mehrschichtige Epithelien wird ein ähnlicher Transportweg vermutet (Powell, 1981). Vereinfacht lässt sich ein Epithel als einfacher elektrischer Stromkreis, bestehend aus Batterien und Widerständen, darstellen,

wobei zwei Widerstände parallel zwischen der mukosalen und der serosalen Lösung geschaltet sind: der zelluläre (R_c) und der parazelluläre (R_s) Widerstand (Powell, 1981). Diese Widerstände bestehen wiederum aus zwei in Serie geschalteten Widerständen: der R_c setzt sich zusammen aus dem Widerstand der apikalen und der basolateralen Membran, der R_s aus dem Widerstand der Tight junctions und des Interzellulärspaces (Powell, 1981). Jede dieser epithelialen Barrieren besitzt zwei Eigenschaften, die elektrophysiologisch messbar sind: die Permeabilität der Barriere, messbar über den elektrischen Widerstand und die qualitativ messbare Selektivität der Barriere für Kationen oder Anionen (Powell, 1981).

Der Widerstand ermöglicht es, Epithelien in dichte (z.B. Magenfundus und Ösophagus), mäßig dichte (Kolon und Antrum des Magens) oder lecke Epithelien (Gallenblase, Dünndarm) einzuteilen (Powell, 1981). Dabei werden Epithelien als 'leck' bezeichnet, wenn ihr Widerstand (R_t) unter $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ beträgt, der zelluläre Widerstand größer als der parazelluläre Widerstand ist ($R_c / R_s > 1$) oder die parazelluläre Leitfähigkeit (G_s) größer als 50% der gesamten Gewebeleitfähigkeit (G_t) beträgt (Powell, 1981).

Diese Eigenschaften von Epithelien ermöglichen es, bei transportphysiologischen Versuchen objektivierbare Parameter zu erfassen. Auf die bei der Versuchsdurchführung angewandte Technik wird im Kapitel 3. *Tiere, Material und Methoden* detaillierter eingegangen.

2.1.3 Funktionelle Eigenschaften des Dünndarmepithels

Die in der *Submucosa* des Dünndarmes gelegenen Brunnerschen Drüsen sezernieren, angeregt durch den Parasympathikus, Mucus (mittels Exocytose) und Bicarbonat (über spezielle $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher) in das *Duodenum* und tragen somit zum Schutz vor dem sauren Mageninhalt bei (Scharrer und Wolfram, 2000). Zur Neutralisation des vom Magen sezernierten HCl ist das Epithel des *Duodenum*s ebenfalls in der Lage Bicarbonat sowohl transzellulär wie auch parazellulär zu sezernieren, wobei an der transzellulären Sekretion ein in der basolateralen Membran des Zottenepithels gelegener $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransport sowie ein $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher in der apikalen Membran beteiligt ist; des Weiteren ist ein für HCO_3^- und Cl^- durchgängiger Anionenkanal in der apikalen Membran lokalisiert (Scharrer und Wolfram, 2000). Die im Darmepithel von proximal nach distal in zunehmender Anzahl vorhandenen Becherzellen geben ebenfalls, wie die Brunnerschen Drüsen, Mucus ab und bieten dem gesamten Darm einen Schutz gegenüber mechanischen, chemischen sowie von Parasiten, Viren oder Bakterien ausgehenden Noxen (Scharrer und Wolfram, 2000).

Die Lieberkühnschen Krypten im Dünndarm übernehmen die Funktion des kontinuierlichen Ersatzes neuer Epithelzellen, die vor allem absorptive Aufgaben übernehmen (Scharrer und Wolfram, 2000). Die Lebensdauer der Darmepithelzellen beträgt bei adulten Tier ca. zwei bis fünf Tage, bei Neugeborenen zehn bis 14 Tage; durch diese verlängerte Regenerationszeit wird die Vermehrung pathogener Mikroorganismen in diesen Zellen und

somit die Ausbildung von Darmerkrankungen begünstigt (Liebich, 1999a). Des Weiteren haben die Lieberkühnschen Krypten sekretorische Aufgaben (parasymphatisch angeregt), wobei Chlorid-Ionen im Cotransport mit Natrium und Kalium basolateral in die Zelle aufgenommen und über einen Chloridkanal in der apikalen Membran in das Darmlumen abgegeben werden; der $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransport wird dabei von der ebenfalls basolateral befindlichen Na^+/K^+ -ATPase energetisiert, Na^+ , K^+ und Wasser folgen parazellulär aus Elektroneutralitäts- bzw. osmotischen Gründen (Scharrer und Wolfram, 2000). Die Cl^- -Sekretion wird vor allem im Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme auch über 'second messenger' mit dem Ziel verstärkt, die *Ingesta* zu verflüssigen und so eine bessere Verdauung und Absorption der Nährstoffe zu erreichen (Scharrer und Wolfram, 2000). Eine pathologische Verstärkung der Chloridsekretion wird durch Toxine bakterieller Durchfallerreger hervorgerufen, die ebenfalls über eine Aktivierung von 'second messenger'-Systemen Chlorid-Kanäle öffnen (Scharrer und Wolfram, 2000).

2.1.4 Die Verdauung

Nachfolgend wird lediglich kurz auf die Verdauungsmechanismen eingegangen.

2.1.4.1 Die Kohlenhydrat-Verdauung

Die Nahrungskohlenhydrate, mit Ausnahme von Zellulose und Hemizellulose, werden im Magen-Darm-Trakt zu Monosacchariden (Glucose, Fruktose, Galaktose) verdaut, bevor sie entweder aktiv oder über erleichterte Diffusion absorbiert werden (Shen und Liechty, 2003).

2.1.4.2 Die Fett-Verdauung

Die Fettverdauung kann grundsätzlich in fünf Phasen eingeteilt werden: Emulsion, Hydrolyse, Mizellenformation, Absorption und intrazelluläre Chylomikronenbildung (Shen und Liechty, 2003). Triglyzeride werden durch die gastrale bzw. linguale Lipase sowie durch die Lipase des Pankreas in Monoglyzeride und Fettsäuren zerlegt, welche mit konjugierter Gallensäure Mizellen von ca. drei bis fünf Nanometer Durchmesser bilden; diese können *per diffusionem* durch die apikale Membran in das Zottenepithel gelangen (Scharrer und Wolfram, 2000). Im Zytoplasma erfolgt erneut die Bildung von Triglyzeriden und deren Umhüllung mit Lipoproteinmolekülen; es entstehen so genannte Chylomikronen, die im Golgi-Apparat mit einer weiteren Membran umhüllt und basolateral vor allem in Lymphkapillare abgegeben werden (Scharrer und Wolfram, 2000).

2.1.4.3 Die Protein-Verdauung

Proteine müssen, bevor sie absorbiert werden können, zunächst mit Hilfe von pankreatischen Proteasen und Peptidasen der Bürstensaummembran des Darmes zu freien Aminosäuren hydrolysiert werden, obwohl unter bestimmten Bedingungen auch intakte

Proteine absorbiert werden können (Shen und Liechty, 2003). In der Bürstensaummembran gelegene separate Na⁺-Cotransportsysteme sind an der Aufnahme neutraler Aminosäuren (wie Alanin, Serin, Cystein, Leucin), saurer Aminosäuren (Glutaminsäure, Asparaginsäure), basischer Aminosäuren (Lysin, Arginin, Cystin), Iminosäuren (Prolin) sowie β-Aminosäuren (β-Alanin, Taurin) beteiligt; für basische Aminosäuren werden auch Natrium-unabhängige Carrier beschrieben (Scharrer und Wolffram, 2000).

Auf die Transporter wird detaillierter in Kapitel 2.7. eingegangen. Für die Resorption von Mineralstoffen und Spurenelementen wird auf die Spezialliteratur verwiesen.

2.1.5 Die Keimflora des Verdauungstraktes

Der Verdauungstrakt von Ferkeln ist während der fetalen Phase steril (Fan, 2003). Mit der Geburt beginnt die bakterielle Besiedlung, wobei die Bakterien dem Geburtskanal, der Muttermilch, den maternalen Fäzes sowie der Umgebung entstammen (Mackie et al., 1999). Es dauert allerdings mehrere Wochen, bis sich eine vollständige Keimflora etabliert hat (Stavric und Kornegay, 1995). Die mikrobielle Besiedlung kann dabei sowohl einen positiven als auch nachteiligen Effekt für den Wirt haben (Fan, 2003). Die kommensale Flora des Darmes begünstigt indirekt den Wirt, in dem die Entwicklung der Abwehr stimuliert wird (Gaskins, 2001). An diesem Prozess sind laut Gaskins (2001) weiterhin auch die der Darmschleimhaut anhaftende Mucusschicht des Darmes (eine locker anhaftende und eine fest anhaftende Mucusschicht (Atuma et al., 2001)), der epitheliale Monolayer sowie die darunter liegende *Lamina propria*, in welcher verschiedene Immunzelltypen zu finden sind, beteiligt. Darüber hinaus tragen die Mikroorganismen des Darmes zur Verdauung durch Fermentation von Kohlenhydraten bei und sind ebenfalls an der Hydrierung ungesättigter Fettsäuren sowie am enteralen Cholesterin- und Gallensäurenmetabolismus beteiligt (Fan, 2003). Des Weiteren sind sie in der Lage, essentielle Aminosäuren zu synthetisieren und zur Proteinernährung des Wirtes über die Nutzung von Ammoniak und Harnstoff beizutragen (Fuller und Reeds, 1998).

Bezüglich der Keimflora des Intestinaltraktes unterscheidet man grundsätzlich autochthone sowie allochthone Mikroorganismen; der Unterschied zwischen diesen beiden besteht darin, dass die autochthonen Mikroorganismen (an Ort und Stelle bzw. ohne äußere Einwirkung entstanden (Pschyrembel, 1998)) das Habitat als heimisch besiedeln und dort immer vorhanden sind, wohingegen allochthone Keime (transiente Mikroorganismen) gemäß Fuchs und Schlegel (2006) nur unter bestimmten Bedingungen und auch dann nur vorübergehend vorkommen (Krüger und Seidler, 2006). Mackie et al. (1999) unterscheiden mindestens vier Mikrohabitate: (a) das Darmlumen, (b) die anhaftende Mucusschicht oder Gel, welches das

Epithel des gesamten Darmtraktes bedeckt, (c) die tiefe Mucusschicht der intestinalen Krypten sowie (d) die Oberfläche der epithelialen Zellen.

Die luminale Flora übt ihren Verdrängungsmechanismus gegenüber pathogenen Keimen unter anderem durch Produktion toxischer Metabolite, wie flüchtiger Fettsäuren und Gallensäure, aus, die die Vermehrung pathogener Bakterien unterdrücken; des Weiteren kommt es zusätzlich zu einer Nährstoffkonkurrenz zwischen den natürlich vorkommenden und den pathogenen Mikroorganismen (Hentges, 1992). Darüber hinaus verhindert die an der Mucosoberfläche befindliche natürliche Flora unter physiologischen Bedingungen mittels kompetitiver Hemmung eine Besiedelung durch pathogene Mikroorganismen, da sie die Bindestellen besetzt und so die Anheftung verhindert (Hentges, 1992).

Zu beachten ist, dass die autochthone Keimflora auch pathogene Mikroorganismen beinhaltet, die jedoch nur dann ein Problem darstellen, wenn das physiologische Gleichgewicht unter bestimmten Stressbedingungen, wie zum Beispiel beim Absetzen oder einer Futterumstellung, zu Gunsten der pathogenen Keime verändert wird (Mackie et al., 1999; Raibaud, 1992).

Betrachtet man laut Mackie (1999) den Gehalt an Bakterien, bei denen es sich zu mehr als 99 % um Anaerobier handelt, weist der Magen sowie der proximale Teil des Dünndarmes 10^3 bis 10^5 Bakterien pro Gramm Inhalt auf; dies ist auf den niedrigen pH-Wert sowie die kurze Verweildauer der *Digesta* in dieser Region zurückzuführen. Der distale Abschnitt des Dünndarmes (*Ileum*) beherbergt mit 10^8 Bakterien pro Gramm *Digesta* bereits wesentlich mehr Mikroorganismen (Mackie et al., 1999). Der Dickdarm stellt aufgrund des langsameren Umsatzes den Hauptkolonisationsort dar und weist 10^{10} bis 10^{11} Bakterien pro Gramm Darminhalt auf (Mackie et al., 1999).

Von den verschiedenen Arten anaerober Keime, die sich normalerweise im Verdauungstrakt von Monogastriern befinden, lassen sich die Wichtigsten in drei verschiedene Gruppen unterteilen:

Tabelle 1: Zusammensetzung der Darmflora (Stavric und Kornegay, 1995)

Einteilung der Darmflora	Anteil an der Gesamtf flora in Prozent	Vorkommende Keime
Hauptflora	> 90 %	vor allem obligate Anaerobier wie Bifidobakterien, Laktobazillen und <i>Bacteriaceae</i>
Begleitflora	< 1 %	fakultative Anaerobier, vor allem <i>Escherichia coli</i> und Enterokokken
Restflora	< 0,01 %	<i>Clostridium</i> , <i>Proteus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> und Hefen der Gattung <i>Candida</i> sowie weitere pathogene und apathogene Spezies anderer Bakterien

Sowohl die normalen Mikrofloren verschiedener Tierarten als auch die verschiedenen Abschnitte des Darmtraktes eines Tieres unterscheiden sich hinsichtlich der mikrobiellen Zusammensetzung voneinander (Stavric und Kornegay, 1995).

2.1.6 Schutzfunktionen des Darmepithels

Neben der digestiven Aufschließung und der Absorption von Nahrungsbestandteilen fungiert das Darmepithel als Schutzbarriere gegen das Eindringen pathogener Antigene, die aus dem Futter oder von Mikroorganismen entstammen können (Isolauri et al., 2001). Diese Schutzmechanismen können in immunologisch und nicht-immunologisch bedingte Schutzmechanismen unterteilt werden.

2.1.6.1 Das darmeigene Immunsystem

Quantitativ betrachtet stellt das enterale Epithel das größte lymphatische System des Körpers dar (Liebich, 1999a). Die Immunfunktionen der Enterozyten beinhalten Interaktionen mit Umweltfaktoren, enzymatische Aufschließung von Nahrungsantigenen, Expression adhäsiver Moleküle, Expression von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen, Antigenpräsentation an Lymphozyten, Produktion von Zytokinen, Teilnahme an Zytokin-Netto-Reaktionen, Transport von sekretorischen Immunglobulinen (sIg) sowie von Immunkomplexen mit sekretorischem IgA (sIgA) (Herich und Levkut, 2002). Unter MHC-Molekülen bzw. MHC-Antigenen versteht man membrangebundene Glykoproteine, die eine wichtige Bedeutung bei der immunologischen Erkennung besitzen und in unterschiedlichen Mengen auf Körper- und Blutzellen vorkommen (Schliesser, 1990).

Als Konsequenz der ständigen Auseinandersetzung mit immunstimulierenden Faktoren beinhaltet das Darmepithel in großer Anzahl lymphoretikuläres Gewebe (GALT = 'Gut associated lymphoid tissue'), bestehend aus Plasmazellen (diese bilden vor allem IgA, darüber hinaus auch IgM und seltener IgG), T- und B-Lymphozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen sowie eosinophile und neutrophile Granulozyten (Liebich, 1999a). Die

sekretorischen IgA-Antikörper des Darmes sind ebenfalls in den Epithelien von Respirationstrakt, Tränen-, Speichel- und Brustdrüsen zu finden (Isolauri et al., 2001). Damit beeinflusst eine Immunantwort des GALT auch die Immunantwort der anderen Epithelien und *vice versa* (Fuller, 1997). Bezüglich IgA haben Macpherson et al. (2000) in Versuchen festgestellt, dass ein Großteil des intestinalen IgA, das gegen Zellwandantigene und Proteine kommensaler Bakterien gerichtet war, als Antwort auf die vorhandene Mikroflora spezifisch induziert wurde, aber eine Unabhängigkeit von T-Zellen oder von Keimzentren bestand. Vielmehr entstammte dieses IgA von B-Lymphozyten der Bauchhöhle, die diffus in die *Lamina propria* eingewandert waren (Macpherson et al., 2000).

Für adulte Schweine stellt der Darm eine wichtige Immunglobulin-Quelle dar; man vermutet, dass 80 % der gesamten Immunglobulin-bildenden Zellen - zu denen epitheliale Lymphozyten sowie Lymphozyten der Peyer'schen Platten, der *Lamina propria* und der Mesenteriallymphknoten zählen - sich im Darm befinden (Shanahan, 1994; Stokes et al., 2001). Diese Lymphozyten schützen den Wirt über von B-Lymphozyten sezerniertes IgA sowie über die Sekretion inflammatorischer Zytokine durch T-Lymphozyten (Gaskins und Kelley, 1995).

2.1.6.2 Nicht-immunologische Darmabwehr

Neben der immunologischen Abwehr existieren laut Fan (2003) im Magen-Darm-Trakt vier nicht-immunologische Verteidigungsmechanismen. Dazu zählen das Prolin-reiche Glykoprotein im Speichel (hohe Affinität zu Nahrungstanninen, die unter anderem auch in Ferkelfutter enthalten sind), der saure pH des Magens (bei Absatzferkeln nicht vollständig ausgebildet), das antioxidativ-wirkende Glutathion (schützt vor toxischen sowie peroxidativen Schädigungen) und die Mucuschicht auf der luminalen Oberfläche der Magen-Darm-Wand (Fan, 2003; Isolauri et al., 2001). Der von den Becherzellen produzierte *Mucus* bildet eine dicke Schutzschicht über dem Epithel aus, in welchem Partikel, Bakterien und Viren eingeschlossen und durch die Peristaltik aus dem Darm entfernt werden, wodurch verhindert wird, dass potentiell pathogene Bakterien Zugang zum Darmepithel erlangen können (Mayer, 2003). Bei adulten Schweinen hat man darüber hinaus noch antisekretorische und/oder absorptionsunterstützende Substanzen entdeckt, zu denen Somatostatin, Neuropeptid Y, Polypeptid Y, Opiate sowie die so genannten Antisekretorischen Faktoren (ASFs; es handelt sich hierbei um ein regulatorisches Protein, dessen Bildung in der Hypophyse erfolgt) zählen, welche als Antwort auf einen Enterotoxinreiz von älteren Schweinen gebildet werden und eine Enterotoxin-induzierte Sekretion verhindern können (McEwan et al., 1990). Darüber hinaus übernehmen Peptide der Trefoil Factor Familie eine wichtige Rolle in der Oberflächenintegrität von Epithelien (Hoffmann, 2009). Des Weiteren zählen zur nicht-

immunologischen Abwehr proteolytische Enzyme des Magens (Pepsin, Papain) und des Dünndarms (Trypsin, Chymotrypsin, pankreatische Proteasen), welche Polypeptide in Di- und Tripeptide spalten und dadurch neben der Verdauung und der Aufnahme von Nährstoffen die Umwandlung potentiell immunogener Proteine in nicht-immunogene Proteine ermöglichen (Mayer, 2003).

Zu der nicht-immunologischen Barrierefähigkeit zählen des Weiteren interzelluläre Verbindungen sowie die unterschiedlich ausgeprägten Permeabilitäten von Epithelien. Bezüglich der Zell-Zell-Verbindungen, durch welche Zellverbände zustande kommen, unterscheidet man direkte Kontakte mittels Desmosomen, *Zonula occludens* (Tight junction) oder Nexus (Gap junction) von indirekten Kontakten durch Verzahnungen (Interdigitationen) sowie durch die Interzellulärschicht (Liebich, 1999b). Bei den durch die meist apikal gelegenen Tight junctions vermittelten Zell-Zell-Verbindungen verschwindet der interzelluläre Spaltraum durch Verschmelzen der Oberflächenmembranen vollständig und fungiert als passive Diffusionsbarriere (Liebich, 1999b; Powell, 1981). Zusammen mit der Zellmembran ermöglichen Tight junctions das Entstehen von osmotischen Gradienten zwischen dem Lumen und dem Interstitium und stellen die bedeutendste interzelluläre Barriere in allen Epithelien, mit Ausnahme des mehrschichtigen Plattenepithels, dar (Powell, 1981). Die indirekten Kontakte zwischen benachbarten Zellen dienen neben der mechanischen Stabilität von Geweben vor allem dem Stofftransport zwischen den Zellen, wobei besonders in resorptionsaktiven Deckzellen (z.B. Dünndarm, Gallenblase) die Interzellulärräume, durch den aktiven Transport von Wasser und Natrium bedingt, eine Erweiterung aufweisen (Liebich, 1999b; Powell, 1981).

Auf die Permeabilitäten von Geweben sowie die Transportmöglichkeiten gelöster Stoffe wurde zum Teil bereits in den Kapiteln *2.1.1 Anatomische und histologische Grundlagen* sowie *2.1.2 Einteilung der Epithelien* eingegangen. Für die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wichtigen Transportmechanismen wird auf das Kapitel 2.7 verwiesen.

2.1.6.3 Die Entwicklung des darmeigenen Immunsystems beim Schwein

Ferkel werden mit nur einer gering ausgebildeten Immunität geboren, da die mütterliche Plazenta (epithelio-choriale Plazentaform) den Übertritt maternaler Antikörper nicht erlaubt (Gaskins und Kelley, 1995). *Post partum* erhalten die neugeborenen Ferkel eine passive systemische Immunität durch das im Kolostrum befindliche IgG und während der weiteren Säugezeit eine passive lokale Immunität durch das in der Muttermilch enthaltene IgA (Gaskins und Kelley, 1995).

Bailey et al. (2001) teilen die Entwicklung des Immunsystems des Darmes beim Schwein grob in vier verschiedene Stadien ein:

1. Das neugeborene Schwein:

Die Follikel der Peyer'schen Platten sowie die T-Zell-Areale sind nur rudimentär vorhanden. In den Darmzotten befinden sich fast keine T-Zellen.

2. Die ersten zwei Lebenswochen:

Follikel und T-Zell-Areale der Peyer'schen Platten dehnen sich schnell aus. Mit zwölf Tagen entspricht die Organisation annähernd der eines adulten Tieres. Einige konventionelle T-Zellen treten in die Dünndarmzotten ein, aber die vorherrschende Zelle exprimiert CD2 (CD2 gehört der Immunglobulinsuperfamilie an und ist ein T-Lymphozyten-Zell-Adhäsionsmolekül (CAM); es vermittelt transiente Adhäsionen von T-Zellen an Antigen-präsentierende Zellen und Targetzellen (Zielzellen verschiedener Gewebe, die durch aktivierte immunkompetente Zellen zerstört werden (Pschyrembel, 1998; van der Merwe et al., 1994)) in Abwesenheit von CD4 oder CD8. Dabei stellt CD2 ein Adhäsionsmolekül dar, dass auf fast allen T- und NK-Zellen exprimiert ist (Merz et al., 1997). Die bedeutendsten T-Zell-Subpopulationen stellen jedoch CD4 und CD8 dar, wobei CD4 auf zytotoxischen T-Zellen (auch T-Helfer-Zellen genannt) und CD8 auf NK-Zellen und den so genannten T-Suppressor-Zellen vorkommt (Merz et al., 1997). Derzeit ist die Natur dieser Zelle noch unklar. Die Expression eines Antigens der MHC-Klasse-II in den Dünndarmzotten nimmt während dieser Zeit zu.

3. Zweite bis dritte Lebenswoche:

CD4⁺-T-Zellen wandern in das Darmepithel ein und besetzen den Zottenkern wie bei einem vollständig ausgebildeten Darm (Bailey et al., 2001). Eine geringe Anzahl an IgM-sezierenden B-Zellen erscheint im Epithel des Dünndarmes (Fan, 2003).

4. Ab der vierten Lebenswoche:

CD8⁺-T-Zellen wandern in das Epithel sowie in die *Lamina propria* der Darmzotten ein. Die normale Architektur des Darmepithels, die der von adulten Tieren entspricht, ist im Alter von etwa sechs Lebenswochen erreicht, wobei die absoluten Zellzahlen weiterhin zunehmen (Bailey et al., 2001). Viele IgA-sezierende B-Zellen erscheinen in den Krypten (Fan, 2003).

Wurden die Ferkel unter keimfreien Bedingungen gehalten, konnten diese Entwicklungen nur zum Teil beobachtet werden, so dass man davon ausgehen kann, dass die Auseinandersetzung mit mikrobiellen Antigenen einen wichtigen Antrieb für die Reifung des Immunsystems, besonders der Zellproduktion in den Peyer'schen Platten, darstellt (Barman et al., 1997).

2.1.6.4 Induktion der intestinalen Immunantwort

Die Darmbarriere schützt den Organismus, verhindert aber auch die Aufnahme von Umweltantigenen, die für eine erfolgreiche orale Vakzination und Immunisierung benötigt werden (Madara, 1997).

Kommt es im Organismus zu einer Infektion mit pathogenen Erregern, so werden Signale für proinflammatorische Reaktionen über verschiedene Rezeptoren, unter anderem über die Toll-like Rezeptoren (TLRs), vermittelt, die jedoch „physiologisch“ erfolgen muss, da bei einer Unterfunktion eine unzureichende Erregerabwehr vorliegt, eine Überfunktion hingegen zu durch chronische Entzündungen gekennzeichneten Krankheiten, wie Autoimmun- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen führen kann (O’Neill, 2005). Die TLRs befinden sich auf einer Vielzahl von Zellen (z.B. Makrophagen, Dendritische Zellen), die der angeborenen Immunabwehr angehören und spielen bei adaptiven Reaktionen eine entscheidende Rolle (O’Neill, 2005). Bislang wurden 13 TLRs beim Menschen beschrieben, wobei je nach Rezeptor Bakterien, Viren, Pilze und/oder Parasiten erkannt werden können (den Dekker et al., 2009; O’Neill, 2005; Ospelt und Gay, 2009). Dringen pathogene Erreger in den Körper ein, so werden bestimmte Strukturen dieses Erregers von mindestens einem Toll-like Rezeptor erkannt und die Zelle zur Abgabe bestimmter Zytokine veranlasst; zusätzliche Makrophagen, Dendritische Zellen sowie weitere Immunzellen werden rekrutiert, um so den Erreger zu eliminieren (O’Neill, 2005).

Barman et al. (1997) beschreiben die einzelnen jejunalen Peyer’schen Platten als Ort der ‘Antigen-Abtastung’ und Induktion der intestinalen Immunantwort, der lebenslang erhalten bleibt. Das Schwein verfügt über etwa 30 einzelne Peyer’sche Platten, die im *Jejunum* und proximalen *Ileum* lokalisiert sind, eine durchgehende längliche Platte befindet sich im terminalen *Ileum* und etwa zehn unregelmäßige und spiralförmige Peyer’sche Platten sind im *Colon* vorhanden (Gaskins und Kelley, 1995). An deren Basis liegen sowohl B- und T-Lymphozyten als auch IgA-positive Plasmazellen, die die Darmmukosa zur so genannten Marginalzone oder Domregion vorwölben (Feller, 1997). Das die Peyer’schen Platten bedeckende Epithel beinhaltet so genannte M-Zellen (= „microfolial cells“ oder „membranous cells“; spezialisierte Zellen in der Follikel-assoziierten Epithelzellschicht der Peyer’schen Platten), die in der Lage sind, luminale Antigene zu dem immunkompetenten Gewebe zu transportieren (Feller, 1997; Rescigno et al., 2001).

Von Rescigno et al. (2001) werden die in den Peyer’schen Platten lokalisierten Dendritischen Zellen (= Antigen-präsentierende Zellen) mit typischen Eigenschaften unreifer Zellen beschrieben, die sich als dichte Zellschicht der subepithelialen Domregion direkt unter dem Follikelepithel befinden. Des Weiteren wurden sie in der *Lamina propria* des Darmes beschrieben (Rescigno et al., 2001). Rescigno et al. (2001) fanden heraus, dass

Dendritische Zellen nicht nur Tight junction-Proteine synthetisieren, sondern auch die Tight junctions zwischen den Zellen öffnen können, um so Mikroorganismen direkt aufzunehmen, ohne die Integrität des Epithels oder den transepithelialen elektrischen Widerstand (=TEER) zu beeinflussen. Die Dendritischen Zellen werden dabei nach bakteriellen Infektionen zu den betroffenen Bezirken rekrutiert, ein Prozess, der vermutlich durch das von Epithelzellen sezernierte Zytokin MIP-3 α (Macrophage Inflammatory Protein 3 α) ausgelöst wird (Rescigno et al., 2001). Durch Aufregulation von ZO-1 (Zonula Occludens-1; zytoplasmatisches Protein, das zusammen mit E-Cadherin eine wichtige Rolle in der Entstehung und Lokalisierung von Tight Junctions spielt), getriggert z.B. durch LPS, und Modulation des Occludins erfolgt laut Rescigno et al. (2001) eine Reorganisation der TJ-Proteine. Die Dendritischen Zellen lösen sich von den TJ und transportieren die aufgenommenen pathogenen und apathogenen Bakterien zu den regionalen Lymphknoten sowie zur Milz und können so eine systemische Immunantwort auslösen (Rescigno et al., 2001). Neutrophile Granulozyten sind ebenfalls in der Lage über das Epithel zu wandern, ohne den transepithelialen Widerstand zu beeinflussen (Rescigno et al., 2001).

2.2 Die Phase des Absetzens

Das Absetzen, welches gewöhnlich im Alter von drei oder vier Wochen durchgeführt wird, bedeutet für die Ferkel eine erhebliche Belastung. Die Trennung von der Mutter, der Verlust der Versorgung mit Immunglobulinen über die Sauenmilch, die Zusammenstellung neuer Gruppen sowie die Futterumstellung stellen dabei enorme Stressfaktoren dar (Kyriakis et al., 1999). Es kommt zu einer vorübergehenden Abnahme der Futteraufnahme, einer Veränderung in der Histologie und Biochemie des Dünndarmes, wie partielle Zottenatrophie, Hyperplasie der Krypten und verminderte Aktivität der meisten Verdauungsenzyme der Bürstensaummembran (David et al., 2002; McCracken et al., 1999; Spreeuwenberg et al., 2001). David et al. (2002) bestätigten in ihren Untersuchungen eine Veränderung der Zottenarchitektur sowie der Disaccharidasen- und Peptidasenaktivität, die bereits 12 Stunden nach dem Absetzen zu erkennen war und mindestens acht Tage, unter Umständen auch bis zu 35 bzw. 42 Tage anhielt. Boudry et al. (2004) fanden in ihren Untersuchungen an Ferkeln, die man die ersten zwei Tage nach dem Absetzen am 21. Lebenstag fasten ließ und anschließend mit einer konventionellen Diät bzw. einer Diät mit erhöhtem Weizenanteil über eine Sonde fütterte, neben einer Abnahme der Zottenlänge und Zunahme der Kryptentiefe, auch eine Zunahme der Na⁺-gekoppelten Glucoseabsorption (zwischen dem zweiten und fünften Tag nach dem Absetzen), welche jedoch nach dem fünften Tag wieder kontinuierlich abnahm und schließlich sogar unter die Werte vom Tag des Absetzens sank. Im proximalen *Jejunum* und *Colon* stieg der basale Kurzschlussstrom (I_{sc}) am zweiten Tag an, erreichte aber am 15. Tag bereits wieder die Werte wie vor dem

Absetzen (Boudry et al., 2004). Während im *Jejunum* der I_{sc} zunahm, sanken der transepitheliale Widerstand sowie die Permeabilität für Makromoleküle am zweiten Tag nach dem Absetzen, beide Parameter normalisierten sich jedoch wieder ab dem fünften Tag nach dem Absetzen (Boudry et al., 2004). Der verringerte Widerstand ließ Boudry et al. (2004) vermuten, dass es dadurch luminalen Antigenen ermöglicht wird, die Darmwand zu überwinden; darüber hinaus vermuteten sie aufgrund des erhöhten I_{sc} eine vermehrte sekretorische Aktivität, die in den nachfolgenden Darmabschnitten infolge der zu diesem Zeitpunkt geringen resorptiven Kapazitäten zu Durchfall führen kann. Diese Hypothese konnte in den Versuchen von Boudry et al. (2004) jedoch nicht bewiesen werden.

Die durch das Absetzen induzierte Belastung verursacht ferner eine Verschiebung der Zusammensetzung der Darmflora (Raibaud, 1992), wobei es zu einem Ungleichgewicht mit Verdrängung der physiologisch vorkommenden Flora zu Gunsten pathogener Mikroorganismen kommen kann; pathogenen Keimen wird dadurch die Besiedelung des Intestinaltraktes ermöglicht (Kyriakis et al., 1999).

In der Summe verursachen diese Faktoren eine herabgesetzte Verdauungs- und Absorptionskapazität und begünstigen somit auch die Entstehung einer Diarrhøe (David et al., 2002).

Fan (2003) erklärt die mit dem Absetzen auftretende Zunahme an Durchfallerkrankungen damit, dass die Sauenmilch über hohe Mengen an IgA und Glutathion verfügt. IgA sorgt für eine passive Immunität, Glutathion hingegen ist ein wichtiges Antioxidans und für die Aufrechterhaltung der Epithelintegrität von wesentlicher Bedeutung – der Wegfall dieser beiden Protektoren erhöht somit die Anfälligkeit für Darminfektionen und Durchfallerkrankungen (Fan, 2003).

Ein weiterer Faktor, der einen negativen Einfluss auf die Epithelfunktionen hat, ist die Tatsache, dass das Absetzen mit einer Abnahme an Becherzellen einhergeht und somit die schützende Mucusschicht, die ebenfalls als Protektor gegenüber pathogenen Keimen verstanden wird, nur noch in geringerem Maße gebildet wird (Fan, 2003). Spreeuwenberg et al. (2001) fanden heraus, dass das Absetzen die aktive intestinale Immunität des Darmepithels stört, indem die mukosalen T-Zell-CD4- und T-Zell-CD8-Untereinheiten verändert werden und somit eine Entzündung des Darmepithels induziert wird, die wiederum eine parazelluläre Translokation pathogener Keime sowie deren Toxine ermöglicht.

Ein dritter Faktor, der die Entstehung von Durchfallerkrankungen im Rahmen des Absetzens fördert, ist die bereits erwähnte Verschiebung des Zotten-Krypten-Verhältnisses und damit des Verhältnisses zwischen Absorption durch die Zotten (wird vermindert) und Sekretion durch die Zellen der Krypten (Fan, 2003). McCracken et al. (1999) beschrieben ebenfalls einen Zusammenhang zwischen verminderter Futteraufnahme nach dem Absetzen und einer Veränderung der Epithelmorphologie des Darmes. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass

eine Aufregulierung von Matrix Metalloproteinasen (MMP; diese sind normalerweise am Umsatz der extrazellulären Matrix beteiligt) durch aktivierte Immunzellen in der *Lamina propria* zur Villusatrophie im Zusammenhang mit dem Absetzen beitragen könnte (McCracken et al., 1999). Des Weiteren fand man direkt nach dem Absetzen eine Reduktion in der MHC-Klasse-I-Expression, die eine Prädisposition für Darminfektionen, vor allem Virusinfekte, begünstigt, da eine MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression zur Präsentation viraler Peptide an inflammatorische T-Zellen benötigt wird (McCracken et al., 1999).

2.3 Antibiotika und Futtermittelzusatzstoffe

Gemäß der „Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung“ (nachfolgend abgekürzt als VO (EG) Nr. 1831/2003) werden Antibiotika definiert als „antimikrobielle Stoffe, die durch einen Mikroorganismus erzeugt bzw. aus diesem gewonnen werden und andere Mikroorganismen zerstören bzw. deren Wachstum hemmen“.

In der Tiermedizin werden Antibiotika sowohl zur Therapie vorliegender Erkrankungen als auch als Leistungsförderer eingesetzt. Dabei versteht man unter Leistungsförderern „Futtermittelzusatzstoffe, die Futtermitteln zugemischt oder auf andere Weise beigefügt werden und die Körperfunktionen im Sinne einer Leistungsförderung bzw. Nährstoffeinsparung beeinflussen. Die Einmischung erfolgt in Form von Vormischungen mit Trägerstoffen; durch Verschiebung der Mikroflora im Darm erfolgt die verbesserte Ausnutzung der Futtermittel“ (Wiesner und Ribbeck, 2000).

Als Futtermittelzusatzstoffe werden gemäß VO (EG) Nr. 1831/2003 „Stoffe, Mikroorganismen oder Zubereitungen“ definiert, „die keine Futtermittel-Ausgangserzeugnisse oder Vormischungen sind und bewusst Futtermitteln oder Wasser zugesetzt werden, um insbesondere eine oder mehrere der in Artikel 5 Absatz 3 genannten Funktionen zu erfüllen“. Dazu heißt es unter anderem in Artikel 5 Absatz 3 f) der oben genannten Verordnung: „Der Futtermittelzusatzstoff muss die Tierproduktion, die Leistung oder das Wohlbefinden der Tiere, insbesondere durch Einwirkung auf die Magen- und Darmflora oder die Verdaulichkeit der Futtermittel, positiv beeinflussen [...]“.

Die Einteilung zugelassener Futtermittelzusatzstoffe erfolgt in fünf Kategorien (Tabelle 2):

Tabelle 2: Futtermittelzusatzstoff-Kategorien (Verordnung (EG) Nr. 1831/2003 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung)

Kategorie	Beschreibung/Beispiele
Kokzidiostatika und Histomonostatika	Zusatzstoffe zur Verhütung von Geflügelkrankheiten
Technologische Zusatzstoffe	Konservierungsmittel; Antioxidationsmittel; Emulgatoren; Stabilisatoren; Verdickungsmittel; Geliermittel; Bindemittel; Stoffe zur Beherrschung einer Kontamination mit Radionukliden; Trennmittel; Säureregulatoren; Silierzusatzstoffe; Vergällungsmittel
Zootechnische Zusatzstoffe	Verdaulichkeitsförderer; Darmflorastabilisatoren (Mikroorganismen oder andere chemisch definierte Stoffe, die bei der Supplementierung an Tiere eine positive Wirkung auf die Darmflora haben); Stoffe, die die Umwelt günstig beeinflussen; sonstige zootechnische Zusatzstoffe
Sensorische Zusatzstoffe	z.B. Aromen, Farbstoffe
Ernährungsphysiologische Zusatzstoffe	Vitamine, Provitamine und chemisch definierte Stoffe mit ähnlicher Wirkung; Verbindungen von Spurenelementen; Aminosäuren, deren Salze und Analoge; Harnstoff und seine Derivate

Die Zulassung eines Futtermittelzusatzstoffes unterliegt einem strengen Regelwerk, welches von der Europäischen Union (EU) für alle EU-Mitglieder verbindlich vorgegeben ist (VO (EG) Nr. 1831/2003). Zweck ist vor allem die Gewährleistung eines freien Verkehres mit sicheren und gesunden Lebens- und Futtermitteln sowie der Schutz der Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt (VO (EG) Nr. 1831/2003). Die Zulassung neuer Futtermittelzusatzstoffe wird auf zehn Jahre beschränkt, darüber hinaus muss durch die Herstellerunternehmen der Nachweis einer positiven Wirkung auf das Tier (Wirksamkeit) sowie das Nichtvorhandensein von Risiken für die Gesundheit von Mensch, Tier und Umwelt (Sicherheit) erbracht werden; für die nach alten Vorschriften zugelassenen Zusatzstoffe haben die Hersteller innerhalb von sieben Jahren nach Inkrafttreten der oben genannten Verordnung bzw. ein Jahr vor Ablauf der Zulassung ein Antrag auf Neubewertung und Neuzulassung zu stellen (offizielle Webseite der EFSA, www.efsa.europa.eu/de). Die Beurteilung aller Futtermittelzusatzstoffe obliegt der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), sie erarbeitet klare Leitlinien und transparente Bewertungsverfahren mit öffentlicher Konsultation der betroffenen Parteien; sie ist für die wissenschaftliche Einschätzung der Futtermittelzusatzstoffe verantwortlich (offizielle Website EFSA, www.efsa.europa.eu/de).

Ab 01. Januar 2006 ist der Einsatz von Antibiotika als Leistungs- bzw. Wachstumsförderer EU-weit verboten. Es stellt sich daher die Frage, ob die als Leistungsförderer eingesetzten Antibiotika durch Alternativen, wie z.B. probiotische Keime, ersetzt werden könnten. Welche Vorteile Probiotika bieten, welche Mikroorganismen grundsätzlich in Frage kommen, sowie deren mögliche Wirkungsmechanismen werden im nachfolgenden Kapitel erläutert.

2.4 Probiotika: Alternative Leistungsförderer?

2.4.1 Definition und Einordnung

Unter einem Probiotikum wird laut Fuller (1989) ein lebender mikrobieller Futterzusatzstoff verstanden, der das Wirtstier durch Verbesserung des Gleichgewichtes der Darmflora positiv beeinflusst. Ein Expertenkomitee erweiterte diese Definition und beschrieb Probiotika als „lebende Mikroorganismen, die, nach Verzehr einer bestimmten Menge, über ihren generellen Nährwert hinaus einen positiven Effekt auf die Gesundheit besitzen“ (Ouwehand et al., 2002). 2004 erweiterte Fuller erneut die oben genannte Definition um die bis dahin erlangten Informationen über Probiotika und definierte diese als lebende Mikroorganismen, die von Menschen oder Tieren mit dem Ziel aufgenommen werden, über Beeinflussung der Darmflora in qualitativer oder quantitativer Hinsicht und/oder Modifizierung des Immunstatus der Konsumenten einen positiven Effekt auszulösen (Fuller, 2004). Japanische Wissenschaftler haben gezeigt, dass auch inaktivierte probiotische Keime oder bereits deren Zellstruktur einen positiven Effekt auf die menschliche Gesundheit ausüben (Ouwehand et al., 2002).

Viele der als Probiotika eingesetzten Keime entstammen dem Darm und zählen zu den Milchsäurebakterien (LAB), denen z.B. Laktobazillen, Bifidobakterien, Pediokokken, Leuconostoc, Enterokokken und Streptokokken angehören (Gibson et al., 1997; Jin et al., 2000; Lee et al., 1999). Darüber hinaus finden auch Hefen (z.B. *Saccharomyces boulardii*), Bakteriensporen (z.B. *Bacillus cereus*) und gramnegative Bakterien (z.B. *E. coli*-Stamm Nissle 1917) als Probiotikum Verwendung (Görke und Liebler-Tenorio, 2001; Simon et al., 2003). Man geht davon aus, dass die Einnahme von 10^8 bis 10^9 koloniebildenden Einheiten (CFU) pro Kilogramm Futtermittel notwendig ist (Simon et al., 2003), für den Menschen wird eine Mindestmenge von 10^9 CFU pro Tag empfohlen (Ouwehand et al., 2002).

Von der Europäischen Union sind derzeit nachfolgende Mikroorganismen als Futtermittelzusatzstoffe zugelassen (Tabelle 3):

Tabelle 3: Von der Europäischen Union als Futtermittelzusatzstoffe zugelassene Mikroorganismen (http://www.bvl.bund.de) Stand: 26. März 2013

Nr. oder EG-Nr.	Zusatzstoff	Tierart oder Tierkategorie
E 1700	<i>Bacillus (B.) licheniformis</i> DSM 5749 <i>B. subtilis</i> DSM 5750 [im Verhältnis 1:1]	Ferkel, Sauen, Mastschweine, Masttruthühner, Kälber
E 1702	<i>Saccharomyces (S.) cerevisiae</i> NCYC Sc 47	Mastrinder, Sauen, Ferkel (abgesetzt), Mastkaninchen, Milchkühe
E 1703	<i>S. cerevisiae</i> CNCM I-1079	Ferkel, Sauen
E 1704	<i>S. cerevisiae</i> CBS 493.94	Kälber, Mastrinder, Milchkühe
E 1705	<i>Enterococcus (E.) faecium</i> NCIMB 10415	Kälber, Mastschweine, Sauen, Ferkel, Hunde, Katzen
E 1706	<i>E. faecium</i> DSM 7134 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> DSM 7133	Kälber, Ferkel (abgesetzt)
E 1707	<i>E. faecium</i> DSM 10663/NCIMB 10415	Masthühner, Kälber, Ferkel, Masttruthühner, Hunde
E 1708	<i>E. faecium</i> NCIMB 11181	Kälber, Ferkel
E 1709	<i>E. faecium</i> ATCC 53519 <i>E. faecium</i> ATCC 55593 [im Verhältnis 1:1]	Masthühner
E 1710	<i>S. cerevisiae</i> MUCL 39 885	Mastrinder
E 1711	<i>S. cerevisiae</i> CNCM I-1077	Milchkühe, Mastrinder
E 1712	<i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM MA 18/5 M	Masthühner, Mastschweine
E 1713	<i>E. faecium</i> CECT 4515	Ferkel (abgesetzt)
E 1714	<i>Lactobacillus (L.) farciminis</i> CNCM MA 67/4R	Ferkel (abgesetzt)
E 1715	<i>L. acidophilus</i> D2/CSL CECT 4529	Legehennen
12	<i>L. farciminis</i> CNCM MA 67/4R	Masthühner, Masttruthühner, Legehennen
15	<i>E. faecium</i> NCIMB 11181	Masthühner
22	<i>E. faecium</i> DSM 7134	Masthühner
25	<i>L. acidophilus</i> DSM 13241	Hunde, Katzen

2.4.2 Anforderungen an probiotische Keime

Die Europäische Union macht die Zulassung von Mikroorganismen als probiotische Futtermittelzusatzstoffe von verschiedenen Kriterien abhängig. Es muss gewährleistet sein, dass Probiotika keinen negativen Einfluss auf die Gesundheit von Wirt oder Personal haben, darüber hinaus muss eine Resistenzausbildung von Mikroorganismen gegenüber Antibiotika ausgeschlossen sein (Simon et al., 2003). Probiotische Bakterien dürfen weder eine Pathogenität noch Invasivität aufweisen (Simon et al., 2003). Des Weiteren muss sichergestellt sein, dass sie weder Toxine bilden noch Gene für Toxine oder die Fähigkeit besitzen, tierische Produkte zu kontaminieren (Simon et al., 2003).

Tabelle 4: Anforderungen an zuzulassende Probiotika (Fuller, 1992; Gibson et al., 1997; Laukova et al., 2004; Ouwehand et al., 2002; Tuomola et al., 2001)

Anforderungen an probiotische Mikroorganismen:
- Ausübung eines positiven Effektes auf die Gesundheit
- Beibehaltung der Lebensfähigkeit während der Herstellung und Lagerung
- Möglichkeit der Produktion großer Mengen
- erwiesene Resistenz gegenüber Magen-, Gallensäure und Pankreasenzymen
- Adhäsion an Darmepithelzellen (Wachstum ist nicht erforderlich); höhere Chance, die mikrobielle Balance sowie das Immunsystem des Wirtes zu beeinflussen
- keine Gefahr für den menschlichen Verzehr
- Produktion antimikrobieller Substanzen
- Hemmung pathogener Darmbakterien und/oder Verderbniserreger
- Immunogenität

Dass für den Menschen beim Einsatz probiotischer Kulturen keine Gefahr bestehen darf, stützt sich vorwiegend auf die von Alvarez-Olmos et al. (2001) beschriebenen Fälle von durch Laktobazillen ausgelöster Endokarditis oder Sepsis bei immunsupprimierten Personen sowie durch *Saccharomyces boulardii*-Gabe ausgelöste Fungämie (Lolis et al., 2008). Allerdings konnte dies nicht mit über Lebensmittel verabreichten Laktobazillen in Verbindung gebracht werden (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001) (Famularo et al., 1997). Laut Ohashi et al. (2004) tragen Probiotika dann besonders zur Gesundheit bei, wenn sie den Dün- und Dickdarm ohne Verlust der Lebensfähigkeit erreichen.

2.4.3 Kriterien zur Auswahl von Keimen als Probiotikum

Generell hängt die Wirksamkeit und Verwendbarkeit eines Keimes als Probiotikum von einer Vielzahl von Faktoren ab:

Tabelle 5: Kriterien für die Einsatzfähigkeit und Wirksamkeit von Probiotika (Fuller, 1997; Havenaar et al., 1992)

Kriterien
- Sicherheit
- Herkunft des Mikroorganismus
- Lagerung
- Kontaminationsgefahr
- Herstellungsmethode (Druck, Temperatur, Applikationsform)
- Häufigkeit der Applikationen/Dosis
- Überlebensfähigkeit des Keimes im Magen-Darm-Trakt, Adhäsion, Kolonisation
- Veränderungen in der Ration
- Alter und Wachstumsphase des Wirtstieres
- Haltungsbedingungen

Grundsätzlich muss vor dem Einsatz eines Probiotikums gewährleistet sein, dass dieser Mikroorganismus auch als sicher für Mensch und Tier gilt (Havenaar et al., 1992). Soll sich der probiotische Keim im Körper eines bestimmten Individuums ansiedeln, sollte er auch der gleichen Spezies und bestenfalls auch aus dem gleichen Körperabschnitt entstammen, in dem er eingesetzt werden soll (Fuller, 1997; Havenaar et al., 1992). Laut Havenaar et al. (1992) spielt ebenfalls die Lagerung der hergestellten Probiotika eine Rolle, da die Wirksamkeit unter ungünstigen Lagerungsbedingungen mit der Zeit nachlässt und eine Kontamination mit unerwünschten Mikroorganismen erfolgen könnte. Bei der Herstellung der je nach Applikationsform gewünschten Probiotika (z.B. Aerosole zur Inhalation; Tabletten, Kapseln oder fermentierte Milchprodukte oder Pulver zur Einmischung ins Futter) muss gewährleistet werden, dass die Lebensfähigkeit des Probiotikums erhalten bleibt (Fuller, 1997; Havenaar et al., 1992). Neben der Resistenz gegenüber Einflussfaktoren bei der Herstellung, ist es ebenso notwendig, dass das Probiotikum nicht durch Verdauungsenzyme oder andere Abwehrmechanismen des Wirtes abgetötet wird und die Fähigkeit besitzt, sich an die jeweilige Körperoberfläche anzulagern und das jeweilige Kompartiment zu kolonisieren (Havenaar et al., 1992). Gemäß Havenaar et al. (1992) gelten milchsäurebildende Bakterien als säuretolerant. Bezüglich der Veränderung in der Futterration muss zum einen darauf geachtet werden, dass das Probiotikum in der vollen notwendigen Dosierung verabreicht wird, zum anderen ist zu berücksichtigen, dass es

weitere Futterbestandteile geben kann, die mit dem Probiotikum kreuzreagieren und somit dessen Wirksamkeit herabsetzen können (Fuller, 1997). Laut Fuller (1997) spielen darüber hinaus das Alter beziehungsweise die Wachstumsphase des Tieres eine wichtige Rolle. So zeigte das gleiche Probiotikum bei Tieren unterschiedlichen Alters unterschiedliche Reaktionen (Fuller, 1997).

2.4.4 Verwendung von Probiotika in Human- und Tiermedizin sowie Nutztierhaltung

Nachfolgend werden bereits bestehende Einsatzbereiche von Probiotika sowie ihre Wirkungsmechanismen beschrieben. Es ist anzumerken, dass positive Effekte, die von einem probiotischen Stamm ausgehen, nicht auf alle Stämme dieses Keimes übertragen werden können (Pineiro und Stanton, 2007).

2.4.4.1 Einsatz in der Humanmedizin

In der Humanmedizin werden Probiotika nachweislich erfolgreich in den nachfolgend genannten Bereichen eingesetzt.

1. Allgemeine Wirkung:

- a) Einsatz bei Laktoseunverträglichkeit aufgrund besserer Toleranz gegenüber fermentierten Milchprodukten verglichen mit Milch; dies kann durch den Gehalt an β -Galactosidase in der fermentierten Milch erklärt werden (Ouwehand et al., 2002);
- b) Therapie (Verhinderung bzw. Verkürzung der Dauer) von Antibiotika-assoziierten Durchfällen (Hawrelak et al., 2005; Vanderhoof et al., 1999);
- c) Durch Probiotika lässt sich das Wiederauftreten von *Clostridium difficile*-assoziierten Durchfällen verhindern (Dendukuri et al., 2005);
- d) Der Einsatz fermentierter Milch mit *Lactobacillus rhamnosus* GG kann die Durchfalldauer bei Kindern mit Rotavirusinfektionen verkürzen und unter Umständen auch Gastroenteritiden anderer Genese verhindern (Marteau et al., 2001);
- e) Verbesserung von Infektionen des unteren Harntraktes und Unterstützung der Therapie von Harnblasenkrebs (Borchert et al., 2008);
- f) Linderung der Symptome bei IBS (Irritable Bowel Syndrome) (Shen und Nahas, 2009);
- g) Antihypertensive Effekte (Lye et al., 2009);
- h) Immunmodulation (Borchert et al., 2008).

2) Spezielle Wirkung:

- a) Erhöhung der Produktion kurzkettiger Fettsäuren (wie Essig-, Propion- und Buttersäure) im Dickdarm, dadurch Versorgung der Kolonepithelzellen mit Energie; gleichzeitig erfolgt eine pH-Wert-Absenkung (Sakata et al., 2003);

- b) Erhöhung der Natrium- und Wasseraufnahme im Dickdarm, selbst bei Durchfall; der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt (Sakata et al., 2003).

2.4.4.2 Einsatz in Tiermedizin und Nutztierhaltung

Durch die Erfolge des Probiotikaeinsatzes in der Humanmedizin sieht man auch in der Tiermedizin und Nutztierernährung positive Effekte in nachfolgenden Bereichen:

1) Allgemeine Wirkungen am Tier:

- a) Reduzierung bzw. Prävention von Durchfallerkrankungen, verbesserte Gesundheit (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001; Stavric und Kornegay, 1995);
- b) Zunahme der Wachstumsrate (Fuller, 1992; Kirchgessner et al., 1993);
- c) Verbesserte Futtermittelverwertung (Fuller, 1992);
- d) Anstieg der Milchproduktion bei Milchkühen (Fuller, 1992);
- e) Zunahme der Legeleistung bei Legehennen (Fuller, 1992);
- f) Reduzierung der Morbidität und Mortalität bei frisch abgesetzten Ferkeln, Erhöhung der Schlachtkörperqualität (Alexopoulos et al., 2004).

2) Spezielle Wirkung im Tier:

- a) Effekte auf Transportvorgänge des Dünndarmepithels, wie z.B. Stimulierung der Na⁺-abhängigen Glucoseabsorption (Breves et al., 2000), Reduktion der Prostaglandin-vermittelten Chloridsekretion im *Colon* oder Steigerung der Chloridabsorption im *Jejunum* (Winckler et al., 1998);
- b) Beeinflussung der Barrierefunktion des Darmepithels, wie Herabsetzung der Gewebeleitfähigkeit (G_i) durch eine Langzeitfütterung von *Saccharomyces boulardii* (Winckler et al., 1998);
- c) Zunahme von Enzymen der Bürstensaummembran (Laktase, α -Glukosidase und alkalische Phosphatase (Jahn et al., 1996);
- d) Zunahme der Zottenlänge im Dünndarm sowie Abnahme der Anzahl an Becherzellen im Dickdarm (Baum et al., 2002; Siggers et al., 2008);
- d) Steigerung der Immunantwort durch phagozytische Aktivität peritonealer Makrophagen sowie des retikuloendothelialen Systems gegenüber intrazellulären Bakterien sowie durch Erhöhung der IgA-Konzentrationen im Darm (Perdigon et al., 1991; Perdigon et al., 1986; Scharek et al., 2007);
- e) Verbesserung der Darmgesundheit bei Neonaten durch frühe Kolonisation mit wichtigen Mikroorganismen (Siggers et al., 2008);
- f) Bildung eines Biofilmes an der Darmwand des Wirtes und dadurch Hinderung pathogener Mikroorganismen am Zugang zum Darmepithel (Barbosa et al., 2005);

- g) Kompetitive Verdrängung pathogener Keime von epithelialen Rezeptoren des Darmepithels (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001; Collado et al., 2007; Rowland, 1992);
- h) Erhöhung des Gehaltes an positiv wirkenden Mikroorganismen im Dünndarm und Reduzierung potentiell pathogener Bakterien (Siggers et al., 2008);
- i) Produktion spezifischer Substanzen (Bakteriocine, Dipicolinsäure, bioaktive Peptide) (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001; Parente und Ricciardi, 1999);
- j) Nahrungskonkurrenz zwischen probiotischen und pathogenen Mikroorganismen (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001; Rowland, 1992; Simon et al., 2003);
- k) Veränderung des intestinalen Milieus, z.B. pH-Wert-Absenkung in der Mikroumgebung durch Bildung kurzkettiger Fettsäuren (Gillor et al., 2008);
- l) Modifizierung von Toxinrezeptoren, Blockierung toxinmediierter pathologischer Veränderungen (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001; Rowland, 1992).

2.4.5 Beeinflussung der Transportphysiologie im Dünndarm

Nachfolgend wird auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Transportmechanismen im Dünndarm eingegangen, die durch Supplementierung mit probiotischen Keimen beeinflusst werden können. Dabei ist von Interesse, ob absorptive Leistungen im Dünndarm, bezogen auf Glucose und L-Glutamin, positiv unterstützt sowie die Chloridsekretion verringert werden kann.

2.4.5.1 Probiotikawirkung auf die Absorptionsleistung des Dünndarms

Breves et al. (2000) wiesen in ihren Untersuchungen mit den Probiotika *Saccharomyces (S.) boulardii* und *Bacillus (B.) cereus* var. *toyoi* an Schweinen gesteigerte Na⁺-abhängige Glucoseabsorptionsraten (Stimulation mit 10 mmol/l Glucose mukosal) im Vergleich zu Kontroll-Gruppen nach. Die Versuche von Lodemann et al. (2006) ergaben bei Verwendung des Probiotikums *Enterococcus (E.) faecium* NCIMB 10415 ebenfalls eine Zunahme der Na⁺-abhängigen Glucoseabsorption. Des Weiteren kam es bei Breves et al. (2000) zu einer Zunahme der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} bezüglich der Na⁺-gekoppelten Glucoseaufnahme in Vesikel der Bürstensaummembran von Schweinen, die entweder mit *S. boulardii* oder *B. cereus* var. *toyoi* supplementiert wurden, was sich entweder durch eine Zunahme an Transportern in der apikalen Membran oder durch eine gesteigerte Transportrate jedes einzelnen Transporters erklären lässt.

Breves et al. (2000) fanden in Versuchen heraus, dass die Gabe von *S. boulardii* bzw. *B. cereus* var. *toyoi* einen Effekt auf die Gewebeleitfähigkeit ausübt, indem sowohl unter Kontrollbedingungen als auch nach Stimulation mittels Glucose Erhöhungen der Gewebeleitfähigkeit um etwa 30% im Vergleich zu Kontroll-Epithelien erzielt werden konnten.

Im Gegensatz zu dieser Studie konnten in Versuchen von Winckler et al. (1998) jedoch keine Unterschiede bezüglich G_t und I_{sc} in unstimulierten Messungen festgestellt werden. In Studien an Tieren, denen ein Teil des Dünndarmes entfernt wurde, zeigten sich durch Supplementierung von *S. boulardii* eine Erhöhung der Na^+ -gekoppelten Glucoseabsorption (Buts et al., 1999).

In den mit *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 durchgeführten Versuchen konnte nach mukosaler Stimulation mit 12 mmol/l L-Glutamin lediglich eine geringgradig höhere Absorptionsrate bei der Probiotika-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe festgestellt werden (Lodemann et al., 2006).

2.4.5.2 Probiotikawirkung auf die Sekretionsleistung des Dünndarms

In den Versuchen von Krammer et al. (1993) zeigte die Hefe *S. boulardii* im *Jejunum* von Ratten einen gegen Durchfall gerichteten Effekt durch eine signifikante Stimulierung der mukosalen Chloridabsorption sowie durch Umwandlung der PGE_2 -induzierten Chloridsekretion in eine Chloridabsorption. Im distalen Kolon war ein weiterer Effekt dieser Hefe zu beobachten. Hier wurde nicht nur die Absorption von Chlorid stimuliert, sondern auch die PGI_2 -induzierte Sekretion von Chlorid normalisiert, welche vermutlich über Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bewirkt wird (Krammer und Karbach, 1993). Krammer und Mitarbeiter (1993) nehmen aber an, dass nicht *S. boulardii* selbst, sondern eine von dieser Hefe produzierte und sezernierte Substanz für diesen Effekt verantwortlich ist. Schroeder et al. (2004) konnten in ihren Versuchen mit *S. boulardii* ebenfalls eine Verringerung der PGE_2 -vermittelten Chloridsekretion im absteigenden Kolon feststellen. In Versuchen mit *E. faecium* NCIMB 10415 konnten bezüglich der PGE_2 -stimulierten Chloridsekretion ebenfalls Unterschiede zwischen supplementierten Ferkeln und Kontrolltieren festgestellt werden (Lodemann et al., 2006). In Versuchen mit *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) behandelten Schweinedarmepithelien zeigte sich bei Stimulierung mit Forskolin im Vergleich zu Kontrolltieren eine niedrigere Chloridsekretion (Schroeder et al., 2006). In Versuchen von Winckler et al. (1998) ergab sich ein geringerer Anstieg des I_{sc} als Reaktion auf Stimulation mit Theophyllin (serosale Zugabe) bei Tieren, die über mehrere Tage mit *B. cereus* var. *caron* oder *S. boulardii* supplementiert wurden. In anderen Versuchen mit *S. boulardii* zeigte sich acht Tage nach Supplementierung nach Theophyllingabe eine transiente Reduktion der Chloridsekretion (Schroeder et al., 2004).

2.4.6 Probiotikawirkung auf die Barrierefunktion des Dünndarms

Wie bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben, haben die Verbindungen zwischen den Enterozyten, wie die Tight Junctions, eine große Bedeutung bezüglich der Darmbarriere. Stresssituationen können diese Barriere empfindlich beeinflussen und zu Erkrankungen, wie z.B. Magen-Darm-Störungen und IBD, führen (Mayer, 2000). Inwieweit Probiotika hier Einfluss nehmen können, war Fokus diverser Untersuchungen.

Eine *in vivo* Studie von Ukena et. al (2007) zeigte für *E. coli* Nissle 1917 (EcN) einen positiven Effekt auf die Darmbarriere, indem unter anderem die ZO-1-Expression der Darmepithelzellen erhöht wurde. Bei Tieren, die einem chronischem Stress ausgesetzt waren, konnte nach Applikation der Probiotika *Lactobacillus (L.) rhamnosus* R0011 und *L. helveticus* R0052 eine Steigerung der mucosalen Abwehr gegenüber luminalen Bakterien durch Verhinderung der Translokation von Bakterien sowie deren Anhaftung an die epitheliale Zelloberfläche erzielt werden (Zareie et al., 2006). Der Einsatz von Probiotika wie *L. rhamnosus* LMG P-22799 nach einem hämorrhagischen Schock reduzierte nachweislich die Endotoxinkonzentration sowie die Translokation von Bakterien über die Darmwand und verhinderte darüber hinaus die durch den Schock resultierende Veränderung der Tight Junctions (Luyer et al., 2005).

Resta-Lenert et. al (2009) konnten in *in vitro*- und *in vivo*-Studien nachweisen, dass Probiotika, in diesem Fall eine Kombination aus *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus acidophilus*, die durch inflammatorische Zytokine verübten schädigenden Effekte auf die epitheliale Barriereigenschaften aufheben sowie Transporteigenschaften positiv beeinflussen (Wiederherstellung der beeinträchtigten Chloridsekretion). In experimentellen Kolitis-Versuchen an Ratten konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass *L. casei* die Schäden am Darmepithel deutlich vermindern kann (Gionchetti et al., 2005). Zu dem gleichen Ergebnis kamen Madsen et al. (2001) in ihrem Kolitis-Modell. Sie wiesen nach, dass mit einer Probiotikamischung aus Laktobazillen, Bifidobakterien und Streptokokken Entzündungserscheinungen reduziert und Epithelfunktionen wieder restituiert werden können (Madsen et al., 2001). Verantwortlich dafür ist ein von den Probiotika sezerniertes lösliches Protein, welches einen oder mehrere intrazelluläre Signalwege aktiviert (Madsen et al., 2001). Darüber hinaus besitzen einige probiotische Mikroorganismen die Fähigkeit, antimikrobielle Substanzen (Bacteriocine) zu produzieren, die sich auf andere Bakterien hemmend auswirken können (Du Toit et al., 2000; Parente und Ricciardi, 1999). Auf diese antimikrobiellen Substanzen wird nochmal in Kapitel 2.4.9.3 eingegangen.

2.4.7 Beeinflussung der Epithelmorphologie und -differenzierung

Vergleiche zwischen keimfreien Tieren und solchen, deren Gastrointestinaltrakt eine physiologische Darmflora aufbauen konnte, zeigten, dass die Präsenz der intestinalen Mikroorganismen einen deutlichen Einfluss auf die Struktur des Darmepithels hat. So weist der Verdauungstrakt keimfrei aufgewachsener Tiere schmalere, fingerförmige Zotten, einen dünneren Darm mit reduzierter *Lamina propria*, eine verlängerte Zeit der Zellerneuerung sowie eine höhere Aktivität der Verdauungsenzyme auf (Jonsson und Conway, 1992). Es liegen jedoch auch sehr widersprüchliche Angaben vor. Bei Versuchen mit *Saccharomyces boulardii* an Ratten konnte zum Beispiel nach der oralen Gabe in hohen Dosen keinerlei morphologische Veränderung im Dünndarm festgestellt werden (Buts et al., 1986). Vielmehr zeigten die Versuche von Buts et al. (1986) sowohl bei Ratten als auch bei menschlichen Probanden einen signifikanten Anstieg der spezifischen sowie der Gesamt-Aktivität der in der Bürstensaummembran lokalisierten Disaccharidasen Sucrase, Maltase und Lactase. Die signifikanten Anstiege der spezifischen Aktivität von Sucrase führten Buts und Mitarbeiter (1986) eher auf den Eigengehalt von *Saccharomyces boulardii* an Sucrase zurück, als auf eine durch dieses Bakterium induzierte Erhöhung der Disaccharidasen.

Baum et al. (2002) untersuchten die Wirkung von Probiotika auf Morphologie und Muzine des Darmepithels. Dabei wurden bei klinisch gesunden Absatzferkeln drei Gruppen, eine supplementiert mit *Saccharomyces boulardii*, eine weitere Gruppe supplementiert mit *Bacillus cereus var. toyoi* und eine Kontrollgruppe, miteinander verglichen. Die Untersuchungen von *Duodenum*, proximalem und mittlerem *Jejunum* sowie *Ileum*, *Caecum* und *Colon* ergaben bei den supplementierten Gruppen einen Anstieg in der Zottenlänge des Dünndarmes sowie ein Abfall in der Anzahl der Becherzellen mit 2,6-sialinierten Muzinen im Dickdarm (Baum et al., 2002). Keine Unterschiede wurden zwischen den Gruppen bezüglich der Kryptenmorphologie, der Zahl der Ki67-positiven Zellen, der gesamten Anzahl der Becherzellen sowie der Becherzellen mit sauren, neutralen und sulfatierten und 2,3-sialinierten Muzinen festgestellt (Baum et al., 2002).

Jahn et al. (1996) untersuchten den Effekt von *Saccharomyces boulardii* auf die Epithelmorphologie bei gesunden Menschen nach dreiwöchiger Applikation. Dabei stellten sie eine Zunahme der Aktivität der Bürstensaumenzyme Lactase, α -Glucosidase und alkalische Phosphatase fest (Jahn et al., 1996).

Im Gegensatz zu Baum et al. (2002) konnten Scharek et al. (2005) keine Veränderungen in der Zottenlänge oder Kryptentiefe durch die Gabe von *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 feststellen. Das Darmepithel zeigte zwischen Kontroll- und Probiotika-Gruppe keine Unterschiede (Scharek et al., 2005).

2.4.8 Beeinflussung der Immunität

Milchsäurebildende Bakterien (LAB) und gramnegative apathogene Mikroorganismen unterscheiden sich bezüglich ihrer Enterozyteninteraktion (Herich und Levkut, 2002). Beide induzieren bei direkter Interaktion mit Darmepithelzellen Interferon- γ (IFN- γ), aber der stimulierende Effekt der LAB beschränkt sich lediglich auf die Ausbildung von zellulären Oberflächenmolekülen, während durch Einwirkung gramnegativer Bakterien vermehrt IFN- γ -Rezeptoren auf Enterozyten exprimiert werden und es zu einer gesteigerten Sensibilisierung dieser Zellen gegenüber IFN- γ kommt (Herich und Levkut, 2002). Auf der anderen Seite sind LAB mit IFN- γ in der Lage, Darmepithelzellen für darauf folgende Aktivierungen zu stimulieren, ein wichtiger Prozess für die lokale Immun-Homöostase (Herich und Levkut, 2002). Eine andauernde Antigenstimulation würde unter Umständen zu einer überschießenden Entzündung und Epithelschäden führen, die durch eine aktive Homöostase des Epithels (z.B. Apoptose) unterbunden wird (Herich und Levkut, 2002).

Famularo et al. (1997) gehen davon aus, dass die darmeigene Mikroflora durch Adhäsion an das Oberflächenepithel aktiv stimulierend auf das GALT-System wirkt; ein Effekt, den man auch Milchsäurebakterien zuschreibt. Viele Versuche mit LAB unterstützten die Hypothese, dass LAB-enthaltende Probiotika sowohl die phagozytische Aktivität als auch den 'respiratory Burst' von Monozyten-Makrophagen verstärken, was wiederum in einer verstärkten Phagozytose und Abtötung pathogener Keime resultiert (Famularo et al., 1997). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass Milchsäure-produzierende Bakterien die Funktion von Monozyten-Makrophagen, als Antigen-präsentierende Zellen zu agieren, stimulieren können (Famularo et al., 1997). Famularo et al. (1997) haben in ihrer Studie herausgefunden, dass viele LAB selektiv an die luminale Oberfläche von M-Zellen der Peyer'schen Platten binden; dies lässt vermuten, dass hier eine Translokation von Bakterien in das darunter gelegene lymphatische Gewebe erfolgt (Famularo et al., 1997). Milchsäure-bildende Bakterien, die im Gastrointestinaltrakt überleben können, könnten so unter anderem als Adjuvantien für die humorale Immunantwort wirken (Famularo et al., 1997). Die nachfolgende Grafik zeigt eine mögliche Immunstimulation im Dünndarm durch den Einsatz probiotischer Keime.

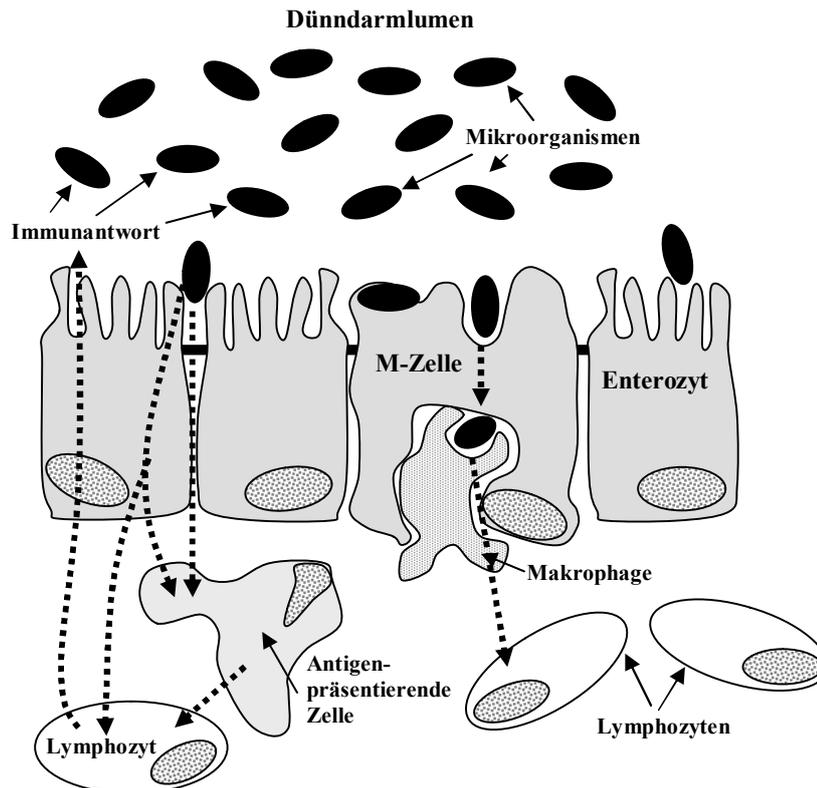


Abb.1: Mögliche Wege der Stimulation des Immunsystems durch aufgenommene Probiotika (nach Ouwehand 1999 bzw. Dissertation Marco Weiss 2003)

Scharek et al. (2005) fanden in ihrer Studie bei Ferkeln, die den probiotischen Keim *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (synonym SF68) sowohl über die Muttersau als auch nach dem Absetzen über das Futter erhalten hatten, im Vergleich zu Kontrolltieren eine deutliche Reduktion der intraepithelialen CD8⁺-T-Zellen. Intraepitheliale CD8⁺-T-Zellen besitzen vor allem zytotoxische Eigenschaften und sind mit zytolytischen Enzymen ausgestattet, mit denen sie infizierte oder gestresste Zielzellen zerstören können (Scharek et al., 2005). Des Weiteren konnte in der Studie von Scharek et al. (2005) zu fast jedem Probezeitpunkt bei der Probiotika-Gruppe verglichen mit der Kontroll-Gruppe ein niedrigerer IgG-Gehalt im Serum ermittelt werden; dies könnte den Schluss zulassen, dass *E. faecium* als autochthoner Darmkeim des Schweines über keine immunstimulierenden Fähigkeiten verfügt (Scharek et al., 2005). In an Mäusen durchgeführten Studien fand De Moreno de LeBlanc (2008) beim Vergleich von Kontrolle und Probiotika-Gruppe (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* und *Streptococcus thermophilus*) sowohl im Dün- als auch im Dickdarm einen Anstieg von CD4⁺ und CD8⁺ in der *Lamina propria*; in den Bronchien zeigten beide Vergleichsgruppen keine Unterschiede im Gehalt an CD4⁺ und CD8⁺.

Im Gegensatz zu der oben genannten Studie haben Benyacoub et al. (2005) als Antwort auf die Applikation von *E. faecium* SF68 einen vorübergehenden Anstieg von IgA bei Mäusen festgestellt. Dies reflektiert die Immunogenität dieses Probiotikums und lässt vermuten, dass

dieser Keim in der Lage ist, eine lokale Immunantwort auszulösen (Benyacoub et al., 2005). Des Weiteren hat man bei Infektionsversuchen mit *Giardia intestinalis* in Mäusen in der Probiotika-Gruppe sowohl lokal (IgA) als auch systemisch (IgG) höhere Anti-*Giardia*-Antikörpertiter gefunden, so dass durch *E. faecium* über den immunmodulatorischen Effekt hinaus auch eine antiparasitische Wirkung erreicht werden kann (Benyacoub et al., 2005). Der immunstimulierende Effekt von *E. faecium* SF68 könnte zum Teil über das 'Priming' des GALT und die Induktion sekretorischen IgAs erfolgen (Benyacoub et al., 2005). Sekretorisches IgA des Darmes, dessen Produktion durch *E. faecium* verstärkt wird, ist der wichtigste schützende humorale Immunfaktor des Epithels. Es verhindert die Anheftung von Mikroben, deren Kolonisierung und Penetration sowie die Aufnahme von Nahrungsantigenen (Benyacoub et al., 2003).

Probiotika wird weiterhin zugeschrieben, die nicht-humorale Immunität zu beeinflussen (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001). Die Zunahme der phagozytischen Aktivität von Makrophagen gegenüber einer Vielzahl intrazellulärer Bakterien wurde nach oraler oder parenteraler Applikation von *L. casei* an Mäuse festgestellt (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001). Die orale Gabe von *S. boulardii* an Menschen war verbunden mit einer Aktivierung von Komplement und einer retikuloendothelialen Aktivierung (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001). Sowohl die *in vitro* Produktion von IFN- γ , IL-12 und IL-18 in Blutlymphozyten des Menschen als auch die gesteigerte Kapazität, IFN- γ zu produzieren, wurden als Antwort auf verschiedene LAB-Stämme beschrieben (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001). Eine Studie zeigte, dass epithelassoziierte Laktobazillen vielversprechende Stimulatoren für IL-12 sein könnten und so die zellvermittelte Immunität unterstützen, sofern sie die Darmbarriere überwinden und mit dem epithelialen Immunsystem des Darmes interagieren können (Hessle et al., 1999). IL-12 soll die Th-2-Antwort runterregulieren und damit eine Abnahme in der IL-4 und IgE-Produktion bewirken und somit eine Möglichkeit des Einsatzes von Probiotika in der Allergieprävention bieten (Alvarez-Olmos und Oberhelman, 2001).

In der vorliegenden Arbeit soll gezielt die Wirkungsweise des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 auf das Darmepithel untersucht werden, daher wird im nachfolgenden Kapitel detaillierter auf diesen Keim eingegangen.

2.4.9 Die Gattung *Enterococcus*

2.4.9.1 Taxonomie

Die Gattung *Enterococcus* gehört zu den Milchsäure-bildenden Bakterien (Foulquie Moreno et al., 2006). Es handelt sich dabei um Gram-positive, nicht-sporenbildende, Katalase-negative, Oxidase-negative, fakultativ anaerobe Kokken, die einzeln, in Paaren oder auch in Ketten vorkommen (Foulquie Moreno et al., 2006). Sie gehören zur physiologischen Darmflora von Mensch und Tier und eignen sich somit zum Einsatz als Probiotikum (Benyacoub et al., 2003). Vor 1984 wurden einige Spezies dieser Gattung noch zu den Streptokokken gezählt, molekularbiologische Untersuchungen wiesen jedoch Unterschiede zu anderen Streptokokken auf, so dass *Streptococcus faecium* und *Streptococcus faecalis* in die Gattung *Enterococcus* eingeordnet wurden (Foulquie Moreno et al., 2006).

2.4.9.2 Eigenschaften von Enterokokken

Nachfolgend soll nur kurz auf die funktionellen Eigenschaften von Enterokokken eingegangen werden. Für Details sei auf die weiterführende Literatur verwiesen.

Mit einigen Ausnahmen wachsen Enterokokken bei Temperaturen zwischen 10 °C und 45 °C, haben ihr Wachstumsoptimum bei 35 °C, vertragen die Anwesenheit von 6,5% NaCl, einen pH von 9,6 und überleben Temperaturen von 60 °C für 30 Minuten (Foulquie Moreno et al., 2006).

Die Produktion antimikrobieller Substanzen wurde von Du Toit et al. (2000) bei *E. faecium* und *E. faecalis* - isoliert aus Schweinekot – nachgewiesen. Dabei handelte es sich laut Du Toit et al. (2000) um organische Säuren (Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure), Hydrogenperoxid (in Anwesenheit von Sauerstoff), Diacetyl, Aldehyde und Bacteriocine, wobei die von Enterokokken-Spezies produzierten Enterozine sich hemmend auf so genannte Gram-positive 'food-borne' Pathogene (dazu zählen *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* und Sporen von *Clostridium perfringens*) sowie darm-pathogene Keime auswirkten. Bacteriocine können noch von einer Vielzahl anderer Bakterien produziert werden (z.B. *Lactobacillus brevis* VB286, *Pediococcus acidilactici* P02, *Enterococcus faecium* DPC1146, *Carnobacterium divergens* V41, etc.) (Parente und Ricciardi, 1999). Bacteriocine sind antimikrobielle Peptide, die im Falle von Enterokokken ribosomal synthetisiert werden, kationisch und amphiphil sind und natürlicherweise von Mikroorganismen hergestellt werden, wobei sich ihr Spektrum sowie ihre Wirkungsweise, Thermostabilität, pH-Bereich und genetische Determinanten unterscheiden können (Foulquie Moreno et al., 2006).

Zu den drei Hauptklassen der Bacteriocine zählen:

Tabelle 6: Hauptklassen der Enterokokken-Bacteriocine (Foulquie Moreno et al., 2006)

Klasse I	Lantibiotika: kleine, kationische, hydrophobe, hitzestabile Peptide mit ungewöhnlichen Aminosäuren (z.B. die Thioether-Aminosäuren Lanthionin und/oder 3-Methyl-Lanthionin)
Klasse II	Kleine, kationische, hydrophobe, hitzestabile Peptide; weiter einteilbar in drei Untergruppen: IIa: pediocin-ähnliche Bacteriocine mit starkem Effekt gegenüber Listerien IIb: Bacteriocine, die zwei Polypeptidketten zur vollen Aktivität benötigen IIc: Bacteriocine, die keiner der beiden anderen Untergruppen angehören
Klasse III	Große, hydrophile, hitzelabile Proteine

Die meisten Bacteriocine wirken an der Zytoplasmamembran (Nes et al., 1996). Sie bilden in der Zellmembran Poren und führen dadurch zu einem „Auslaufen“ wichtiger intrazellulärer Moleküle (Foulquie Moreno et al., 2006).

2.4.9.3 *Enterococcus faecium*

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzte Milchsäurebildner *Enterococcus faecium* Stamm NCIMB 10415 (synonym SF68) wird von der Firma Cerbios-Pharma (Schweiz) als Futterzusatzstoff hergestellt und unter dem Markennamen Cernivet® LBC ME10 mit der Stammbezeichnung SF68 vertrieben (David Taras, Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin, persönliche Mitteilung). Ursprünglich wurde dieses Bakterium aus einem gesunden schwedischen Baby isoliert (Benyacoub et al., 2005). Sein natürliches Habitat stellt der Darm dar (Mitsuoka, 1992; Willard et al., 2000). Es handelt sich dabei um ein Milchsäurebakterium mit hemmenden Effekten gegenüber wichtigen darmpathogenen Keimen, wie enterotoxische *E. coli*, Salmonellen, Shigellen und Clostridien (Benyacoub et al., 2003), welches zusätzlich über eine Adhäsionsfähigkeit verfügt (Rinkinen et al., 2000). Bei Hunden konnten Benyacoub und Mitarbeiter (2003) nach Zusatz von *E. faecium* im Trockenfutter eine Stimulation und Auslösung intestinaler Immunfunktionen nachweisen. Buydens et al. (1996) führten eine Doppelblind-Studie durch, bei der der Einsatz eines *E. faecium* SF68-Stammes bei Patienten mit hochgradiger infektiöser Gastroenteritis sowohl zu einer Reduktion der Durchfallintensität als auch der Durchfalldauer im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.

Bei Versuchen an fistulierten Schweinen fanden Mulder und Mitarbeiter (1997) nach Applikation eines kommerziellen Probiotika-Produktes, welches sowohl *E. faecium* SF68 als auch *Bacillus (B.) toyoi*-Sporen enthielt, heraus, dass sich *E. faecium* im Dünndarm um den Faktor 50 bis 100 vermehrt. Da die Keimzahl nach Absetzen des Probiotikums wieder auf ihre Basiswerte zurückging, wurde angenommen, dass beide Keime nicht den Dünndarm

kolonisierten (Mulder et al., 1997). Es konnte in weiteren Studien nachgewiesen, dass sich *E. faecium* mit der Mucusschicht verbinden und darin wachsen kann (Pultz et al., 2006).

2.5 Interleukin-1 α

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 α zeigte in Absorptionsversuchen am Darmepithel eine positive Beeinflussung des Na⁺-abhängigen Glucosetransporters SGLT-1. Um diese Wirkung am *Jejunum* von Schweinen unterschiedlichen Alters zu verifizieren, wurde IL-1 α und als spezifischer SGLT-1-Inhibitor Phlorizin mit in die Versuche aufgenommen. Nachfolgend wird ein Überblick über die Eigenschaften von IL-1 α gegeben.

Gemäß Dinarello (1991) bezeichnet der Name Interleukin (IL) eine Stoffgruppe, die als Vermittler zwischen Leukozyten dient, wobei Interleukin-1 nicht nur von Leukozyten, sondern auch von anderen Zellarten synthetisiert wird. Dazu zählen Blut-Monozyten, Gewebsmakrophagen, Blut-Neutrophile, Neurone, Mikroglia, Astrozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, synoviaauskleidende Zellen, dermale Dendritische Zellen, Keratinozyten, intestinales, gingivales und zervikales Epithel, Blut-T-Lymphozyten, transformierte sowie normale Blut-B-Lymphozyten, Zellen der Lymphknoten, natürliche Killerzellen, maternale Plazentazellen und Dendritische Zellen Neugeborener (Dinarello, 1991; Spulber und Schultzberg, 2009).

Zur IL-1-Familie (IL-1F) gehören 11 Mitglieder, unter anderem IL-1 α und IL-1 β (Barksby et al., 2007; Dinarello, 2009). Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β werden in einer Proform synthetisiert, wobei Pro-IL-1 β inaktiv ist und erst durch Spaltung mittels Caspase-1 in die aktive Form überführt wird; IL-1 α hingegen wird in einer aktiven Proform synthetisiert und kann mittels des membrangebundenen Calpain in die reife Isoform gespalten werden (Andre et al., 2005). IL-1 α wird im Allgemeinen nicht in der Zirkulation oder in Körperflüssigkeiten gefunden, außer bei Vorliegen schwerer Krankheiten; hier wird vermutlich das Zytokin aufgrund von Zelluntergängen oder durch Proteolyse nach Calpain-vermittelter Spaltung freigesetzt (Dinarello, 1996).

Bezüglich IL-1 unterscheidet man zwei Rezeptoren: den signalvermittelnden Typ I-Rezeptor (IL-1RI) und den Typ II-Rezeptor (IL-1RII), der kein Signal weiterleitet (Dinarello, 1996). Sowohl IL-1 α als auch IL-1 β binden an den Typ I- und Typ II-Rezeptor, die beide membrangebunden und auch in gelöster Form vorkommen können (Spulber und Schultzberg, 2009). Bei Bindung an den spezifischen membranassoziierten IL-1RI, welcher wiederum mit einem IL-1 Rezeptor-akzessorischem Protein (IL-1RAcP) gekoppelt ist, wird eine Aktivierung unter anderem von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) und

Nuclear Factor- κ B (NF κ B) ausgelöst (Andre et al., 2005; Barksby et al., 2007). Die NF κ B-Familie kontrolliert die Transkriptionsaktivität zahlreicher Förderer proinflammatorischer Zytokine, Zelloberflächenrezeptoren, Transkriptionsfaktoren sowie Adhäsionsmoleküle, die an einer intestinalen Entzündung beteiligt sind; NF κ B scheint eine Schlüsselrolle in der Regulation von Immunzellfunktionen (z.B. Apoptose, Zytokinproduktion und chronische Entzündung) zu spielen (Neurath et al., 1998). NF κ B reguliert die Synthese einer Vielzahl von Genen, wie die von Zytokinen (dazu zählen unter anderem IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNF- α , LT α , LT β und GM-CDF), Chemokinen (z.B. IL-8, MIP-1 α , Rantes und Eotaxin), Adhäsionsmolekülen (wie ICAM, VCAM und E-Selectin), Akute Phase Proteinen (unter anderem SAA) sowie induzierbare Effektorenzymen (z.B. iNOS und COX-2) (Ghosh und Karin, 2002) (Hu et al., 2005). Der extrazelluläre Abschnitt des IL-1RI (IL-1sRI) sowie des IL-1RII (IL-1sRII) zirkulieren sowohl bei Gesundheit als auch bei Krankheit und wirken als natürliche Puffer, indem sie IL-1 α , IL-1 β oder IL-1Ra binden (Dinarello, 1996).

Als Stimuli für die Transkription und Translation von IL-1 zählen Endotoxine, Exotoxine sowie natürlich vorkommende Substanzen wie Komplement-Komponenten, Thrombin, Gallensalze und Androgenmetabolite (Dinarello, 1991). Dinarello (1996) zählt weiterhin Stressfaktoren, Neuroaktive Substanzen (z.B. Substanz P, Melatonin etc.), entzündliche Stoffe (z.B. Dioxin, C-reaktives Protein, Amphotericin-B etc.), Zellmatrix (Fibronectin, Kollagen), Gerinnungsfaktoren (Plasmin, Thrombin etc.), Lipide (z.B. Platelet activating factor), Zytokine (IL-1, TNF, IL-2, IL-3, IL-12, Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor, Monozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor, Stammzellefaktor, PDGF) sowie andere Substanzen (z.B. Phorbol ester, Antibiotika etc.) zu den Auslösern für die Bildung von IL-1. Dagegen wurde beobachtet, dass ein erhöhter Blutglukosespiegel inhibitorisch auf die Ausschüttung von IL-1 wirkt (Hill et al., 1998).

2.5.1 Wirkungsweise des proinflammatorischen Zytokins IL-1 α

Die durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF ausgelöste Kaskade beschreibt Dinarello folgendermaßen (Dinarello, 2000):

Sowohl IL-1 als auch TNF stimulieren die Expression bestimmter proinflammatorischer Gene, wie Typ II Phospholipase A₂ (PLA₂ II spaltet Fettsäuren in Position zwei der Phospholipide der Zellmembran, wodurch meist Arachidonsäure entsteht, welche essentiell für die Biosynthese der Eicosanoide ist), Cyclooxygenase (COX)-2 und, nur in geringem Maße, COX-1 sowie induzierbare Stickoxid (NO)-Synthase (iNOS). Diese Gene codieren Enzyme, welche die Synthese von Plättchenaktivierendem Faktor (PAF) sowie Leukotrienen, die Produkte der Cyclooxygenase (Prostaglandine, Prostacycline, Thromboxane) und NO erhöhen. Ist die Transkription von COX-2 erst einmal aktiviert, bleibt dessen Produktion für

mehrere Stunden erhöht und große Mengen von PGE₂ werden in IL-1-stimulierten Zellen produziert (Dinarello, 2000), welches über den 'second messenger' cAMP Chloridkanäle (CFTR) öffnet (Bertrand und Frizzell, 2003; Blikslager et al., 1999).

Sowohl Nusrat et al. (2000) als auch Bruewer et al. (2003) führen die durch IL-1 und andere Zytokine, wie IL-4, IL-13, Transforming-Growth-Factor (TGF)- α sowie Insulin-like-Growth-Factor (IGF)-I und IGF-II ausgelöste Abnahme der Barrierefunktion epithelialer und endothelialer Zellen auf eine Umverteilung bzw. Neuverteilung der Tight Junction-Moleküle und der Veränderung des Aktin-Zytoskeletts der Zellen zurück und weniger auf die durch Zytokine ausgelöste Apoptose intestinaler Zellen. Darüber hinaus kommt es bei Entzündung durch die Zunahme der in das Gewebe emigrierender Leukozyten und der Freisetzung von Zytokinen zu einem Anstieg der parazellulären Permeabilität (Nusrat et al., 2000).

2.5.2 IL-1 α und epithelialer Transport

Hardin et al. (2000) untersuchten, wie pro- und antiinflammatorische Interleukine den Nährstofftransport im *Jejunum* von Kaninchen sowie die Expression des Na⁺-abhängigen Glucose-Transporters beeinflussen. Dabei verursachten alle proinflammatorischen Interleukine, wie IL-6, IL-1 α und IL-8, eine Erhöhung der Absorption von Glucose (3-O-Methyl-Glucose) über die Darmwand sowie IL-1 α und IL-8 einen signifikanten Anstieg der L-Prolin-Absorption (Hardin et al., 2000). Da die Ausprägung des Na⁺-abhängigen Glucose-Transporters zwischen Kontrolltieren und der Interleukin-Gruppe keinen Unterschied aufwies, ist der Zusammenhang zwischen Entzündung und Zunahme der Glucoseaufnahme in das Blut vermutlich nicht auf eine Zunahme des SGLT-1-Transporters (siehe Kapitel 2.7.1 *Glucosetransport*) in der Bürstensaummembran zurückzuführen, sondern auf die Erhöhung der Effizienz der bereits existierenden SGLT-1-Population durch proinflammatorische Zytokine (Hardin et al., 2000). Die positive Abhängigkeit zwischen proinflammatorischen Interleukinen und der Absorption von Nährstoffen im *Jejunum* könnte durch den erhöhten Bedarf des betroffenen Gewebes erklärt werden (Hardin et al., 2000). Allerdings gibt die Studie von Hardin et al. (2000) keine Auskunft darüber, ob die verwendeten Zytokine direkt auf das Epithel oder über die Freisetzung anderer Mediatoren in der Darmwand wirken.

Chiossone et al. (1990) fanden in ihrer Studie an Ileumepithelien von Kaninchen heraus, dass IL-1 zu einer signifikanten Reduzierung der Natrium- und Chloridabsorption führt, ein Mechanismus, der unabhängig von extrazellulärem Kalzium ist. Es konnte keine Netto-Chlorid-Sekretion nachgewiesen werden, dennoch zeigte die Zunahme des Chloridfluxes von serosal nach mukosal, dass IL-1 nicht nur die normalen absorptiven Prozesse für Chlorid blockiert, sondern auch sekretorische Chloridpfade stimuliert (Chiossone et al., 1990).

2.5.3 Laktobazillen und Zytokinexpression

Die positiven Auswirkungen probiotischer Mikroorganismen auf die Immunantwort des Wirtes werden seit längerem untersucht. In Studien von Miettinen et al. (1996) mit unterschiedlichen Milchsäurebakterien konnte in *in vitro* Versuchen die Stimulierung der unspezifischen Immunantwort über Freisetzung der Zytokine TNF- α und IL-6 nachgewiesen werden. Da sich die untersuchten Probiotika in ihrer Wirkung zum Teil signifikant unterscheiden, gehen Miettinen et al. (1996) davon aus, dass die Oberflächenbeschaffenheit der Laktobazillen ihre Wirkung beeinflusst, und sich sogar innerhalb eines Stammes unterscheiden kann (Heumann et al., 1994; Sato et al., 1988). In weiteren *in vitro*-Versuchen mit Laktobazillen produzierten diese neben IL-1 β und TNF auch INF- α und INF- γ (Solis-Pereyra et al., 1997).

Die Effekte von Probiotika auf die Zytokinexpression können auf die Modulation verschiedener Zytokine zurückgeführt werden (Maassen et al., 2000). Nachfolgende Grafik gibt einen generellen Überblick über die Wirkung von Laktobazillen auf den Magen-Darm-Trakt.

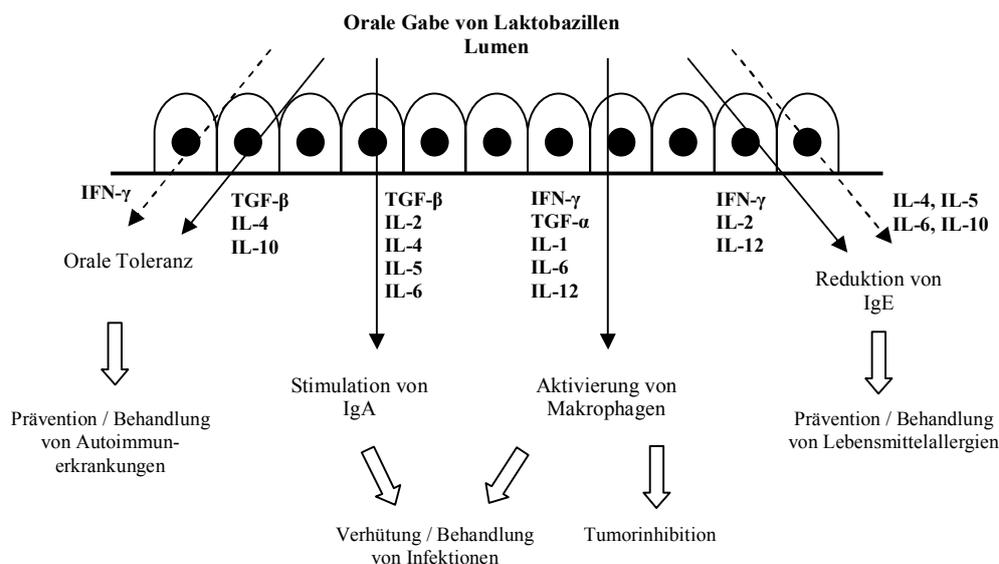


Abb. 2: Die Modulation von Zytokinen im Gastrointestinaltrakt durch die orale Gabe von Laktobazillen (Maassen et al., 2000) (durchgezogene Pfeile: Zytokininduktion; unterbrochene Pfeile: Reduktion der Zytokinexpression)

Die physiologisch vorkommende bakterielle Mikroflora beeinflusst das 'Zytokin-Netzwerk', welches die Immunantwort reguliert und Abwehrzellen hin zu eindringenden pathogenen Bakterien dirigiert; diese Fähigkeit wird auch bei einigen probiotischen Keimen gesehen (Famularo et al., 1997). Eine altersabhängige Abnahme der Zytokinproduktion - unter anderem der Interferone - ist laut Famularo et. al (1997) häufig zu beobachten und bietet

eine gute Einsatzmöglichkeit für Probiotika aufgrund ihres stimulierenden Effektes auf die Zytokinproduktion.

2.6 Prostaglandine und Indomethacin

Unter Prostaglandinen (PGs) versteht man aus C-20-Polyenfettsäuren synthetisierte Eicosanoide (Mest, 1994). Laut Mest (1994) erfolgt die Biosynthese der Eicosanoide in der Regel direkt am Ort der Reizung durch das Enzym Cyclooxygenase (COX). PGs bewirken z.B. im Magen-Darm-Trakt eine Steigerung der Mucosadurchblutung und Mucusbildung, eine Steigerung der Darmsekretion und Hemmung der Darmresorption sowie eine Hemmung der Säurebildung und Pepsinsekretion (Mest, 1994). Darüber hinaus steigern Prostaglandine die Barrierefunktion des Darms, indem der Schluss der intraepithelialen Zwischenräume stimuliert wird (Blikslager et al., 1999). PGE₂ erhöht den Gehalt des intrazellulären 'second messengers' cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) und bewirkt darüber eine Chloridsekretion (Cartwright et al., 1985). Für den genaueren Mechanismus der Öffnung von Chloridkanälen wird auf Kapitel 2.7.3 *Chloridtransport über den CFTR-Chloridkanal* verwiesen.

Indomethacin ist ein saures, in Wasser unlösliches nicht-steroidales Antiphlogistikum, welches nicht-selektiv sowohl Cyclooxygenase-1 (COX-1) als auch COX-2 hemmt, die unter anderem die Synthese von Prostaglandin katalysieren (Jain, 2007). Mit Indomethacin kann daher die endogene Prostaglandinsekretion unterbunden und so die Wirkung exogen zugegebenen Prostaglandins konzentrationsabhängig bestimmt werden.

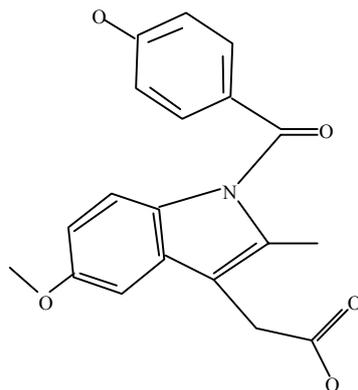


Abb. 3: Chemische Struktur des Indomethacins (Jain, 2007)

2.7 Transportmechanismen

Bei den für die eigenen Untersuchungen wichtigen Transportmechanismen des Dünndarmepithels handelt es sich um Na^+ -abhängige sowie Na^+ -unabhängige Glucose-Transporter der apikalen Membran, die Transporter für L-Glutamin sowie um den ebenfalls apikal lokalisierten CFTR-Chloridkanal. Die genannten Transporter werden nachfolgend eingehender erläutert.

2.7.1 Glucosetransport

Bezüglich des Glucosetransports unterscheidet man Na^+ -abhängige Glucose-Transporter (SGLT-1 bis SGLT-6; Gennamen SLC5A; SGLT = Sodium Glucose Luminal Transporter) sowie die die Diffusion erleichternden Na^+ -unabhängigen Glucose-Transporter (GLUTs; GLUT-1 bis GLUT-12 und HMIT = H^+ -gekoppelter Myo-Inositol-Transporter; Gennamen SLC2A) (Ferraris und Diamond, 1997; Wood und Trayhurn, 2003).

Für Glucose, als polares Molekül, ist für den Transport über lipidreiche Zellmembranen ein Transport mittels eines membranassoziierten Carriers erforderlich (Ehrenkranz et al., 2005). Die SGLTs transportieren Glucose (und Galactose (Wood und Trayhurn, 2003)) entgegen ihrem Konzentrationsgradienten in die Zelle hinein, indem sie den Cotransport mit Na^+ nutzen (sekundär aktiver Transport), welches seinem elektrochemischen Gradienten folgend in die Zelle aufgenommen wird; die intrazelluläre Natrium-Konzentration wird dabei durch die basolateral gelegene Natrium/Kalium-Adenosin-Triphosphatase (Na^+/K^+ -ATPase) aufrechterhalten (Ehrenkranz et al., 2005). Auf der basolateralen Seite gelangt Glucose (sowie Galactose und Fructose) mittels des Glucosetransporters GLUT-2 in die Blutbahn, Na^+ verlässt die Zelle 'bergauf' (mit Hilfe der Na^+/K^+ -ATPase) (Ehrenkranz et al., 2005; Hediger und Rhoads, 1994; Kellett, 2001).

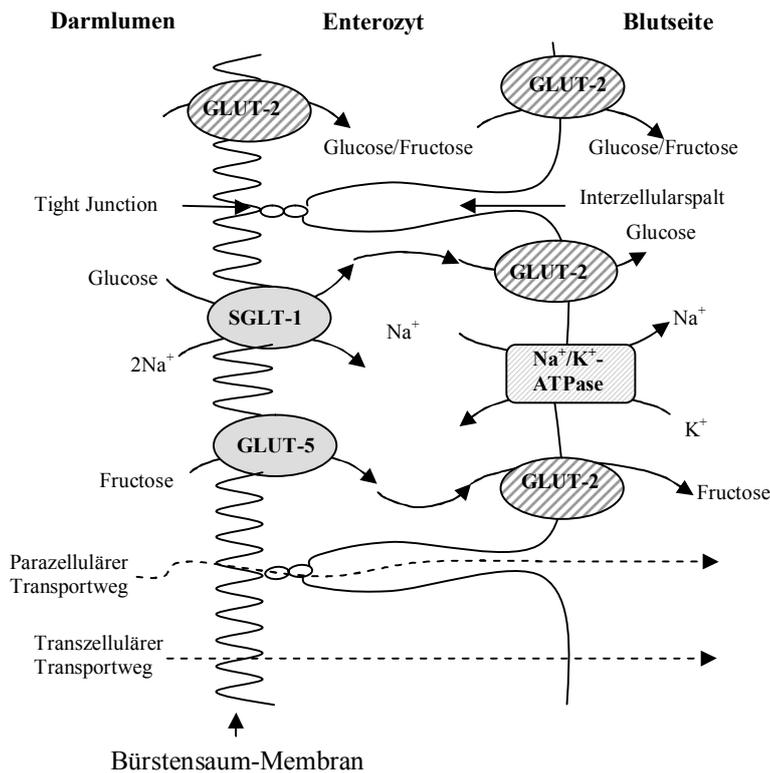


Abb. 4: Darstellung intestinaler Epithelzellen mit möglichen Transportwegen sowie Lokalisation der Glucose-Transporter, modifiziert nach Ferraris et al. (1997), Hediger et al. (1994) und Kellett (2001)
SGLT-1: Natriumabhängiger Glucose-Transporter
GLUT-2: Natriumunabhängiger Transporter für Glucose bzw. Fructose
GLUT-5: Natriumunabhängiger Fructose-Transporter

Die Familie der Na^+ -abhängigen Glucose-Transporter beinhaltet drei Homologe: einen Transporter mit hoher Affinität (SGLT-1) sowie zwei Transporter niedrigerer Affinität (SGLT-2 und SGLT-3) (Ikari et al., 2002). Der Transport jedes Glucosemoleküls ist entweder an den Cotransport zweier Natriumionen (SGLT-1; Dünndarm, Niere; bei Ratten in geringen Mengen auch in Lunge und Leber (Ehrenkranz et al., 2005; Hediger und Rhoads, 1994)) oder eines Natriumions (SGLT-2, apikale Bereiche im proximalen Tubuluskonvolut der Niere) gekoppelt (Hediger und Rhoads, 1994). Im Dünndarm von Schweinen wurden zusätzlich Hinweise auf SGLT-3 gefunden (Wood und Trayhurn, 2003). Eine Mutation des SGLT-1 verursacht bei Menschen das Glucose-Galactose-Malabsorptionssyndrom (Wood und Trayhurn, 2003).

SGLT-1 transportiert als Substrate lediglich Glucose und Galactose, Disaccharide werden nicht transportiert (Ikumi et al., 2008). Laut Kellett et al. (2000) ist die SGLT-1 vermittelte aktive Absorption nicht der Hauptweg, über den Glucose nach der Mahlzeit aus dem Dünndarm aufgenommen wird (Kellett und Helliwell, 2000). Der Na^+ -abhängige Glucose-Cotransport weist eine K_m von 8-23 mM auf und wird *in vivo* ab einer Konzentration von 30-50 mM Glucose gesättigt (Kellett, 2001; Kellett und Helliwell, 2000). In einigen Berichten

wurde aber ein fast linearer Anstieg der Glucoseabsorption von 50 mM bis zu einigen hundert mM beobachtet, so dass man die Existenz eines weiteren Absorptionsmechanismus für Glucose annehmen muss, die als Diffusionskomponente bezeichnet wird (Kellett, 2001). Der genaue Mechanismus wird noch immer diskutiert (Kellett und Helliwell, 2000).

Die die Diffusion erleichternden, Na⁺-unabhängigen Glucose-Transporter (GLUT) nutzen den Diffusionsgradienten von Glucose sowie anderer Zucker über die Plasmamembran (Wood und Trayhurn, 2003). Dabei diffundiert Glucose aus der Zelle in das Blut entweder über den GLUT-2 (Dünndarm, Niere) GLUT-5 (Dünndarm, Niere, Hoden) oder den GLUT-1 (Niere) (Ferraris und Diamond, 1997; Hediger und Rhoads, 1994; Wood und Trayhurn, 2003). Die erleichternden Glucose-Transporter-Isoformen weisen eine bestimmte Gewebeverteilung sowie bestimmte biochemische Eigenschaften auf (Bell et al., 1990; Wood und Trayhurn, 2003). Nachfolgend wird lediglich auf den GLUT-2 eingegangen.

Kellett und Helliwell (2000) fanden heraus, dass der Glucose-Transporter GLUT-2 nicht ausschließlich in der basolateralen Membran des Dünndarmes zu finden ist, sondern auch in der Bürstensaummembran nachgewiesen werden kann, wo dieser neben Fructose auch Glucose in das Zellinnere transportiert (siehe Abb. 4). Die Stimulierung der Fructoseaufnahme über den GLUT-2 bzw. der Transport dieses Transporters zur Bürstensaummembran wird durch die Proteinkinase C (PKC) gesteuert, sehr wahrscheinlich durch das Isoenzym β II (Kellett und Helliwell, 2000), sowie durch die intrazellulären Signalwege der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (Kellett, 2001). PKC β II wird durch Glucose aktiviert (Kellett und Helliwell, 2000). In Untersuchungen kam es bei Glucosekonzentrationen von 100 mM und mehr zu einer Verdoppelung der GLUT-2 in der Bürstensaummembran sowie auch basolateral zur Erhöhung des GLUT-2 (Kellett, 2001). Dieser Prozess erfolgte so schnell, dass innerhalb von maximal 15 Minuten für die Glucoseabsorption bereits ein Steady-State-Level erreicht werden konnte (Kellett, 2001; Kellett und Helliwell, 2000).

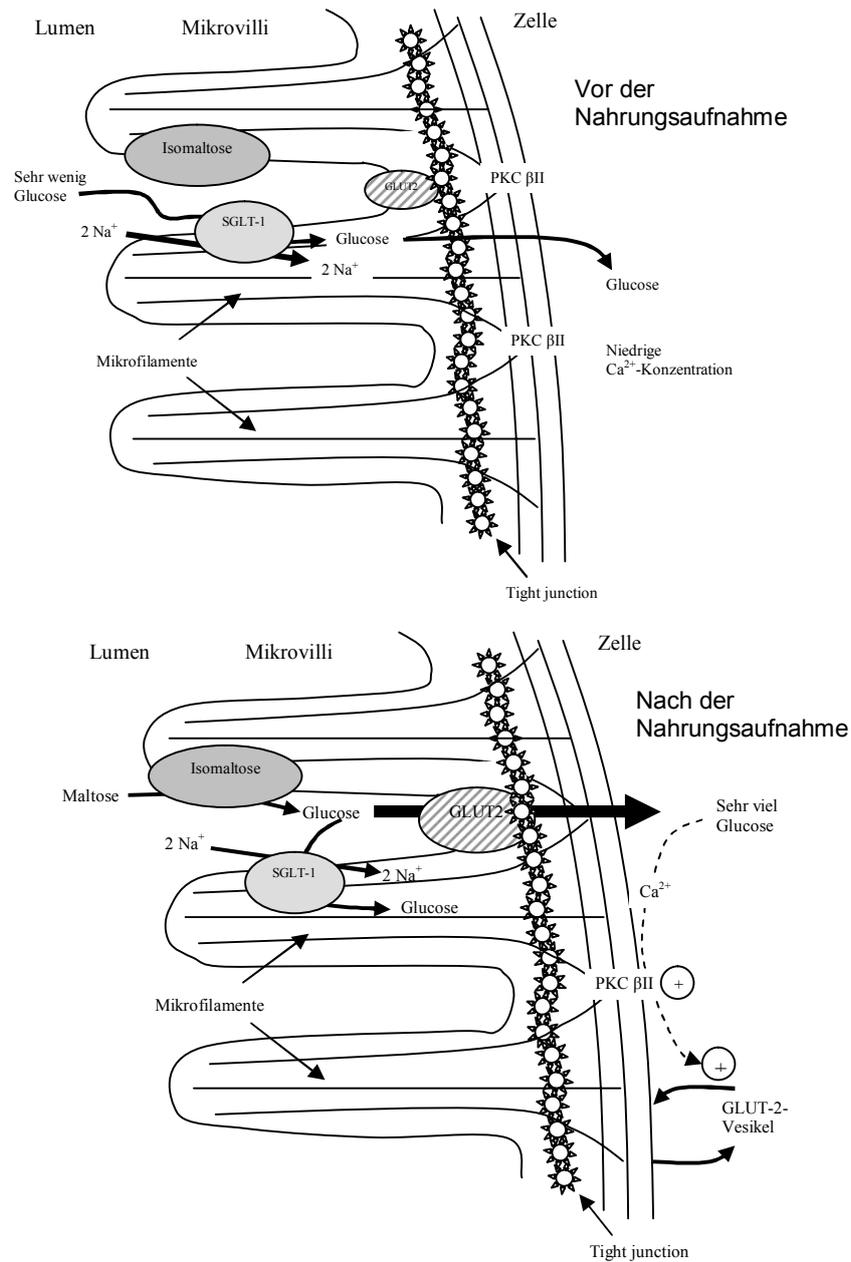


Abb. 5: Modell zur Regulation der Glucoseabsorption im *Jejunum* entsprechend dem Glucoseangebot vor und nach der Nahrungsaufnahme; nach Kellett (2001)

2.7.2 Phlorizin: Hemmung des Na^+ -abhängigen Glucose-Transporters

Bei Phlorizin ($\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{10} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$, MG 472,41) handelt sich um ein Glycosid, das in der Wurzelrinde von Apfelbäumen und Apfelschalen sowie in anderen Obstbäumen vorkommt (Ehrenkranz et al., 2005).

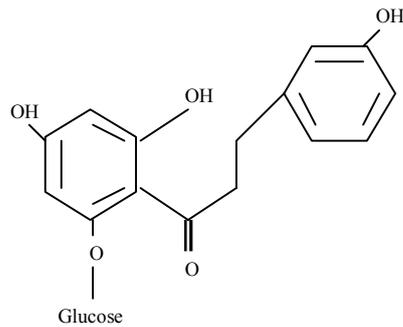


Abb. 6: Chemische Struktur des Phlorizins (Ehrenkranz et al., 2005)

Phlorizin ist ein Glucoseanalogon, welches spezifisch den SGLT-1 hemmt; es wird weder in die Zelle hinein transportiert noch beeinflusst es den intrazellulären Glucosestoffwechsel (Wright et al., 1997; Yu et al., 2005). Die die Diffusion erleichternden Transporter (GLUT-1 bis GLUT-12) werden ebenfalls nicht gehemmt (Hediger und Rhoads, 1994; Yu et al., 2005). In der Niere hemmt Phlorizin die Rückresorption von Glucose über die Blockierung des SGLT-1 im proximalen Tubulus und führt so zur Glucosurie, eine Eigenschaft, die zur Behandlung von Diabetes, Obesitas und Stresshyperglykämie genutzt wird (Ehrenkranz et al., 2005). Die Hemmung der Na^+ -abhängigen Glucose-Transporter SGLT-1 und SGLT-2 ist kompetitiv (Ferraris und Diamond, 1997), wobei die Affinität für Phlorizin, am renalen Glucosetransporter zu binden, die Affinität von Glucose um das 1000fache bis 3000fache übersteigt (Ehrenkranz et al., 2005).

In einigen der von uns durchgeführten Versuche wurden Epithelien mit Phlorizin behandelt, um festzustellen, ob $\text{IL-1}\alpha$ einen Effekt auf die Glucoseaufnahme im Dünndarm hat. Die genaue Dosierung des Phlorizins sowie der Versuchsablauf sind dem Kapitel 3. *Tiere, Material und Methoden* zu entnehmen.

2.7.3 Chloridtransport über den CFTR-Chloridkanal

Unter dem CFTR-Chloridkanal versteht man den so genannten „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel“ (Li et al., 2009), eine essentielle Komponente des epithelialen Chloridtransportsystems zahlreicher Organe, wie Darm, Pankreas, Lunge, Schweißdrüsen und Niere (Akabas, 2000). Der CFTR gehört der Superfamilie der ABC-Membrantransporter an (Akabas, 2000). Im Darm wird Chlorid über einen basolateral gelegenen $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporter in die Enterozyten aufgenommen und verlässt diese wieder über den CFTR der apikalen Membran, wobei Wasser aufgrund des entstehenden osmotischen Gradienten folgt (Field, 2003; Field und Semrad, 1993; Gill et al., 2011). Der CFTR befindet sich in den Krypten sowie zu etwa 3% in den Zotten von Dünndarm und *Colon* (Field, 2003). Absorptive Epithelien nutzen ähnliche Transporter und

Kanäle, nur dass hier die Lokalisation seitenverkehrt ist (Akabas, 2000). Die Geschwindigkeit des transepithelialen Chloridtransportes hängt dabei von der Menge des durch Phosphorylierung aktivierten CFTR ab; dies wiederum ist von Kinasen und Phosphatasen abhängig, deren Aktivität meist hormonell reguliert wird (Akabas, 2000).

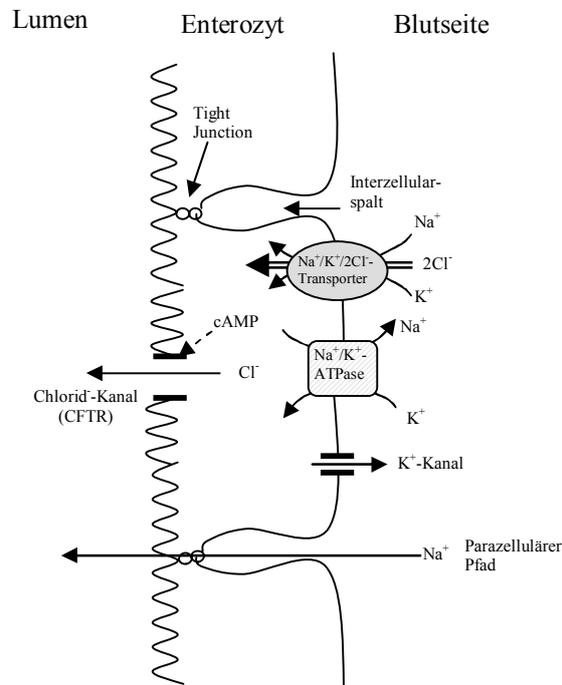


Abb. 7: Grafische Darstellung des apikal gelegenen CFTR (Field und Semrad, 1993)

Die Regulation des CFTR erfolgt durch zwei getrennte Prozesse, zum einen durch die zur Aktivierung notwendige, aber nicht ausreichende Phosphorylierung über zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP)-abhängige Proteinkinase A, Proteinkinase C sowie Typ II zyklisches Guanosin-3'-5'-Monophosphat (cGMP)-abhängige Proteinkinase, und zum anderen durch die Bindung und Hydrolyse von ATP, was letztendlich das Öffnen und Schließen des CFTR-Chloridkanals kontrolliert (Akabas, 2000). Die Deaktivierung nach Phosphorylierung erfolgt durch Proteinphosphatasen (PP; vor allem PP2C und PP2A) (Akabas, 2000). cAMP beschleunigt den Transport und die Einlagerung des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Cotransporters aus dem Endoplasmatischen Retikulum in die basolaterale Membran (Bertrand und Frizzell, 2003; Field, 2003). Laut Field (2003) ist der CFTR nicht nur für Chloridionen durchlässig, sondern auch für HCO_3^- -Ionen. Zur Stimulierung des CFTR können cAMP-bezogene Agonisten, wie PGE_2 und Theophyllin, verwendet werden (Field und Semrad, 1993). Eine vermehrte Stimulierung des CFTR aufgrund einer vermehrten Aktivierung der Proteinkinase durch bakterielle Enterotoxine führt zur sekretorischen Diarrhöe (Field und Semrad, 1993).

2.7.4 Der L-Glutamintransport

In der vorliegenden Arbeit wurde neben Glucose auch die Absorption von L-Glutamin sowie die Beeinflussung durch das Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 untersucht. Der Mensch verfügt über adaptive Mechanismen, durch die er in der Lage ist selbst, d.h. endogen, Glutamin zu synthetisieren, zu transportieren und zu nutzen; daher gilt Glutamin als eine nicht-essentielle Aminosäure (Neu et al., 1996). Die Bedeutung des Glutamins liegt in seiner Funktion als essentieller metabolischer Vorläufer der Nukleotid-, Glucose- (Umwandlung in der Leber) und Aminosucker-Biosynthese, Glutathion-Homöostase (Wirkung als Antioxidans im Gewebe) sowie der Proteinsynthese (Neu et al., 1996). Darüber hinaus hängt das Wachstum proliferierender Zellen, wie Fibroblasten, Lymphozyten und Enterozyten stark von Glutamin als Energiequelle ab (Bode, 2001). Des Weiteren unterstützt Glutamin die Homöostase von Geweben, indem es am interzellulären Substratzyklus in Gehirn, Leber und dem fetalen-plazentaren Nährstoffaustausch beteiligt ist (Bode, 2001). In humanmedizinischen Studien zeigte Glutamin einen positiven Effekt bei Knochenmark-Empfängern und Neugeborenen mit niedrigem Geburtsgewicht; auch bei HIV-Patienten geht man von einem positiven Effekt von Glutamin aus, da die Integrität des Darmepithels, welches die Eintrittspforte vieler Infektionen darstellt, durch die Applikation von Glutamin gestärkt werden kann (Bode, 2001).

Die Resorption von Aminosäuren aus dem Darmtrakt erfolgt über verschiedene Mechanismen. Die jeweiligen in der Bürstensaummembran gelegenen Cotransporter für Natrium nehmen sowohl neutrale Aminosäuren (Alanin, Serin, Cystein und Leucin), saure Aminosäuren (Glutaminsäure und Asparaginsäure), β -Aminosäuren (β -Alanin und Taurin) und die Iminosäure Prolin mit in die Enterozyten hinein, dem elektrochemischen Gradienten des Natrium folgend, welcher durch die basolateral gelegene Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird (Scharrer und Wolffram, 2000). Basische Aminosäuren werden mittels eines Na^+ -unabhängigen Carriers in die Dünndarmepithelzellen aufgenommen (Scharrer und Wolffram, 2000). Die Na^+ -Cotransporter für neutrale, basische Aminosäuren und Iminosäuren verfügen über eine, die für saure und β -Aminosäuren über zwei Bindungsstellen für Natrium (Scharrer und Wolffram, 2000). Die Aminosäuren verlassen die Enterozyten, ihrem chemischen Gradienten folgend, mittels erleichterter Diffusion basolateral und gelangen in das Blut; auch dafür existieren für die verschiedenen Aminosäuren verschiedene Carrier (Scharrer und Wolffram, 2000). Da auch die Enterozyten der Dünndarmzotten, des Dickdarmepithels und der Krypten zur Proteinsynthese sowie zur Energieversorgung Aminosäuren benötigen, werden diese über einen basolateral gelegenen Na^+ -abhängigen Aminosäure-Carrier mit Aminosäuren versorgt, sofern aus dem Darmlumen keine Resorption erfolgt (Scharrer und Wolffram, 2000).

Laut Bode unterscheidet man Na^+ -abhängige Glutamin-Transporter-Gene, wie System N (SN1), System A („alanine-preferring“; ATA1, ATA2), System ASC/ B^0 (ASC leitet sich ab von den bevorzugten Substraten Alanin, Serin und Cystein; ASCT2 oder ATB^0), System $\text{B}^{0,+}$ ($\text{ATB}^{0,+}$) und System γ^{L} ($\gamma^{\text{L}}\text{LAT1}$, $\gamma^{\text{L}}\text{LAT2}$) von Na^+ -unabhängigen Glutamin-Transporter-Genen, die für System L („leucine-preferring“; LAT1, LAT2), n und System $\text{b}^{0,+}$ ($\text{b}^{0,+}\text{AT}$) codieren (Bode, 2001).

Die verschiedenen Transportmechanismen für Aminosäuren sind in nachfolgender Grafik dargestellt.

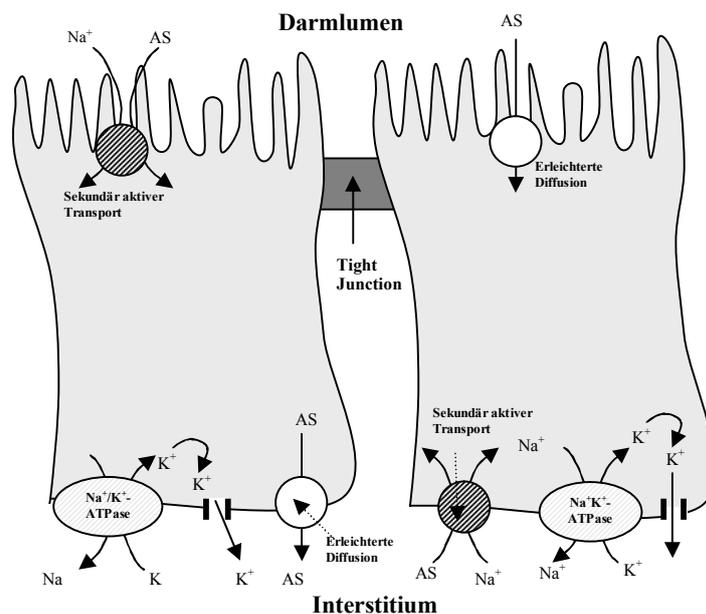


Abb. 8: Transportmechanismen der Aminosäurenresorption im Darm (Scharrer und Wolfram, 2000)

2.8 Zusammenfassung der Literatur – Arbeitshypothesen

In den letzten Jahren hat die Zahl der Untersuchungen über die Wirkungsweisen probiotischer Bakterien bei Mensch und Tier stetig zugenommen. Positive Effekte konnten bei Menschen z.B. in Bezug auf Antibiotika-assoziierte Durchfallerkrankungen nachgewiesen werden (Marteau et al., 2001). Im Bereich der Nutztierernährung zeigten sich ebenfalls positive Wirkungen bezogen auf bessere Futterverwertungen (Fuller, 1992), Abnahme der Durchfallhäufigkeiten (Simon et al., 2003) oder verbesserte Wachstumsraten (Fuller, 1992; Kirchgessner et al., 1993). Speziell verspricht man sich, bezogen auf den Dünndarm, neben Erhöhungen der Glucoseabsorption (Breves et al., 2000) und Reduzierungen der Chloridsekretionen (Winckler et al., 1998), eine positive Beeinflussung der Barrierefunktion des Darmes (Winckler et al., 1998) sowie eine Verbesserung der Immunabwehr (Perdigon et al., 1995; Perdigon et al., 1986). Da seit dem 1. Januar 2006 Antibiotika als

Leistungsförderer EU-weit verboten sind, stellt sich die Frage, ob Probiotika als deren Ersatz dienen könnten.

In Untersuchungen von Breves et al. (2000) konnte bezüglich der Probiotika *Saccharomyces (S.) boulardii* und *Bacillus (B.) cereus* var. *toyoi* eine Erhöhung des elektrogenen Na⁺-abhängigen Glucose-Transportes nachgewiesen werden.

Probiotische Mikroorganismen sind in der Lage, pathologische Chloridsekretionen im Dünndarm zu mildern, indem die Chloridabsorption stimuliert und die PGI₂- und PGE₂-induzierte Chloridsekretion reduziert und somit eine (Netto)Chloridabsorption bewirkt wird (Krammer und Karbach, 1993).

In den Versuchen von Chiossone et al. (1990) und Hardin et al. (2000) zeigte sich eine Hemmung der Natrium- und der Chloridabsorption durch die Zugabe von IL-1 α . Hardin et al. (2000) wiesen eine Erhöhung der Glucoseabsorption als Antwort auf proinflammatorische Interleukine, wie IL-1 α , nach.

Für die vorliegende Dissertation waren diesbezüglich folgende Fragen relevant:

- Besteht beim Vergleich von *E. faecium* NCIMB 10415-supplementierten Ferkeln mit Kontrolltieren ein Unterschied im Hinblick auf die Glucose- und L-Glutaminabsorption?
- Gibt es durch die Supplementierung von *E. faecium* NCIMB 10415 eine Beeinflussung der Chloridsekretion?
- Hat IL-1 α einen Effekt auf den Natrium-gekoppelten Glucosetransporter SGLT-1?

Aus diesen Fragen leiten sich nachfolgende Arbeitshypothesen ab:

- Durch die Supplementierung von *E. faecium* NCIMB 10415 kann eine Erhöhung der Na⁺-abhängigen Glucoseabsorption sowie die Absorption von L-Glutamin im Dünndarm erreicht werden.
- Der Einsatz von *E. faecium* NCIMB 10415 bewirkt eine Reduktion der PGE₂-induzierten Chloridsekretion im *Jejunum* des Schweins.
- IL-1 α beeinflusst den Na⁺-abhängigen Glucosetransporter SGLT-1.

3. Tiere, Material und Methoden

3.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung

3.1.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Hülsenberger Zuchtschweine der Hybridsauenlinie Duroc bzw. Euroc (Duroc x Deutsche Landrasse bzw. Euroc x Deutsche Landrasse). Das Sperma stammte von einem Eber der Rasse Pietrain. Die Lieferung der Tiere erfolgte über die Firma H. Wilhelm Schaumann GmbH, An der Mühlenau 4, D-25421 Pinneberg/Hamburg (Dr. David Taras, Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin, persönliche Mitteilung). Für die Untersuchungen wurden Ferkel der Altersgruppe 14., 28., 31., 35. sowie 56. Lebenstag (LT) herangezogen.

3.1.2 Haltung und Fütterung der Versuchsferkel

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen bezüglich der transportphysiologischen Einflussnahme durch Supplementierung mit *E. faecium* NCIMB 10415 am *Jejunum* von insgesamt 50 Schweinen durchgeführt, wobei 25 Ferkel der Kontrollgruppe und 25 Ferkel der Probiotikagruppe zugeordnet wurden. Die Schweine wurden am Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin (Brümmerstrasse 34, 14195 Berlin) während der gesamten Versuchsdauer gehalten. Hier erfolgte auch die Applikation des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415, welches von Cebios-Pharma unter dem Markennamen Cernivet® LBC ME10 mit der Stammbezeichnung SF68 als Futterzusatzstoff hergestellt wurde; der Vertrieb des genannten Probiotikums erfolgt über die Firma DSM unter dem Namen Cylactin® (persönliche Mitteilung Dr. David Taras, Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin). Für jeden Wurf wurden die Chargen vom Institut für Tierernährung frisch hergestellt.

Den Ferkeln wurde entweder das Probiotikum *E. faecium* SF68 (synonym NCIMB 10415; sog. Probiotika-Gruppe) oder eine Glucoselösung als Placebo verabreicht (sog. Kontroll-Gruppe). Die Zuordnung zu den jeweiligen Fütterungsgruppen erfolgte zufällig. Gemäß Versuchsprotokoll erfolgte bei der Probiotika-Gruppe vom 0. bis einschließlich des 34. Lebenstages (LT) eine tägliche orale Gabe von $4,5 \cdot 10^9$ CFU des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415. Darüber hinaus wurde ab dem 15. bis zum 28. LT das Probiotikum (zusätzlich zur oralen Applikation) auch über das Starterfutter in einer Konzentration von $1,2 \cdot 10^{10}$ CFU/kg Futtermittel supplementiert. Vom 29. bis 56. LT erhielten die Ferkel der Probiotika-Gruppe das Probiotikum in einer Konzentration von $3,2 \cdot 10^9$ CFU/kg Futtermittel. Ab dem 35. LT erhielten die Ferkel das Probiotikum ausschließlich über das Starterfutter. Beide Gruppen hatten *ad libitum*-Zugang zu Wasser und Futter. Den Muttersauen beider

Gruppen wurde kein Probiotikum zugefüttert. Die Futterzusammensetzungen für die Sauen sowie für die Absatz- und Saugferkel sind dem Anhang zu entnehmen.

Die Ferkel wurden am Übergang vom 28. zum 29. LT abgesetzt, d.h. bei der Tötung am 28. LT waren die Ferkel noch nicht abgesetzt. Die Ferkel wurden bis zu diesem Zeitpunkt bei ihrer Mutter auf Stroheinstreu gehalten und nach dem Absetzen zu zweit in Flatdeck-Boxen mit Spaltenboden umgesetzt und erhielten Futter für Absatzferkel *ad libitum*. Erfahrungsgemäß begannen die Ferkel erst etwa ab dem 30. LT mit der Futteraufnahme.

3.1.3 Haltung und Fütterung der Muttersauen

Tragende Sauen wurden in Gruppen von drei bis vier Sauen ohne Stroheinstreu auf Betonboden gehalten (Taras et al., 2006). Zehn Tage vor dem errechneten Geburtstermin wurden die tragenden Sauen in den Abferkelstall verbracht, wo sie bis zum Absetzen der Ferkel auf Stroheinstreu gehalten wurden (Taras et al., 2006).

Die Fütterung der Sauen erfolgte mit der jeweiligen Diät, wobei der Energiegehalt des Futters für tragende Muttersauen 10,6 MJ [ME/kg] und für laktierende Muttersauen 13 MJ [ME/kg] betrug (Scharek-Tedin, 2009; Taras et al., 2005). Die Muttersauen hatten *ad libitum*-Zugang zu Wasser, erhielten jedoch kein Probiotikum. Das Futter wurde nach Ferkelzahl und Gewicht der Sau berechnet.

3.2 Tötung der Versuchstiere

Für den Versuch wurden sowohl von der Kontroll- als auch von der Probiotika-Gruppe jeweils Tiere der Altersklassen 14., 28., 31., 35. und 56. Lebenstag verwendet. Am Morgen des Versuchstages wurden die Ferkel durch eine intramuskuläre Gabe von 0,2 ml/kg Ketamin (10% Ursotamin[®], Wirkstoff Ketaminhydrochlorid, Hersteller Serumwerk Bernburg, Hallesche Landstrasse 105b, 06406 Bernburg) sowie einer intramuskulären Injektion von 0,1 ml/kg Stresnil[®] (Wirkstoff Azaperon, Hersteller Janssen-Cilag GmbH, 41457 Neuss) entsprechend ihres Gewichtes sediert. Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung mittels intraperitonealer Applikation von Eutha 77[®] (Wirkstoff Pentobarbital-Natrium, Hersteller Essex Tierarznei, Niederlassung der Essex Pharma GmbH, Thomas-Dehler-Str. 27, 81737 München) in einer Dosierung von 0,9±0,2 ml/kg (altersabhängige Dosierung). War die gewünschte Narkosetiefe erreicht, wurde die Bauchhöhle eröffnet und der Dünndarm an den Übergängen Magen-Duodenum sowie Jejunum-Ileum mit Arterienklemmen abgeklemmt. Es erfolgte ein Skalpellschnitt in der Drosselrinne zur Freilegung der *Vena Jugularis*. Zunächst wurde für Versuche weiterer beteiligter Forschergruppenmitglieder aus dieser Blut entnommen. Direkt im Anschluss erfolgte die Euthanasie durch intravenöse Gabe von Eutha 77[®] in die *Vena Jugularis*. War der Tod des Tieres eingetreten, wurde der zuvor

abgeklemmte Darm zügig aus der Bauchhöhle entfernt und in eine vorgewärmte Metallschale gelegt.

3.3 Probengewinnung und Gewebepräparation

Mittels eines biometrischen Verfahrens wurde für jedes Tieralter die Mitte des *Jejunums* errechnet, um so zu gewährleisten, dass bei allen Tieren bzw. Versuchen immer der gleiche Darmabschnitt verwendet wurde. Für die Ussing-Kammer-Versuche wurden vor Ort 150 cm aus dem mittleren *Jejunum* abgemessen und in zwei gleich große Abschnitte aufgeteilt. Die Serosa und die darunter gelegenen Muskelschichten wurden an beiden Abschnitten von der sich darunter befindenden Schleimhaut getrennt, indem zunächst mittels einer Metzenbaumschere die Serosa ringförmig eingeschnitten wurde. Die Serosa sowie die Muskelschichten wurden dann mit einer Pinzette erfasst und vorsichtig abgezogen ('Strippen'). Anschließend wurde der Darm der Länge nach eröffnet. Für die Aufbewahrung sowie den Transport des Darmes von der Entnahme/Präparation bis zum Einbauen in die Ussing-Kammern wurde ein Dewar-Gefäß mit einem so genannten Transportpuffer verwendet (Pufferzusammensetzung siehe Anhang), der vor Ort mit Hilfe eines Tauchsieders auf 38 °C erwärmt und mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast wurde. Die Begasung diente zum einen der Sauerstoffversorgung des Gewebes, zum anderen der Konstanthaltung des pH-Wertes. Um die endogene Prostaglandinsynthese zu unterdrücken wurden dem Transportpuffer pro Liter 2 • 80 µl Indomethacin-Stammlösung (dies entspricht 2,8 µmol/l Puffer; genaue Zusammensetzung siehe Anhang) zugegeben. Bei der Präparation wurde so wenig Darm wie möglich angefasst, um keine Schäden zu setzen, die den Versuch hätten beeinflussen können. Das Darmstück, das durch das Festhalten bei der Präparation traumatisiert war, wurde großzügig entfernt und verworfen.

Der Transport des Darmes zum Institut für Veterinär-Physiologie (Oertzenweg 19b, 14163 Berlin) erfolgte direkt im Anschluss an die Präparation. Die Zeit zwischen der Präparation und dem Einbauen in die Ussing-Kammern betrug vom ersten bis zum letzten Epithelstück zwischen 30 und 60 Minuten.

3.4 Versuchsdurchführung mittels Ussing-Kammer-Methode

Für die Versuche wurden verschiedene Puffer und Lösungszusätze benötigt, deren genaue Zusammensetzung sowie Bezugsadressen dem Anhang zu entnehmen sind. Der genaue Versuchsablauf wird im Kapitel 3.4.2 beschrieben. Wenn nachfolgend von Kammern gesprochen wird, sind Ussing-Kammern gemeint.

Für die Versuche mittels Ussing-Kammer-Technik wurde der zuvor in zwei gleich lange Stücke geteilte Darm nach Ankunft im Labor auf zwei verschiedene Gefäße zum Spülen des Epithels aufgeteilt. Für die Ussing-Kammern wurden zwei verschiedene Puffer verwendet. Auf der mukosalen Seite wurde 10 ml Mannitpuffer, auf der serosalen Seite entsprechend 10 ml Glucosepuffer eingefüllt. Die Osmolarität betrug auf beiden Seiten 300 mosmol/l. Die Einstellung der Osmolarität erfolgte mittels eines Osmometers (Typ 5B, Nr. 9009010, Baujahr 1990 der Firma Roebeling Messtechnik GmbH, Berlin).

3.4.1 Die Ussing-Kammer-Methode

Die Anwendung der von Ussing und Zerahn (1951) entwickelten Ussing-Kammer-Methode ermöglicht die Messung aktiver Transportvorgänge über Epithelien. Die verwendeten Kammern, die in unserem Hause selbst angefertigt wurden, bestanden aus einer Plexiglasröhre (siehe Abbildung 9). Die linke bzw. mukosale Hälfte der Kammer war mit Nadeln zum Aufspießen des Gewebes versehen. Um Gewebeschäden zu minimieren, wurde sowohl auf der serosalen als auch auf der mukosalen Röhrenseite ein Gummiring unter das Epithel gelegt. Die freie Epithelfläche, die für die Puffer sowie die zugegebenen Lösungen erreichbar war, betrug $0,95 \text{ cm}^2$. Die Oberseiten der Röhren wiesen an beiden Hälften jeweils zwei Anschlüsse für Gummischläuche auf, über die die Kammern mit einem ummantelten Glassäulensystem verbunden wurden. Dieses an der Oberseite offene Säulensystem diente dem Einfüllen des entsprechenden Puffers sowie der Zugabe der Lösungen. An der Hinterseite der Glassäule ermöglichte auf beiden Seiten jeweils eine Glasfritte den Anschluss an das Begasungssystem. Verwendet wurde Carbogen (95 % O_2 und 5 % CO_2) zur Sauerstoffversorgung des Epithels sowie zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes. Die zwei Stege, welche die Ummantelung beider Säulen miteinander verbanden, wiesen an der Rückseite ebenfalls jeweils einen Anschluss auf, über welchen warmes Wasser aus einem Wasserbad zu- bzw. abgeführt wurde und eine konstante Temperatur der Lösungen von $38 \text{ }^\circ\text{C}$ gewährleistete. An der Vorderseite der oben erwähnten Plexiglasröhre befand sich rechts und links epithelnah ein kleines Bohrloch zum Eindrehen der Ag/AgCl-Brücken. Diese verbanden die Kammer zur Messung der Gewebepotentialdifferenz (PD_t) jeweils mit einer in eine KCl-Lösung (3 mmol/l KCl) eintauchenden Spannungselektrode. Die nahe Lage am eingespannten Epithel war notwendig, damit die Potentialdifferenz des Gewebes möglichst wenig vom Lösungswiderstand zwischen den Agarbrücken und dem Gewebe abgeschwächt wurde. An der Hinterseite der Plexiglasröhre befanden sich epithelfern ebenfalls rechts und links jeweils ein Bohrloch größeren Durchmessers. Hier wurden die Ag/AgCl-Brücken eingedreht, die die Kammer mit zwei in KCl-Lösung (3 mmol/l KCl) befindlichen Stromelektroden zur Applikation des Gegenstromes verbanden. Es war notwendig, die Ag/AgCl-Brücken möglichst weit vom Epithel entfernt zu positionieren,

um eine möglichst gleichmäßige Stromdichte am Gewebe zu erreichen. Die Spannungs- und Stromelektroden waren über ein Voltage/Current Clamp Interface mit dem PC verbunden. Der genaue Aufbau sowie das Prinzip der Messtechnik kann in der Arbeit von Scheffler (1984) nachgelesen werden.

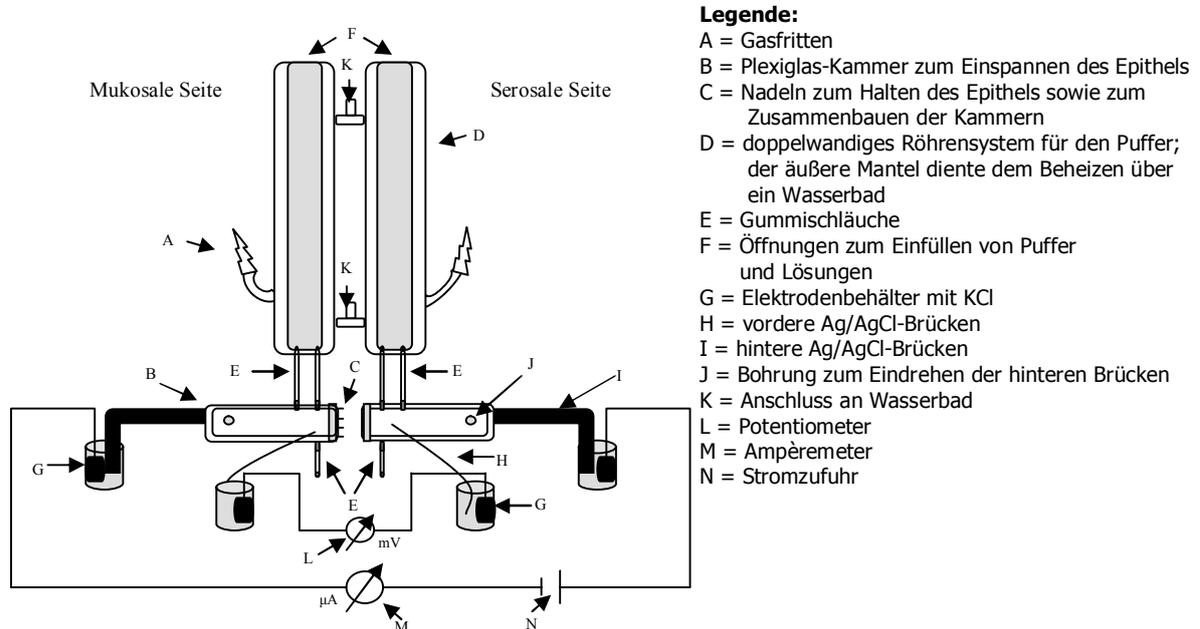


Abb. 9: Ussing-Kammer (eigene Darstellung)

Um die elektrischen Messungen in den durchgeführten Versuchen besser zu verstehen, wird nachfolgend das Messprinzip anhand der Unterlagen von Dipl. Ing. K. Mußler sowie Ussing und Zerahn (1951) erläutert. Die Anlage ermöglicht unabhängig voneinander die gleichzeitige Messung des Epithelwiderstands R_t , der Gewebeleitfähigkeit G_t , des Stroms sowie der Gewebepotentialdifferenz PD_t . Diese Parameter können numerisch oder grafisch dargestellt werden. Jede Kammer verfügt über eine eigene Stromquelle, die Stromimpulse über das in den Kammern befindliche Gewebe schickt. Der Datenaustausch mit der Computeranlage erfolgt alle sechs Sekunden. Bei der Versuchsdurchführung wurden zwei Verfahren zur Messung verwendet:

Open Circuit:

Hierbei ist das Epithel zwischen den Stromimpulsen 'Open Circuit'-Bedingungen ausgesetzt, d.h. der Stromkreis wird geöffnet.

Short Circuit:

Dies bezeichnet die Messdurchführung unter Kurzschlussbedingungen. Dazu wird extern Strom (Gegenstrom I_E) zugeführt und dadurch bewirkt, dass die Potentialdifferenz (U_E) auf 0 mV eingestellt werden kann ('geklemmt'). Dadurch werden passive Ionenströme sowie der

elektrische Gradient ausgeschaltet. Damit entspricht der Gegenstrom dem Ionenstrom durch das Epithel und kann messtechnisch erfasst werden. Die gemessenen Werte im Kurzschlussstrom (I_{sc}) entsprechen somit dem aktiven Transport von Ionen über das Epithel. Durch Einsatz gleicher Pufferlösungen serosal und mukosal kann ebenfalls der chemische Gradient ausgeschaltet werden. Damit kann also angenommen werden, dass es sich bei einem Nettotransport eines Ions um einen aktiven Transport handelt.

Da der Gegenstrom auch durch den Epithelwiderstand (R_E) fließt, baut sich gemäß dem Ohm'schen Gesetz eine Gegenspannung auf:

$$U_E = R_E \cdot I_E$$

U_E [Volt]= Potentialdifferenz

R_E [Ohm]= elektrischer Widerstand des Epithels

I_E [Ampère]= Gesamtstrom des Epithels

3.4.2 Versuchsablauf

Die Erfassung der Daten erfolgte mit dem mikrocomputerunterstützten Voltage Clamp-System (Einrichtung für Windows von Dipl.-Ing. K. Mußler, Aachen). Der Einsatz eines computergestützten Systems bot den Vorteil, dass die Bestimmungen von I_{sc} ($\mu A/cm^2$), R_t ($\Omega \cdot cm^2$) und PD_t (mV) nicht manuell und nacheinander erfolgen mussten, sondern das Programm diese Messungen bzw. Berechnungen simultan selbst durchführte. Dazu wurde alle sechs Sekunden ein Gegenstrom (Amplitude 100 μA , Impulsdauer 200 ms, bipolar) über das Epithel geschickt und die Messergebnisse automatisch am Bildschirm angezeigt und gespeichert. Pufferwechsel sowie die Zugabe einzelner Lösungen konnten direkt über das Setzen von Markern im Programm vermerkt werden.

Das Programm wurde ca. 30 Minuten vor Versuchsbeginn gestartet und danach bei allen Kammern mindestens dreimal eine Leermessung mit Mannitpuffer durchgeführt, um den Flüssigkeitswiderstand des Puffers zwischen den Brücken zur Messung der Potentialdifferenz bestimmen sowie um das Elektrodeneigenpotential korrigieren zu können.

Direkt nach Eintreffen im hauseigenen Labor wurden die beiden präparierten Darmstücke auf zwei mit Carbogen begaste Schalen mit konstant auf 38 °C erwärmtem Mannitpuffer (sog. Spülpuffer) aufgeteilt. Der Spülpuffer für die Untersuchung der Reaktion auf PGE_2 , Glucose und L-Glutamin enthielt 1,4 $\mu mol/l$ Indomethacin, um die endogene Prostaglandinproduktion zu unterdrücken. Dem Spülpuffer für die Versuche mit IL-1 α wurde kein Indomethacin zugesetzt. Von den Geweben wurden jeweils ca. 2 cm^2 große Stücke abgeschnitten, auf einem Silikonkissen befindlichen Stück Parafilm mit der mukosalen Seite nach oben

ausgebreitet und mit Insektennadeln fixiert. Der Parafilm diente dabei der Unterstützung beim Einbauen des Epithels in die insgesamt 24 Plexiglasröhren. Nachdem das Epithel auf die linke Röhrenhälfte, welche mit Nadeln zur Fixierung versehen war, aufgespannt wurde, wurde der Parafilm abgezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Kammerlumen vollständig bedeckt war. Anschließend wurde das rechte Kammerstück aufgesetzt und die Plexiglasröhre in die Aparatur eingesetzt. Zunächst konnte sich das Gewebe für ca. zehn Minuten an das neue Milieu unter 'Open Circuit'-Bedingungen adaptieren, bevor es kurzgeschlossen wurde. Beim Umschalten auf Kurzschlussstrombedingungen wurde die Stromquelle so geregelt, dass sich über den Geweben unter Berücksichtigung des Flüssigkeitswiderstandes und des Elektroden-Eigenpotentials die Spannung 0 mV einstellte (Dipl.-Ing. K. Mußler, Aachen). Abwechselnd wurde alle sechs Sekunden ein negativer oder positiver Strompuls für die Dauer von 200 ms (Amplitude 100 μA) über das Epithel geschickt und die Veränderungen der Gewebepotentialdifferenz (PD_t ; Angabe in mV), des Kurzschlussstroms (I_{sc} ; Angabe in $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) sowie des transepithelialen Widerstands (R_t ; Angabe in $\Omega \cdot \text{cm}^2$) kontinuierlich gemessen. Traten starke Schwankungen in diesen Werten auf, wurden die Kammern und Epithelien auf Defekte hin untersucht und diese behoben.

Zehn Minuten nach dem Kurzschließen wurden acht der 12 Kammern mit Indomethacin-Zusatz in den jeweiligen Puffern für die PGE_2 /Glucose-Versuche paarweise gruppiert. Dabei wurden je vier Kammern zusammengefasst, die einen annähernd gleichen Widerstand (R_t) aufwiesen, sowie vier Kammern, die einen ähnlichen Kurzschlussstrom (I_{sc}) zeigten. Die verbliebenen vier Kammern wurden zur Untersuchung der Reaktion auf L-Glutamin eingesetzt.

Bei den gruppierten Kammern für die PGE_2 /Glucose-Versuche erhielten jeweils paarweise eine Kammer aus der I_{sc} -Gruppe und eine Kammer aus der R_t -Gruppe serosal PGE_2 in aufsteigenden Konzentrationen (0,05 $\mu\text{mol/l}$, 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 0,5 $\mu\text{mol/l}$ und 3 $\mu\text{mol/l}$), deren I_{sc} , R_t und PD_t in den darauf folgenden 15 Minuten gemessen wurden. Auf eine Kontrollgruppe wurde aufgrund der geringen Anzahl der zur Verfügung stehenden Kammern verzichtet. Des Weiteren wurde durch die geringe Kammeranzahl das Epithel der PGE_2 -Versuche im weiteren Verlauf für die Reaktion auf Glucose verwendet. Dazu wurde 15 Minuten nach PGE_2 -Zugabe der Puffer abgelassen, die Kammern samt Epithel kurz gespült und neuer Puffer (10 ml Mannitpuffer mit 1,4 $\mu\text{l/l}$ Indomethacin mukosal, 10 ml Glucosepuffer mit 1,4 $\mu\text{l/l}$ Indomethacin serosal) eingefüllt. Es wurde darauf geachtet, dass die R_t , PD_t und I_{sc} -Werte wieder annähernd auf ihre Ausgangswerte vor PGE_2 -Zugabe zurückgingen. Anschließend wurde in aufsteigenden Konzentrationen Glucose (gelöst in Aqua bidest.) auf der mukosalen Seite zugegeben (0,5 mmol/l, 1 mmol/l, 4 mmol/l und 10 mmol/l). Um für einen osmotischen

Ausgleich zu sorgen wurde auf der serosalen Seite Mannit (gelöst in Aqua bidest.) in jeweils entsprechenden Konzentrationen simultan zugegeben. Nach 30 Minuten erfolgte ein Vitalitätstest mittels simultaner Zugabe von Theophyllin serosal und mukosal (8 mmol/l Puffer mit 1,4 $\mu\text{mol/l}$ Indomethacin-Zusatz). Theophyllin stimuliert den elektrogeneren Transport durch Erhöhung des Gehaltes an 'second-messengern' wie cAMP, cGMP und freien Ca^{2+} im Zytosol (Winckler et al., 1998) und bewirkt so einen messbaren Anstieg im I_{sc} .

Den verbliebenen vier Kammern wurde L-Glutamin in einer Konzentration von 12 mmol/l mukosal zugegeben und simultan serosal mit Mannit osmotisch ausgeglichen. Auch bei diesem Versuchsansatz erfolgte nach 30 Minuten ein Vitalitätstest mittels Theophyllin.

Vor der serosalen Zugabe von IL-1 α wurde bei allen 12 Kammern des Zytokinversuchs zum Ausspülen des endogen gebildeten Prostaglandins der Puffer beidseits abgelassen, die Epithelien mit den zugehörigen Puffern beidseits gespült und mit dem gleichen Puffer neu befüllt (10 ml Glucosepuffer serosal sowie 10 ml Mannitpuffer mukosal, jeweils ohne Indomethacinzusatz). Um die Effekte des Zytokins IL-1 α auf das Dünndarmepithel von Probiotika-supplementierten Ferkeln und den Kontrolltieren zu bestimmen, war es zunächst wichtig, die optimale Konzentration des einzusetzenden IL-1 α zu bestimmen. Dazu erfolgte zunächst bei 25 Versuchstieren nach einer Adaptationszeit von 20 Minuten in jeweils zwei Kammern die serosale Zugabe des Zytokins in aufsteigender Konzentration (0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml), wobei die beiden ersten Kammern als Kontrolle ohne Zusatz (0 ng/ml) verblieben. Nachdem zwei Stunden und 20 Minuten I_{sc} , R_t und PD_t gemessen wurde, wurde als Vitalitätstest auf beiden Seiten simultan Theophyllin (8 mmol/l Puffer ohne Indomethacin-Zusatz) zugegeben und nach weiteren 20 Minuten der Versuch beendet.

Bei den Versuchen mit aufsteigenden Konzentrationen von IL-1 α zeigten 10 ng/ml IL-1 α die höchsten Reaktionen des ΔI_{sc} , so dass diese Konzentration für die nachfolgenden 25 Versuche eingesetzt wurde. In Folgeversuchen sollte nun untersucht werden, ob die Wirkung des Zytokins IL-1 α auf den I_{sc} über Stimulierung des Natriumgekoppelten Glucosetransporters SGLT-1 vermittelt wird. Dazu wurde den in die Ussing-Kammern eingespannte Epithelien mukosal Phlorizin als spezifischer Hemmer des SGLT-1 zugegeben. Bei diesen Versuchen wurde beim Pufferwechsel, im Gegensatz zu den IL-1 α -Vorversuchen, auch auf der mukosalen Seite 10 ml Glucosepuffer statt Mannitpuffer zugegeben.

Zunächst wurde in Vorversuchen eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal verwendet, wobei wiederum eine Aufteilung der Kammern erfolgte. Drei Kammern erhielten lediglich 10 ng/ml IL-1 α serosal, drei Kammern erhielten zeitgleich serosal 10 ng/ml IL-1 α

sowie 100 µmol/l Phlorizin mukosal. Weitere drei Kammern blieben ohne jeglichen Zusatz (Kontrolle) und die restlichen drei Kammern erhielten lediglich 100 µmol/l Phlorizin mukosal. Da diese Versuche nur unzureichende Wirkungen von Phlorizin ergaben, wurde dieser Versuch unter den gleichen Bedingungen mit einer Konzentration von 500 µmol/l Phlorizin durchgeführt und als endgültige Konzentration für den Versuchsansatz ausgewählt. Blieb bei alleiniger Zugabe von IL-1α zum Epithel ein Anstieg im Strom aus, so wurde bei der Auswertung der Kurzschlussstrom auf Null gesetzt und so als nicht vorhandene Wirkung gewertet.

3.5 Lineare und nicht-lineare Regression, Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max}

Zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante K_m sowie der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} wurden sowohl die lineare als auch die nicht-lineare Regression angewendet.

3.5.1 Lineare Regression

Mittels der linearen Regression war es möglich, Startwerte für die nicht-lineare Regression zu ermitteln, um so genauere Werte für K_m und V_{max} zu erhalten.

Michaelis-Menten-Gleichung (Müller-Esterl et al., 2004):

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{(K_m + [S])} \quad (3.5.1a)$$

wobei

V_0 = Transportgeschwindigkeit/Reaktionsgeschwindigkeit
[transportierte Stoffmenge/Fläche und Zeit]

[S] = Substratkonzentration

V_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit [transportierte Stoffmenge/Fläche und Zeit]

K_m = Michaelis-Menten-Konstante

Mittels Linearisierungsverfahren nach Lineweaver-Burk kann die entstandene Hyperbel in eine Gerade umgewandelt werden. Zunächst wird der Kehrwertes der Michaelis-Menten-Gleichung gebildet (Müller-Esterl et al., 2004):

$$1/V = \frac{(K_m + [S])}{V_{max} [S]} \quad (3.5.1b)$$

$$1/V = \frac{K}{V_{max} [S]} + \frac{[S]}{V_{max} [S]} \quad (3.5.1c)$$

$$1/V = K_m/V_{\max} \cdot 1/[S] + 1/V_{\max} \quad (3.5.1d)$$

Anschließend wird die Gleichung in die Form einer Geradengleichung gebracht:

$$y = a \cdot x + b \quad (3.5.1.e)$$

$$a = K_m/V_{\max} = \text{Steigung}$$

$$x = 1/[S]$$

$$b = 1/V_{\max} = \text{Schnittpunkt mit y-Achse}$$

Nun wird $1/V$ gegen $1/[S]$ aufgetragen und ergibt eine Gerade mit dem y-Achsenabschnitt $1/V_{\max}$ und dem x-Achsenabschnitt $-1/K_m$ (Berg et al., 2003).

Wird durch diese Werte eine Regressionsgerade gelegt, so können die Werte für K_m und V_{\max} grafisch dargestellt werden.

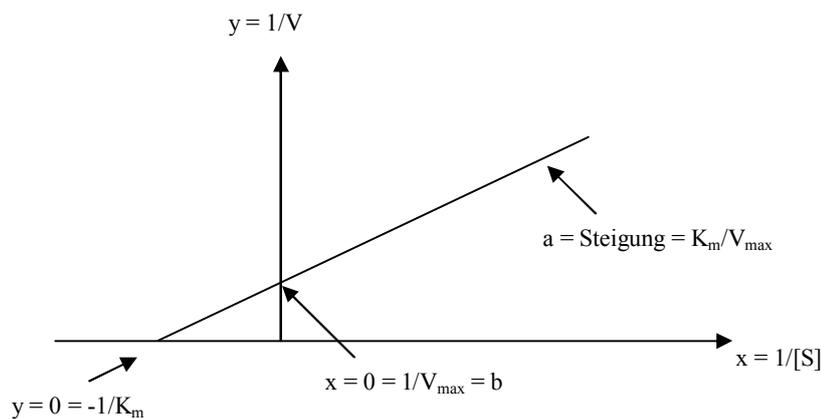


Abb. 10: Lineweaver-Burk-Diagramm (nach Müller-Esterl et al. (2004))

In Anlehnung an die Dissertation von Barbara Lorenz (2006) wird V_o experimentell über I_{sc} gemessen, beide Faktoren können mittels Faradayscher Gesetze ineinander umgerechnet werden. Aufgrund dessen kann V_o durch I_{sc} und V_{\max} durch $I_{sc\max}$ ersetzt werden:

$$a = \frac{K_m}{I_{sc\max}} \quad \Leftrightarrow \quad K_m = a \cdot I_{sc\max} \quad (3.5.1.f)$$

$$b = \frac{1}{I_{sc\max}} \quad \Leftrightarrow \quad I_{sc\max} = \frac{1}{b} \quad (3.5.1.g)$$

Die genaue Herleitung ist der Dissertation von Barbara Lorenz (2006) zu entnehmen.

3.5.2 Nicht-lineare Regression

Die Anwendung der nichtlinearen Regression ermöglicht durch die Verwendung von Startwerten die Ermittlung von genaueren Werten für K_m und V_{max} als es mit der linearen Regression möglich wäre (Motulsky und Christopoulos, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Startwerte mittels linearer Regression ermittelt und direkt in die Gleichung der nichtlinearen Regression eingesetzt (Ruckstuhl, 2006). Die mittels linearer Regression berechneten Startwerte sind im Anhang aufgeführt. Die Durchführung der nichtlinearen Regression erfolgte mittels SPSS® für Windows 12.0 und 17.0, die zugehörigen Syntaxen sind ebenfalls dem Anhang zu entnehmen. Hierbei wurden die in der Dissertation von Barbara Lorenz (2006) verwendeten Syntaxen übernommen.

Für die Berechnung mittels nichtlinearer Regression wird die Michaelis-Menten-Gleichung verwendet, in der V_0 durch I_{sc} und V_{max} durch I_{scmax} ersetzt wurde.

Die Umrechnung des maximalen Kurzschlussstromes I_{scmax} in die maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} erfolgt gemäß der Dissertation von Barbara Lorenz (2006) anhand nachfolgender Gleichung:

$$V_{max} [\mu\text{mol}/(\text{cm}^2\cdot\text{h})] = \frac{I_{scmax} [\mu\text{A}/\text{cm}^2]}{26,8013 [\mu\text{A}\cdot\text{h}/\mu\text{mol}]} \quad (3.5.2)$$

Die genaue Herleitung ist dem Anhang zu entnehmen.

3.6 Statistische Auswertung

Die Berechnungen zur Auswertung der Messungen wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel 2003® durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde nach Einlesen der in Excel 2003® erstellten Tabellen in SPSS® für Windows (Version 12) erstellt.

3.6.1 Kriterien zur Aufnahme in die Auswertung

Die mittels der Ussing-Kammer-Methode gewonnenen Daten wurden zur Sicherstellung der Auswertbarkeit verschiedenen Kriterien unterworfen.

Bei der makroskopischen Begutachtung des Epithels durften keine Veränderungen vorliegen, die die Versuchsdurchführung hätten negativ beeinflussen können, wie blutig infiltrierte Stellen, Peyer'sche Platten, Löcher im Epithel oder pathologische Auflagerungen. Es wurde darauf geachtet, dass das eingesetzte Epithel intakt und ohne sichtbare Veränderungen war. Darüber hinaus lieferte die im Anschluss an die Versuchsdurchführung durchgeführte Vitalitätsprobe mittels Theophyllin einen Hinweis darauf, ob das Epithel während des Versuches auch wirklich vital war. Dabei wurde ein Stromanstieg von

mindestens $15 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ innerhalb der ersten zehn Minuten nach Zugabe als Auswahlkriterium festgelegt. Epithelien, die unterhalb dieses Grenzwertes lagen und zusätzlich auf die vorangegangenen Zugaben nicht reagierten, wurden verworfen. Darüber hinaus wurde festgelegt, dass alle Epithelien, die in die Auswertung einbezogen wurden, einen transepithelialen Widerstand (R_t) von mindestens $15 \Omega \cdot \text{cm}^2$ aufweisen sollten.

Epithelien in den Versuchen mit IL-1 α mussten auf die mukosale Zugabe von Glucosepuffer mindestens mit einem Anstieg von $\Delta I_{sc} \geq 14 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ reagieren, um in die Auswertung aufgenommen zu werden. Teilweise wurden, unter anderem auch abhängig von der Dauer der Tötung der Versuchstiere, sehr hohe Stromwerte zu Beginn der Versuchsdurchführung von zum Teil über $100 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ gemessen. Die betroffenen Kammern wurden dann nicht ausgewertet. Bei den Versuchen mit Zugabe von Phlorizin wurde bei Ausbleiben des erwarteten Stromabfalls der ΔI_{sc} für die ersten zehn Minuten aus der Auswertung herausgenommen.

3.6.2 Auswertung und Berechnung der Daten

Die Wirkungen verschiedener Substanzen, die in den Versuchen eingesetzt wurden, wurden über unterschiedliche Zeitfenster beurteilt. Zur Bestimmung der Veränderung im Kurzschlussstrom ΔI_{sc} wurde von dem maximalen Stromanstieg bzw. Stromabfall innerhalb des jeweiligen betrachteten Zeitfensters der I_{sc} -Wert, der eine Minute vor Zugabe der jeweiligen Substanzen gemessen wurde, abgezogen.

Bei den Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen an Glucose sowie mit 12 mmol/l L-Glutamin wurden zunächst zwei Zeitfenster von fünf Minuten und 30 Minuten nach Zugabe gewählt. Bei der Auswertung zeigte sich jedoch, dass die maximalen Anstiege im I_{sc} bereits innerhalb der ersten fünf Minuten nach Zugabe zu verzeichnen waren, so dass bei der endgültigen Auswertung lediglich das Zeitfenster fünf Minuten nach Zugabe für die beiden genannten Substanzen gewählt wurde. Diese Vorgehensweise wird durch transportphysiologische Untersuchungen am Schweinedarm bestätigt (Puchal und Buddington, 1992). Bezüglich der Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen an PGE₂ wurde der Stromanstieg innerhalb von zehn Minuten nach Zugabe gemessen.

Da sich in vorausgehenden Versuchen bereits gezeigt hat, dass die maximale Interleukin-Wirkung 20 bis 30 Minuten nach Zugabe zu erwarten ist, wurden die Veränderungen im Kurzschlussstrom über 45 Minuten nach IL-1 α -Zugabe gemessen (Chiossone et al., 1990). Bei Verwendung von 10 ng/ml IL-1 α im Vergleich mit Phlorizin wurde sowohl der maximale Stromwert als auch der größte Abfall im I_{sc} innerhalb von zehn und 45 Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanz bestimmt. Bei den Ussing-Kammern für die Versuche, bei denen IL-

1 α und Phlorizin gleichzeitig zugesetzt wurden, wurde zur Feststellung der Wirkung des proinflammatorischen Interleukins die stärkste Hemmung durch Phlorizin innerhalb von zehn Minuten nach Phlorizin-Zugabe als Basis- bzw. Bezugswert für die Wirkung von IL-1 α festgesetzt und davon der maximale I_{sc} , der innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe gemessen wurde, zur Bestimmung des ΔI_{sc} abgezogen.

3.6.3 Datenanalyse

Zu Beginn der Datenanalyse wurde untersucht, ob die erhobenen Daten die Kriterien der Varianzhomogenität und Normalverteilung erfüllen. Diese Untersuchung wurde mittels des Programmes SPSS® 17 für Windows durchgeführt.

Als Test auf Gleichheit der Varianzen innerhalb der Fütterungsgruppen bezogen auf die jeweils verwendeten Konzentrationen und Altersgruppen wurde der Levene-Test eingesetzt. Hierbei erfolgt die Überprüfung der Nullhypothese, dass die Varianzen in der Grundgesamtheit in allen Gruppen identisch sei, wobei bei hohem Signifikanzwert ($p < 0,05$) diese Hypothese abzulehnen ist (Brosius, 2004). Zur Prüfung auf Normalverteilung der erhobenen Daten wurde der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest je Altersgruppe, Fütterung und Konzentration der zugegebenen Substanzen angewendet. Die Annahmen der Varianzhomogenität und Normalverteilung konnten anhand der Daten und aufgrund der in früheren Arbeiten gemachten Erfahrungen nicht abgelehnt werden (Lodemann et al., 2004; Lodemann et al., 2003).

Die statistischen Berechnungen von PGE₂, Glucose und L-Glutamin erfolgten gemäß Lodemann et al. (2004) mittels Varianzanalyse, wobei als feste Faktoren 'Fütterung', 'Alter' und, je nach Versuchsansatz, 'Konzentration der zugegebenen Substanz' gewählt wurden. Als Zufallsfaktor wurde 'Tier' gewählt (Lodemann et al., 2004). Wenn die Faktoren signifikante Effekte aufwiesen, wurde der Varianzanalyse posthoc ein Scheffé-Test angeschlossen. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ festgelegt.

Da pro Versuchstag parallel sowohl die Versuche für PGE₂, Glucose und L-Glutamin durchgeführt wurden, wurde je Tier das Epithel auf die einzelnen Kammern mit den verschiedenen Versuchsansätzen aufgeteilt, so dass pro Tier 12 Epithelstücke eingesetzt wurden. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden je nach Stichprobenumfang bei $n < 6$ die Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen dargestellt. Bei einer Stichprobe $n \geq 6$ wurden zum Teil auch Boxplots angefertigt.

Zur statistischen Berechnung der Versuche mit 10 ng/ml IL-1 α und 500 μ mol/l Phlorizin wurde der T-Test für gepaarte Stichproben angewendet, wobei Versuchspaare gebildet

wurden. Aufgrund der geringen Stichprobe und der ähnlichen Reaktion von Tieren des 14. und 28. LT sowie des 31. und 35. LT wurden diese zu je einer Altersgruppe zusammengefasst. Da zwischen den Fütterungsgruppen kein Unterschied auftrat, wurde die weitere Ergebnisauswertung fütterungsunabhängig durchgeführt. Für die Auswertung wurden die Mittelwertdifferenzen mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen berechnet und zwischen den Altersgruppen sowie altersunabhängig für die jeweiligen Versuchspaare verglichen. Dabei wurden die minimalen ΔI_{sc} innerhalb von zehn Minuten nach Zugabe sowie die maximalen ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanzen bestimmt.

3.6.4 Kinetik

Bezüglich der Untersuchung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m und der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} auf Unterschiede zwischen den Fütterungs- und Altersgruppen wurde das in der Dissertation von Barbara Lorenz (2006) eingesetzte Verfahren angewendet.

Die errechneten Werte werden für die einzelnen K_m - und V_{max} -Werte mit ihren 95%-Konfidenzintervallen tabellarisch aufgeführt.

Die Ergebnisse der nicht-linearen Regression der Einzeltiere wurden zur Prüfung der bezüglich K_m und V_{max} getroffenen Hypothesen der Varianzanalyse unterzogen sowie für die Korrelation von K_m und V_{max} zugrunde gelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Beeinflussung des I_{sc} im mittleren Jejunum von Schweinen durch die Zugabe von PGE_2 , Glucose und L-Glutamin

Zur Darstellung der Ergebnisse aus den Absorptions- und Sekretionsversuchen, in denen die Epithelien mit PGE_2 , Glucose sowie L-Glutamin stimuliert werden, finden Mittelwerte \pm Standardabweichung sowie Boxplots mit Medianen und Interquartilsdistanzen Verwendung. Nachfolgend werden zunächst für die jeweiligen Fütterungsgruppen altersabhängig die Konzentrationseffekte anhand der Mittelwerte \pm Standardabweichung des ΔI_{sc} dargestellt. Anschließend folgt eine altersabhängige Betrachtung der einzelnen Konzentrationen für PGE_2 und Glucose. Für die einzelnen Lebensstage wird die Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} mit Hilfe von Boxplots dargestellt.

Untersucht werden die Effekte der Faktoren 'Fütterung' (Probiotika oder Kontrolle), 'Konzentration', 'Alter' (Lebensstage) und 'Tier' (gemeint ist hiermit die Beeinflussung der Ergebnisse durch das individuelle Einzeltier).

4.1.1 Reaktion des Kurzschlussstroms auf serosale Zugaben steigender PGE_2 -Konzentrationen

Tabelle 7 zeigt, aufgeteilt nach Fütterungs- und Altersgruppen, die Mittelwerte und Standardabweichungen des ΔI_{sc} als Reaktion auf ansteigende PGE_2 -Konzentrationen.

Tabelle 7: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] nach serosaler Zugabe von PGE_2 in aufsteigenden Konzentrationen; aufgeschlüsselt nach Altersgruppe, Konzentrationsstufe und Fütterungsgruppe; Jejunumepithel des Schweines (n = Anzahl der Epithelien; N = Anzahl der Tiere)

Alter	14 Tage		28 Tage		31 Tage		35 Tage		56 Tage	
	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415
0,05	53,00 \pm 28,61 (n = 6, N = 4)	48,00 \pm 34,42 (n = 6, N = 4)	47,86 \pm 34,11 (n = 7, N = 4)	25,88 \pm 23,12 (n = 8, N = 4)	60,33 \pm 35,55 (n = 6, N = 4)	62,63 \pm 24,50 (n = 8, N = 4)	54,22 \pm 38,53 (n = 9, N = 5)	51,11 \pm 16,21 (n = 9, N = 5)	41,78 \pm 18,31 (n = 9, N = 5)	38,88 \pm 24,75 (n = 8, N = 5)
0,10	55,29 \pm 35,15 (n = 7, N = 4)	55,00 \pm 29,20 (n = 6, N = 4)	60,88 \pm 26,08 (n = 8, N = 4)	42,63 \pm 29,92 (n = 8, N = 4)	85,29 \pm 51,55 (n = 7, N = 4)	93,88 \pm 31,74 (n = 8, N = 4)	55,11 \pm 27,72 (n = 9, N = 5)	66,56 \pm 18,94 (n = 9, N = 5)	59,30 \pm 32,77 (n = 10, N = 5)	65,89 \pm 42,14 (n = 9, N = 5)
0,50	62,83 \pm 31,38 (n = 6, N = 4)	50,14 \pm 32,01 (n = 7, N = 4)	59,38 \pm 19,10 (n = 8, N = 4)	45,43 \pm 31,63 (n = 7, N = 4)	96,00 \pm 34,00 (n = 7, N = 4)	130,75 \pm 26,49 (n = 10, N = 4)	91,22 \pm 21,86 (n = 9, N = 5)	105,30 \pm 32,46 (n = 10, N = 5)	89,70 \pm 37,85 (n = 10, N = 5)	65,67 \pm 36,46 (n = 9, N = 5)
3,00	71,8 \pm 27,44 (n = 5, N = 3)	66,17 \pm 43,92 (n = 6, N = 4)	73,50 \pm 26,21 (n = 8, N = 4)	61,75 \pm 30,63 (n = 8, N = 4)	156,67 \pm 47,40 (n = 6, N = 4)	151,83 \pm 54,79 (n = 6, N = 4)	140,20 \pm 59,89 (n = 10, N = 5)	122,80 \pm 27,97 (n = 10, N = 5)	103,50 \pm 39,33 (n = 10, N = 5)	73,00 \pm 46,33 (n = 9, N = 5)

Der mittlere ΔI_{sc} der Kontroll-Gruppe liegt bei 70 % der Vergleiche über denen der entsprechenden Alters- und Konzentrationsgruppe der Probiotika-Gruppe. Am 14. und 28. LT liegen die mittleren ΔI_{sc} der Probiotika-Gruppe bei allen Konzentrationen unter den Werten der Kontroll-Gruppe.

Der Vergleich der Fütterungsgruppen zeigt bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PGE₂ für die Probiotika-Gruppe in allen Altersgruppen niedrigere Werte im mittleren ΔI_{sc} . Für die Konzentrationen $0,05 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ weist die Probiotika-Gruppe am 14. LT und 28. LT niedrigere Werte bezogen auf den mittleren ΔI_{sc} im Vergleich zur Kontroll-Gruppe auf. Darüber hinaus gibt es keine konsistenten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Bei Betrachtung der Altersgruppen ist ein Anstieg des mittleren ΔI_{sc} am 31. LT für die Konzentrationen $\geq 0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ deutlich zu erkennen, der bis zum 56. LT in allen Konzentrationen wieder abnimmt. Mit Anstieg der einzelnen PGE₂-Konzentrationen zeigt sich innerhalb der einzelnen Altersgruppen eine Zunahme des mittleren ΔI_{sc} .

In den Abbildungen 11 und 12 sind entsprechend der Tabelle 7 die Verteilungen des ΔI_{sc} bei serosaler Zugabe steigender PGE₂-Konzentrationen aufgeteilt nach Alters- und Fütterungsgruppe dargestellt. Grundsätzlich ist in den vorliegenden Versuchen der Effekt der Faktoren 'Tier', 'Konzentration' und 'Alter' auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant. Die Fütterungsgruppen weisen hingegen keine signifikanten Unterschiede auf.

PGE₂, Kontrolle

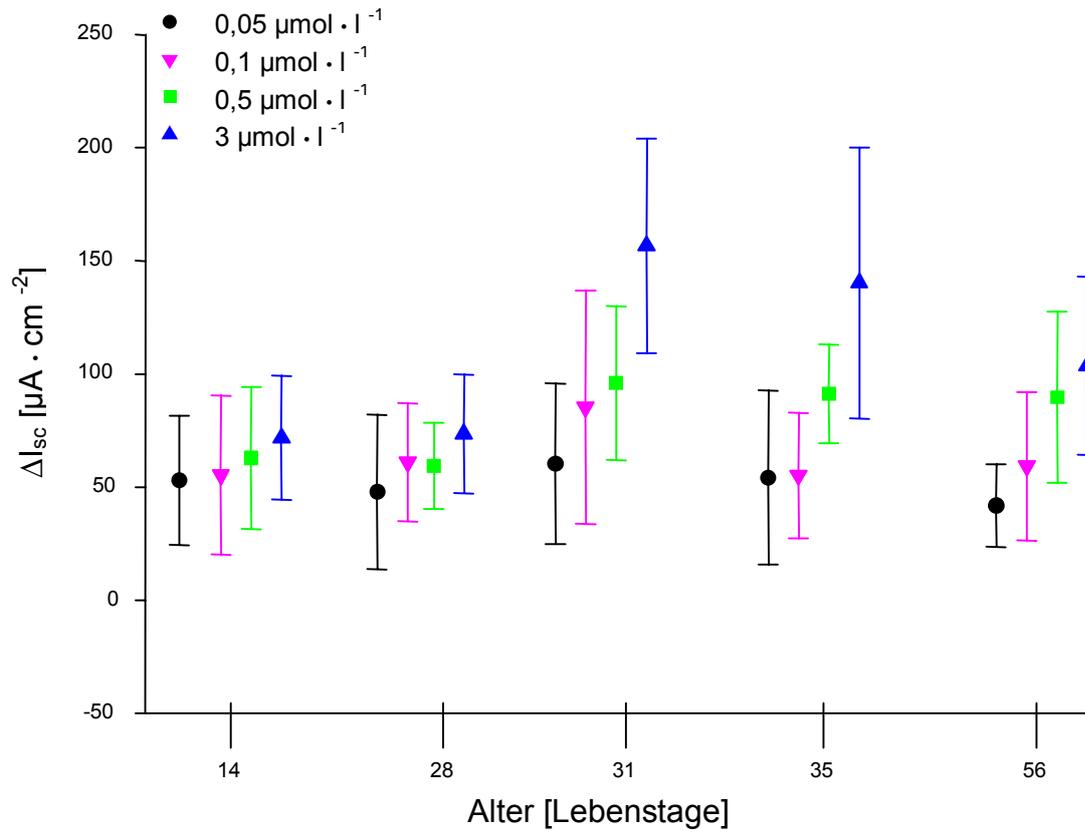


Abb. 11: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Altersgruppen als Antwort auf steigende Konzentrationen von serosal zugegebenem PGE₂; Kontroll-Gruppe [Mittelwerte \pm Standardabweichungen; zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7]

Grundsätzlich lässt sich bei den Kontrolltieren an den jeweiligen Lebenstagen ein Konzentrationseffekt erkennen, der vor allem ab dem 31. LT eine deutliche Zunahme im ΔI_{sc} mit steigender PGE₂-Konzentration zeigt.

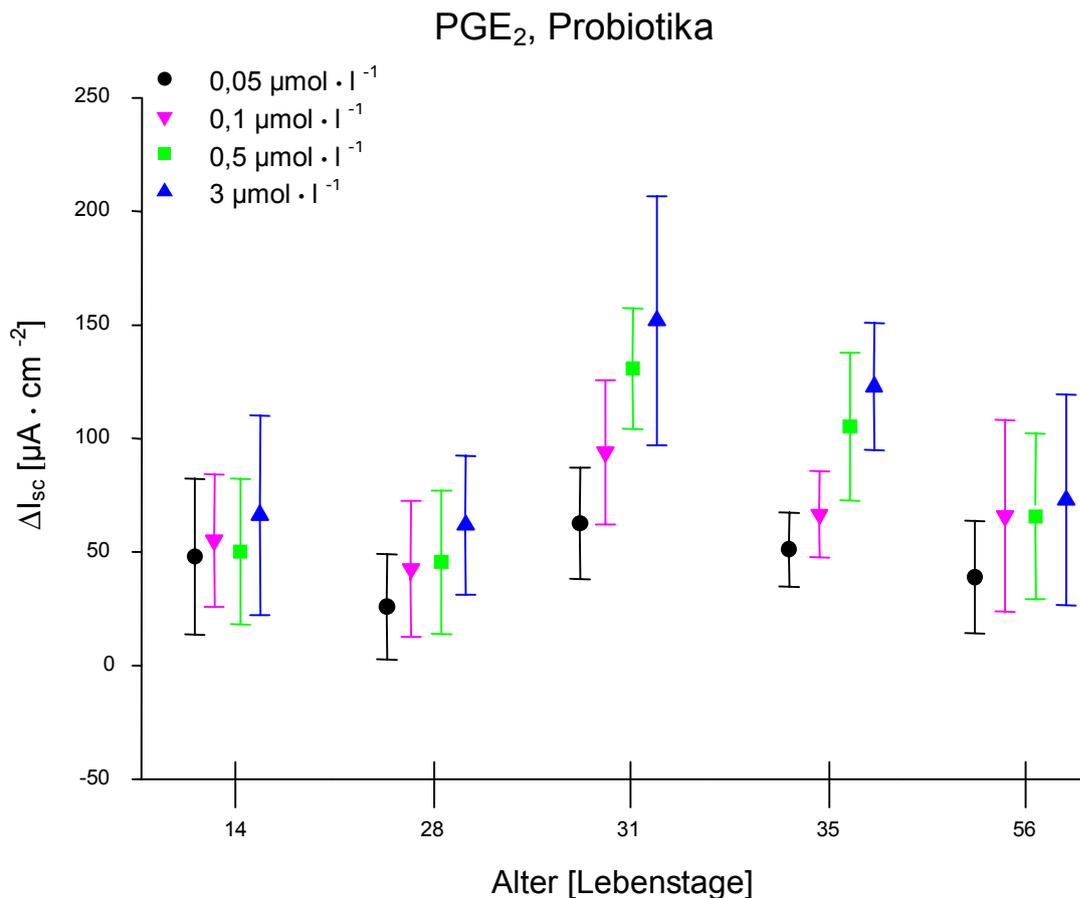


Abb. 12: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Altersgruppen als Antwort auf steigende Konzentrationen von serosal zugegebenem PGE₂; Probiotika-Gruppe [Mittelwerte \pm Standardabweichungen; zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7]

Hierbei zeigen sich bei der Probiotika-Gruppe für die Altersgruppen 14. LT, 28. LT und 56. LT niedrigere Anstiege im mittleren ΔI_{sc} als für die Kontroll-Gruppe. Die Altersgruppen 31. LT und 35. LT lassen hingegen keinen deutlichen Unterschied erkennen.

Der Vergleich der Alters- und Fütterungsgruppen innerhalb der einzelnen PGE₂-Konzentrationen wird in den Abbildungen 13 bis 16 dargestellt. Signifikante Unterschiede werden durch ungleiche Buchstaben hervorgehoben (Post-Hoc-Test nach Scheffé).

PGE₂, 0,05 µmol · l⁻¹

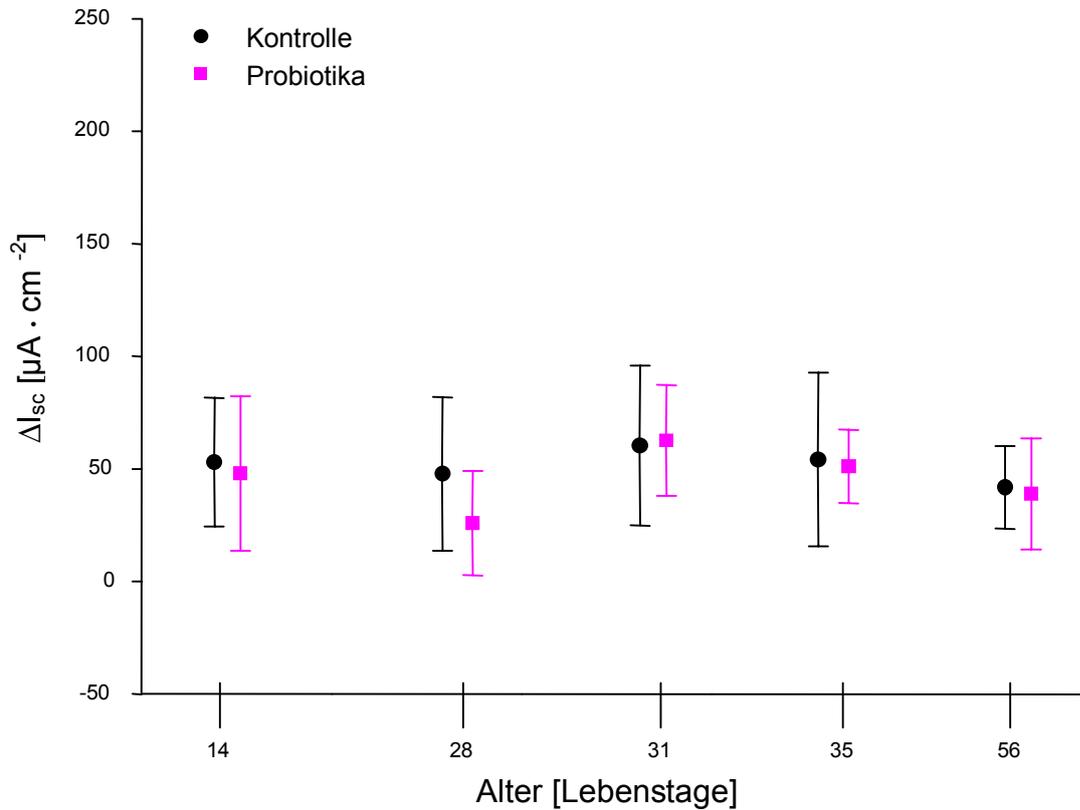


Abb. 13: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die serosale Zugabe von $0,05 \mu mol \cdot l^{-1}$ PGE₂ [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$]

Die Reaktion der Jejunumepithelien auf die serosale Zugabe von $0,05 \mu mol \cdot l^{-1}$ PGE₂ ist zwischen den Altersgruppen innerhalb beider Fütterungsgruppen relativ einheitlich. Auch zwischen den Fütterungsgruppen lässt sich kein deutlicher Unterschied erkennen. Lediglich die Altersgruppe des 28. LT weist für die Probiotika-Gruppe einen niedrigeren mittleren ΔI_{sc} auf.

PGE₂, 0,1 μmol · l⁻¹

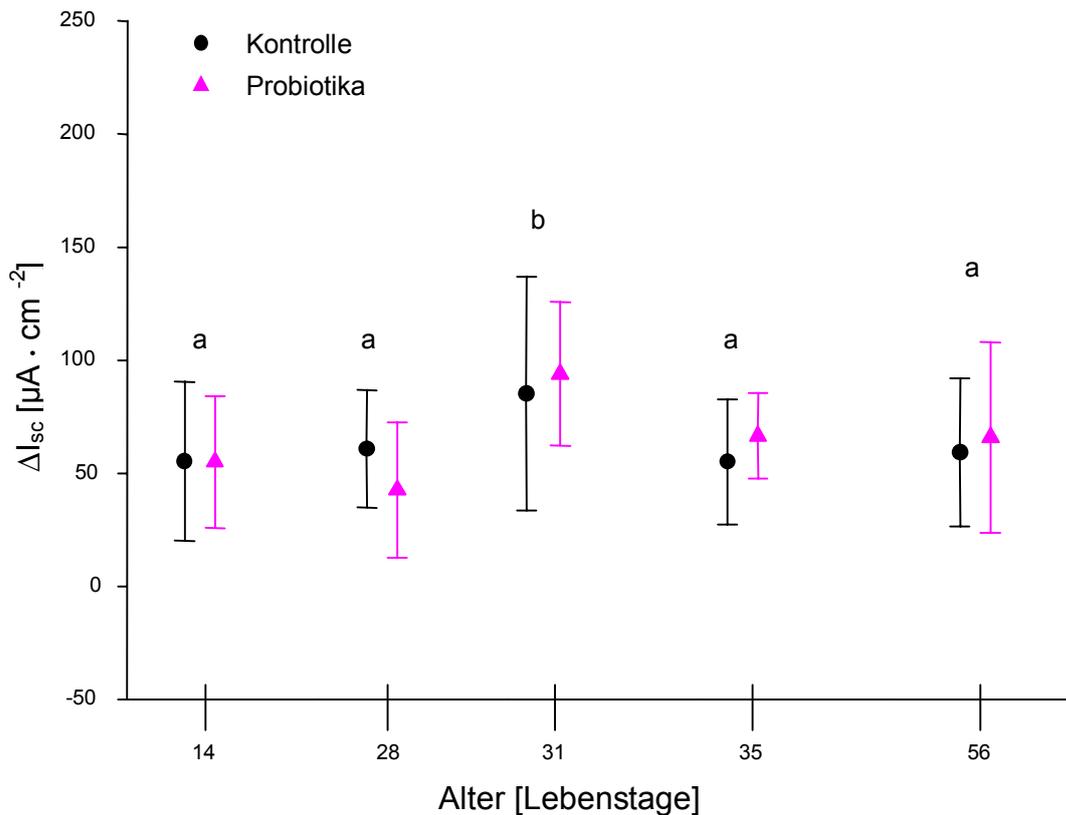


Abb. 14: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die serosale Zugabe von $0,1 \mu mol \cdot l^{-1}$ PGE₂ [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$]

Bei der vergleichenden Betrachtung der Altersgruppen in Abbildung 14 weist die Altersklasse des 31. LT signifikant höhere mittlere ΔI_{sc} -Werte auf als die anderen Altersgruppen. Die Zugabe von $0,1 \mu mol \cdot l^{-1}$ zeigt zwischen den Fütterungsgruppen keinen signifikanten Unterschied.

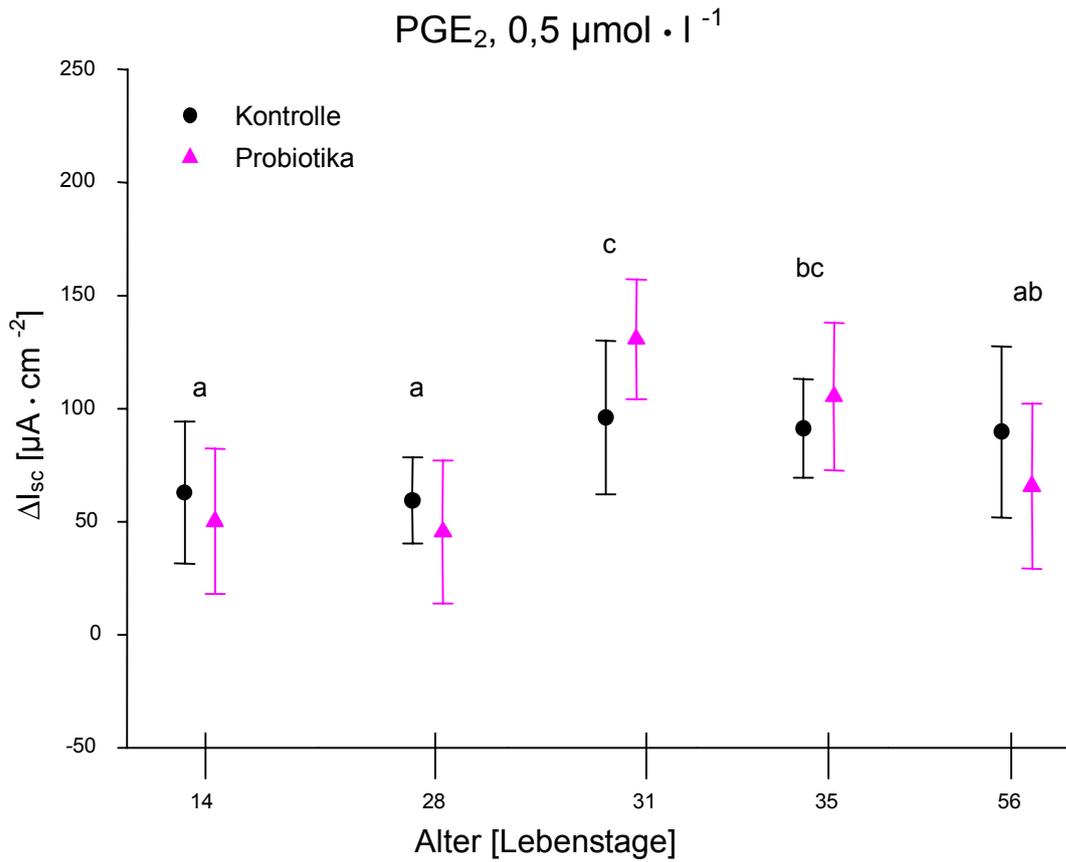


Abb. 15: ΔI_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die serosale Zugabe von $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PGE_2 [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$]

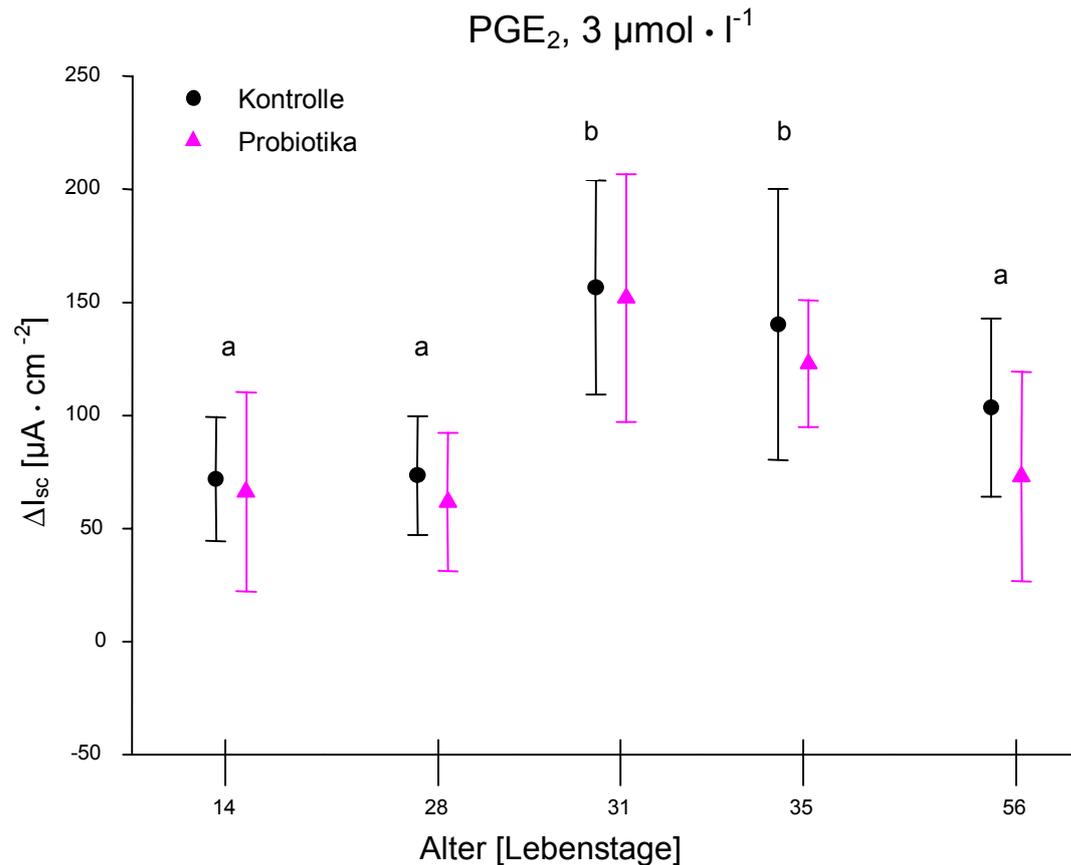


Abb. 16: ΔI_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die serosale Zugabe von $3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PGE_2 [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$]

In den Abbildungen 15 und 16 unterscheiden sich die mittleren ΔI_{sc} -Werte der Altersgruppen 31. LT und 35. LT signifikant von den anderen Altersgruppen. Bei Betrachtung aller Altersgruppen zeigt sich eine ähnliche Reaktion auf die jeweiligen PGE_2 -Konzentrationen. Dabei zeigen Tiere im Alter von 14 und 28 Lebenstagen annähernd gleiche Reaktionen auf PGE_2 . Mit dem 31. LT erfolgt bei beiden Konzentrationen ein signifikanter Anstieg des mittleren ΔI_{sc} , der mit dem 35. und 56. LT wieder abfällt. Eine Betrachtung der Fütterungseinflüsse zeigt bei einer Konzentration von $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PGE_2 , dass die mittleren ΔI_{sc} der Probiotika-Gruppe bei der Altersgruppe 31. und 35. LT oberhalb der Kontroll-Gruppe liegen. Für die Versuchsreihe mit $3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PGE_2 liegen zwischen den Fütterungsgruppen keine deutlichen Unterschiede vor. Allerdings zeigt die Altersgruppe 56. LT bei der Probiotika-Gruppe einen niedrigeren Anstieg im mittleren ΔI_{sc} als die Kontrolle.

Die nachfolgenden Boxplots zeigen die Dosis-Wirkungs-Beziehungen ansteigender PGE₂-Konzentrationen innerhalb der einzelnen Altersgruppen.

14. LT

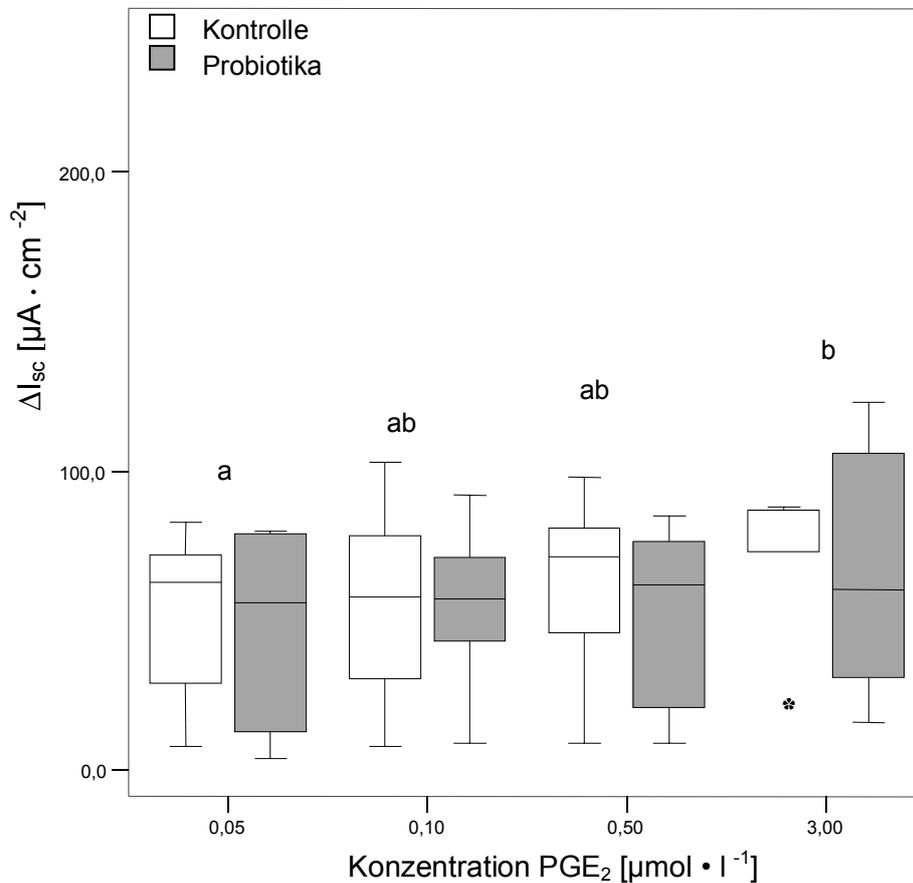


Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 14. Lebenstag nach serosaler Zugabe von PGE₂ zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot¹]

¹ Sternchen stellen extreme Werte, Kreise Ausreißer dar

Ein Konzentrationsanstieg innerhalb der Altersgruppe 14. LT zeigt keinen deutlichen Anstieg des Medians. Der Median der ΔI_{sc} ist bei der Probiotika-Gruppe bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ deutlich niedriger als bei der Kontrolle. Zu beachten ist, dass die Probiotika-Gruppe bei dieser Konzentration eine große Streuung im mittleren ΔI_{sc} aufweist.

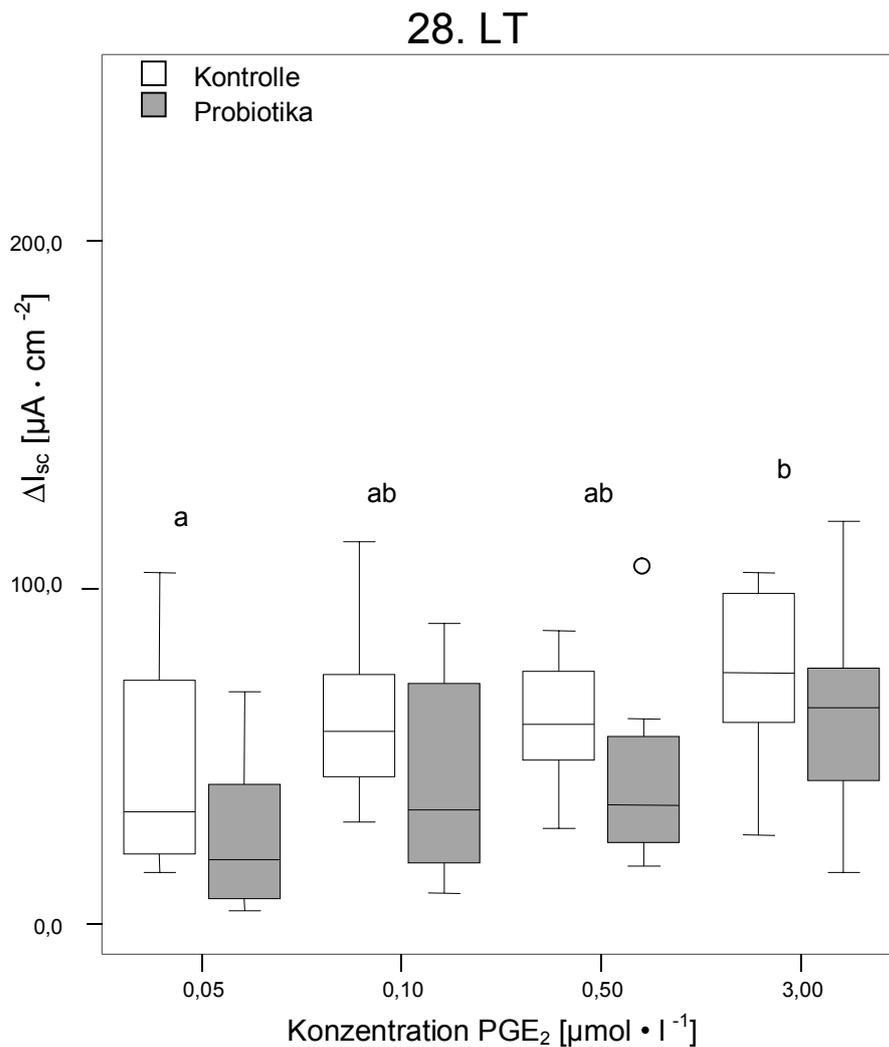


Abb. 18: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 28. Lebenstag nach serosaler Zugabe von PGE₂ zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot¹]

In der Altersgruppe 28. LT wird, mit Ausnahme der Konzentrationen $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$, eine zunehmende Reaktion der Epithelien auf ansteigende PGE₂-Konzentrationen deutlich. In Abbildung 18 weisen die Mediane von ΔI_{sc} der Kontroll-Gruppe bei allen Konzentrationen deutlich höhere Werte auf als in der Probiotika-Gruppe. Auch in

diesem Fall ist die hohe Streuung der einzelnen Boxplots zu beachten. Der genannte Dosis-Wirkungs-Effekt ist innerhalb beider Fütterungsgruppen zu erkennen.

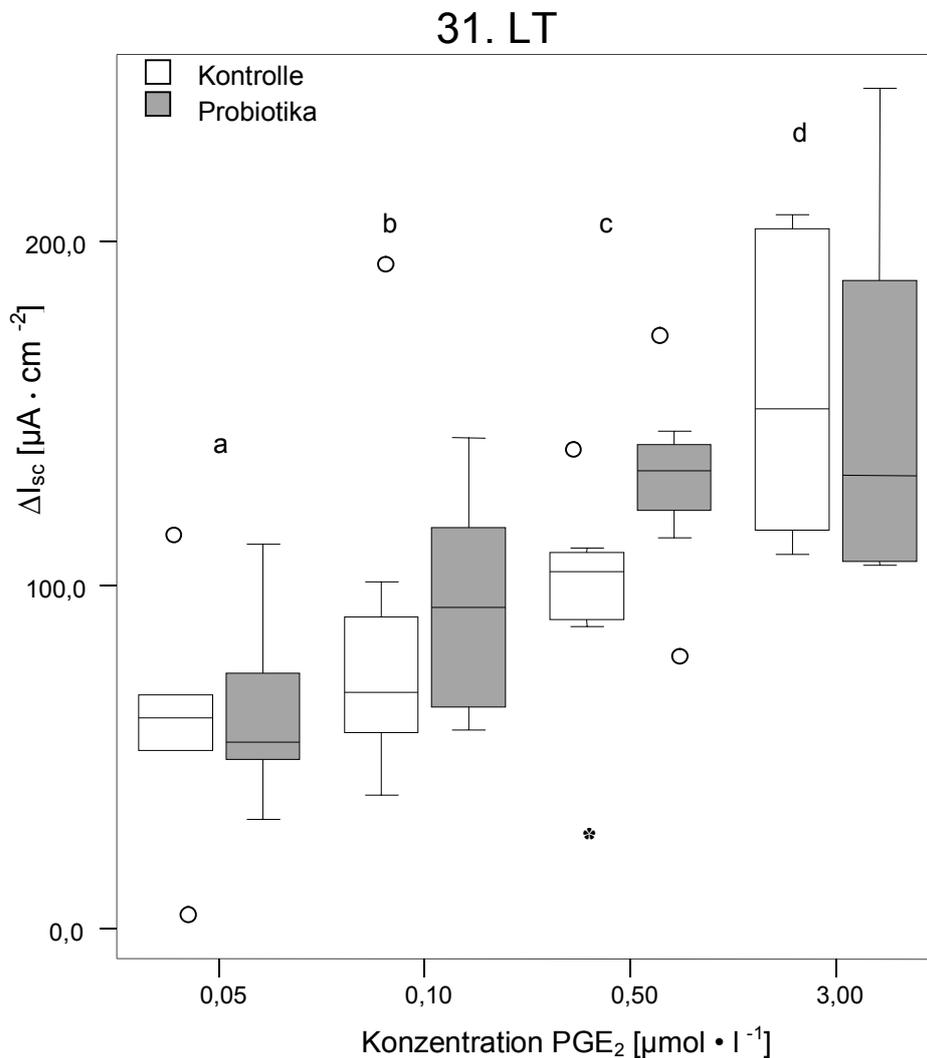


Abb. 19: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 31. Lebenstag nach serosaler Zugabe von PGE_2 zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot¹]

Beide Fütterungsgruppen zeigen mit Zunahme der PGE_2 -Konzentration einen Anstieg im Median. Bei einer Konzentration von $0,10 \mu mol \cdot l^{-1}$ und $0,50 \mu mol \cdot l^{-1}$ liegen die Mediane der Probiotika-Gruppe deutlich über den Medianen der Kontroll-Gruppe.

35. LT

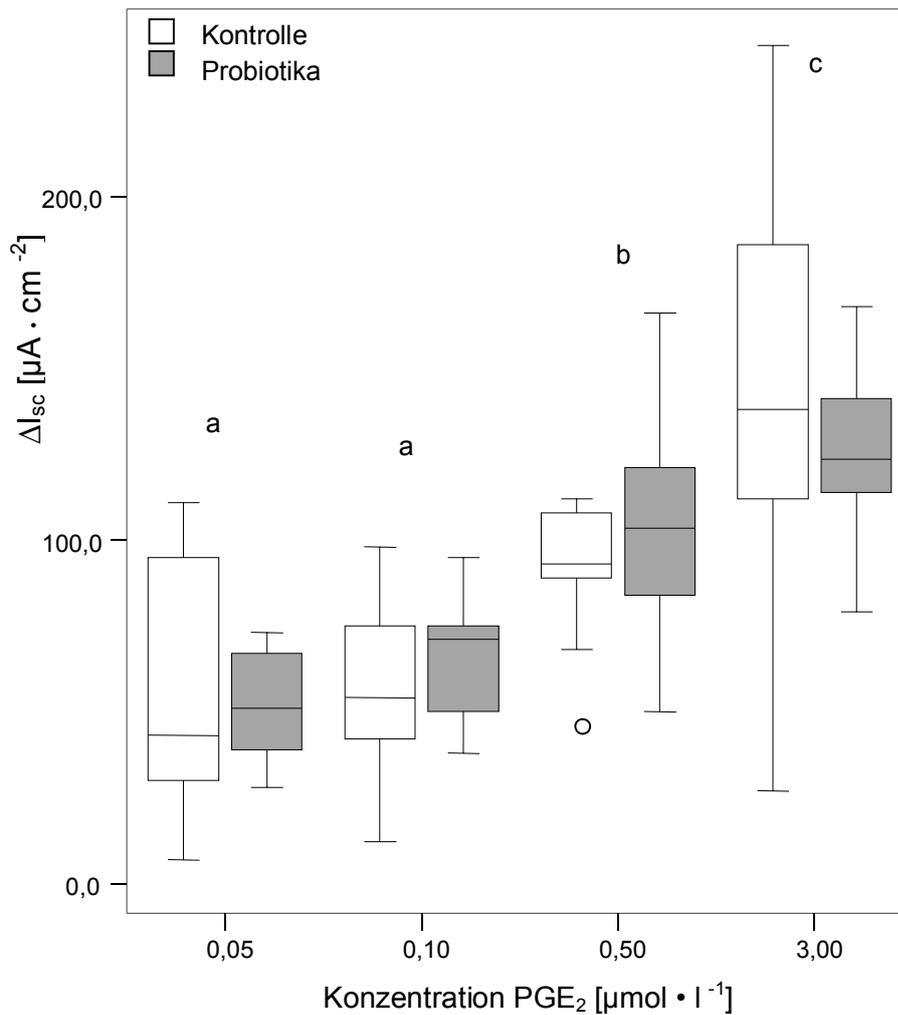


Abb. 20: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 35. Lebenstag nach serosaler Zugabe von PGE₂ zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot¹]

Abbildung 20 zeigt bei Zugabe aufsteigender PGE₂-Konzentrationen einen Anstieg der ΔI_{sc} -Medianen. Am 35. LT liegt der Median des ΔI_{sc} bei der Probiotika-Gruppe mit Ausnahme der Konzentration von 3 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ oberhalb des Medians der Kontroll-Gruppe.

56. LT

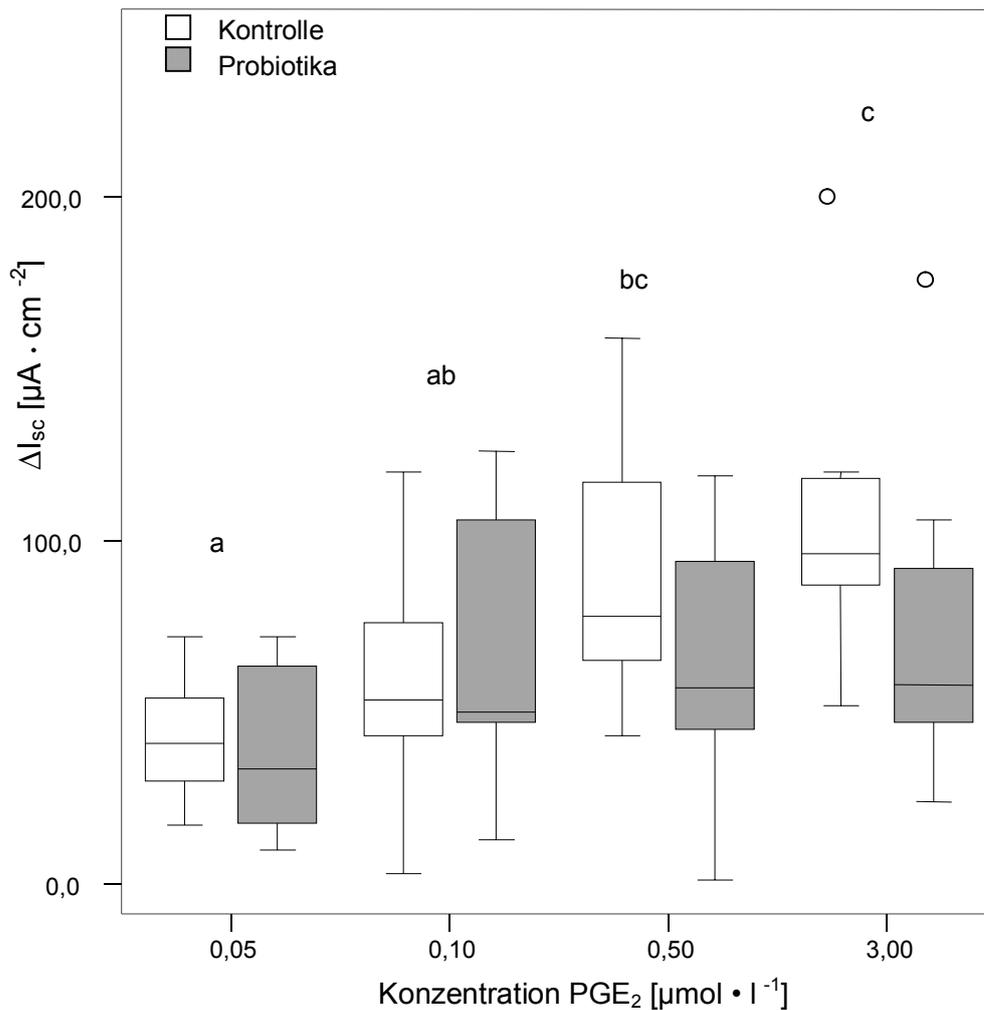


Abb. 21: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 56. Lebenstag nach serosaler Zugabe von PGE_2 zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 7; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot¹]

Der Median der ΔI_{sc} liegt bei beiden Fütterungsgruppen am 56. LT bei den PGE_2 -Konzentrationen $0,05 \mu mol \cdot l^{-1}$ und $0,1 \mu mol \cdot l^{-1}$ dicht beieinander. Bei den anderen PGE_2 -Konzentrationen liegen die ΔI_{sc} der Kontroll-Gruppe höher als in der Probiotika-Gruppe. Für die Probiotika-Gruppe ist bei einer Konzentrationserhöhung von $0,5 \mu mol \cdot l^{-1}$ auf $3 \mu mol \cdot l^{-1}$ PGE_2 , im Gegensatz zur Kontroll-Gruppe, kein deutlicher Anstieg im mittleren ΔI_{sc} zu erkennen.

Zusammenfassend zeigen sich vor allem am 31. und zum Teil auch am 35. LT bei einer fütterungsabhängigen Betrachtung der aufsteigenden PGE_2 -Konzentrationen signifikant höhere ΔI_{sc} im Vergleich zu den anderen Altersgruppen.

Beim fütterungs- und altersunabhängigen Vergleich der einzelnen PGE₂-Konzentrationen zeigen die Post-Hoc-Tests nach Scheffé zwischen allen Konzentrationen signifikante Unterschiede. Darüber hinaus können hierbei auch zwischen allen Altersgruppen mit Ausnahme zwischen dem 14., 28. und 56. LT signifikante Unterschiede nachgewiesen werden. Die Fütterungsgruppen selbst weisen keinen konsistenten Unterschied auf.

4.1.2 Reaktion des Kurzschlussstroms auf mukosale Zugaben aufsteigender Glucosekonzentrationen

Wie für die verschiedenen Konzentrationen PGE₂ erfolgt in gleicher Weise die tabellarische sowie auch die grafische Darstellung von ΔI_{sc} als Antwort auf steigende Glucosekonzentrationen. Signifikante Unterschiede werden in den zugehörigen Tabellen und Abbildungen gekennzeichnet.

Tabelle 8: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] nach mukosaler Zugabe von Glucose in aufsteigenden Konzentrationen; aufgeschlüsselt nach Altersgruppe, Konzentrationsstufe und Fütterungsgruppe; Jejunumepithel des Schweines (n = Anzahl der Epithelien; N = Anzahl der Tiere)

Alter	14 Tage		28 Tage		31 Tage		35 Tage		56 Tage	
	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415
0,5	7,25 \pm 2,06 (n = 4, N = 2)	5,25 \pm 3,40 (n = 4, N = 2)	11,67 \pm 8,55 (n = 6, N = 3)	6,33 \pm 6,92 (n = 6, N = 4)	25,00 \pm 19,92 (n = 4, N = 3)	27,63 \pm 10,23 (n = 8, N = 4)	27,22 \pm 16,52 (n = 9, N = 5)	27,56 \pm 11,27 (n = 9, N = 5)	13,00 \pm 9,67 (n = 9, N = 5)	8,14 \pm 7,31 (n = 7, N = 5)
1	9,60 \pm 1,14 (n = 5, N = 3)	9,67 \pm 5,86 (n = 3, N = 2)	13,63 \pm 14,23 (n = 8, N = 4)	10,17 \pm 12,11 (n = 6, N = 4)	48,20 \pm 40,92 (n = 5, N = 4)	38,29 \pm 23,41 (n = 7, N = 4)	32,11 \pm 20,99 (n = 9, N = 5)	48,56 \pm 18,93 (N = 9, N = 5)	17,44 \pm 15,94 (n = 9, N = 5)	17,11 \pm 15,81 (n = 9, N = 5)
4	11,33 \pm 3,51 (n = 3, N = 2)	27,50 \pm 14,85 (n = 2, N = 1)	20,14 \pm 22,48 (n = 7, N = 4)	12,67 \pm 16,65 (n = 6, N = 4)	127,60 \pm 70,53 (n = 5, N = 3)	99,50 \pm 21,72 (n = 8, N = 4)	88,00 \pm 31,39 (n = 10, N = 5)	99,40 \pm 28,19 (n = 10, N = 5)	42,22 \pm 38,17 (n = 9, N = 5)	43,38 \pm 42,36 (n = 9, N = 5)
10	12,40 \pm 8,50 (n = 5, N = 3)	8,00 \pm 4,40 (n = 4, N = 1)	13,43 \pm 9,00 (n = 7, N = 4)	14,86 \pm 10,26 (n = 7, N = 4)	117,00 \pm 72,25 (n = 4, N = 3)	131,71 \pm 59,85 (n = 7, N = 4)	117,90 \pm 43,57 (n = 10, N = 5)	123,60 \pm 23,11 (n = 10, N = 5)	63,20 \pm 50,33 (n = 10, N = 5)	40,78 \pm 32,59 (n = 9, N = 5)

Bezüglich des mittleren ΔI_{sc} besteht zwischen Kontroll- und Probiotika-Gruppe kein signifikanter Unterschied. Bei Betrachtung der Standardabweichungen zeigen sich bei 75 % der Kontroll-Gruppe höhere Werte als bei der Probiotika-Gruppe.

In den Versuchen sind die Effekte der Faktoren 'Alter', 'Tier' und 'Glucosekonzentration' auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant. Der Faktor 'Fütterung' zeigt bezüglich des mittleren ΔI_{sc} jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Die Abbildungen 22 und 23 zeigen die Dosis-Wirkungskurven aufgeteilt nach Alters- und Fütterungsgruppen gemäß Tabelle 8.

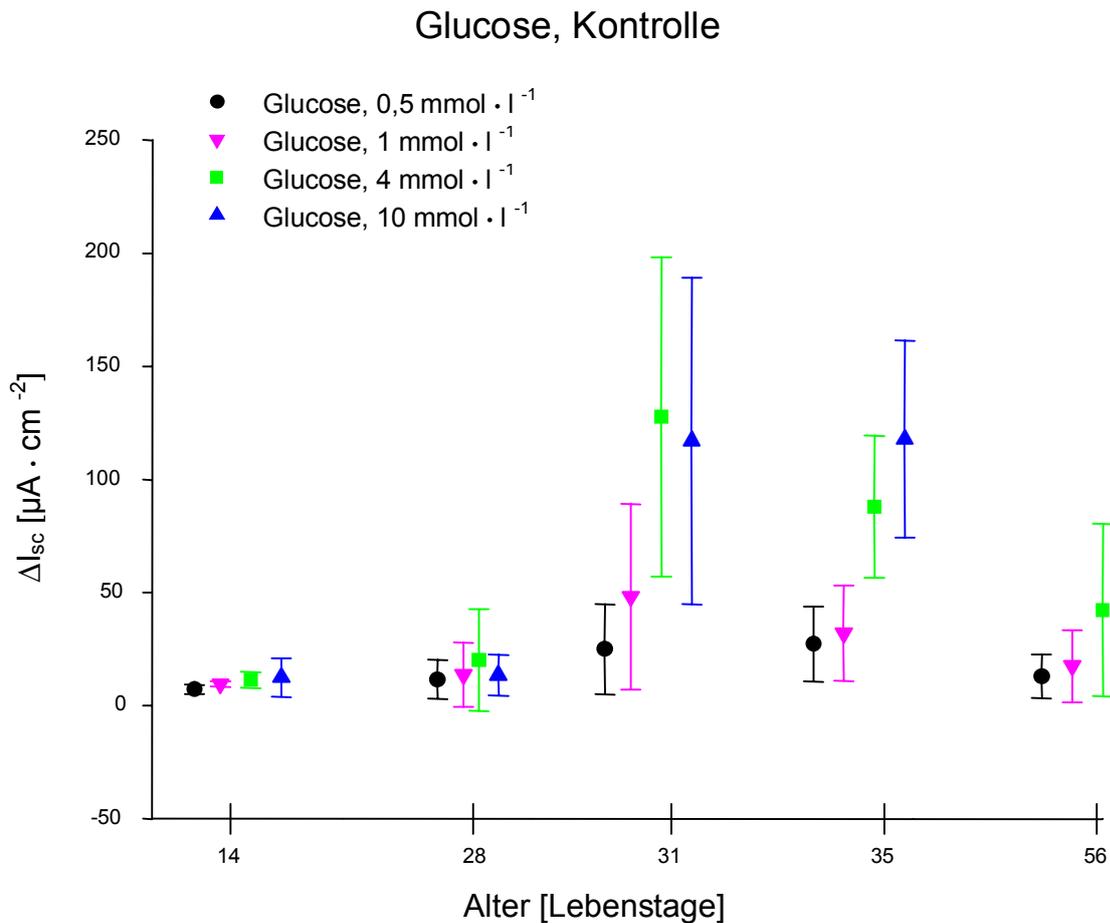


Abb. 22: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Altersgruppen als Antwort auf steigende Konzentrationen von mukosal zugegebener Glucose innerhalb der ersten fünf Minuten nach Zugabe; Kontroll-Gruppe [Mittelwerte \pm Standardabweichungen; zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8]

Abbildung 22 zeigt deutlich einen höheren ΔI_{sc} -Anstieg bei den Glucosekonzentrationen 4 mmol · l⁻¹ und 10 mmol · l⁻¹ bei Tieren des 31., 35. und 56. LT. Der Anstieg im Kurzschlussstrom am 56. LT fällt dabei jedoch geringer aus.

Glucose, Probiotika

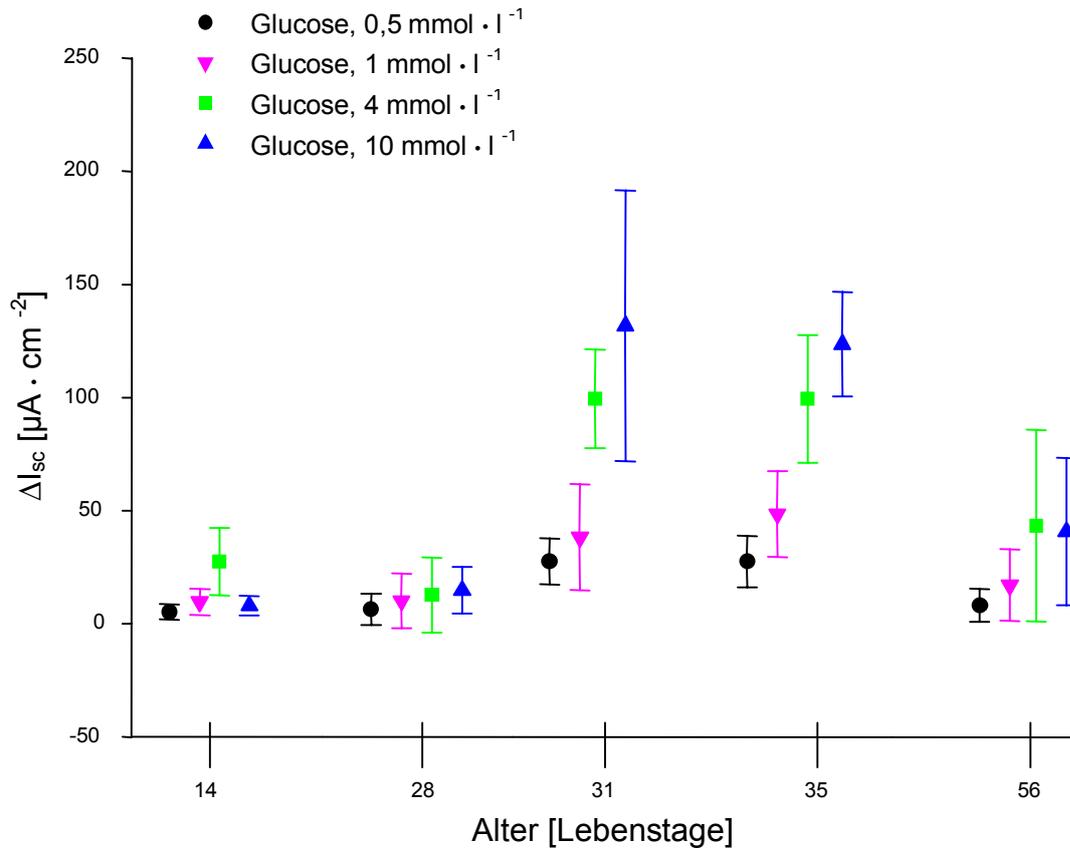


Abb. 23: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Altersgruppen als Antwort auf steigende Konzentrationen von mukosal zugegebener Glucose innerhalb der ersten fünf Minuten nach Zugabe; Probiotika-Gruppe [Mittelwerte \pm Standardabweichungen; zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8]

Die Probiotika-Gruppe weist in Abbildung 23 eine deutliche konzentrationsabhängige Reaktion in der Altersgruppe 31. und 35. LT auf. Die Zugabe unterschiedlicher Glucosekonzentrationen in der Altersgruppe 56. LT zeigt, wie bei der Kontroll-Gruppe, einen deutlich geringeren Anstieg des ΔI_{sc} .

Nachfolgend werden in den Abbildungen 24 bis 27 die Konzentrationen über die Altersgruppen dargestellt. Signifikante Unterschiede sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Glucose, $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

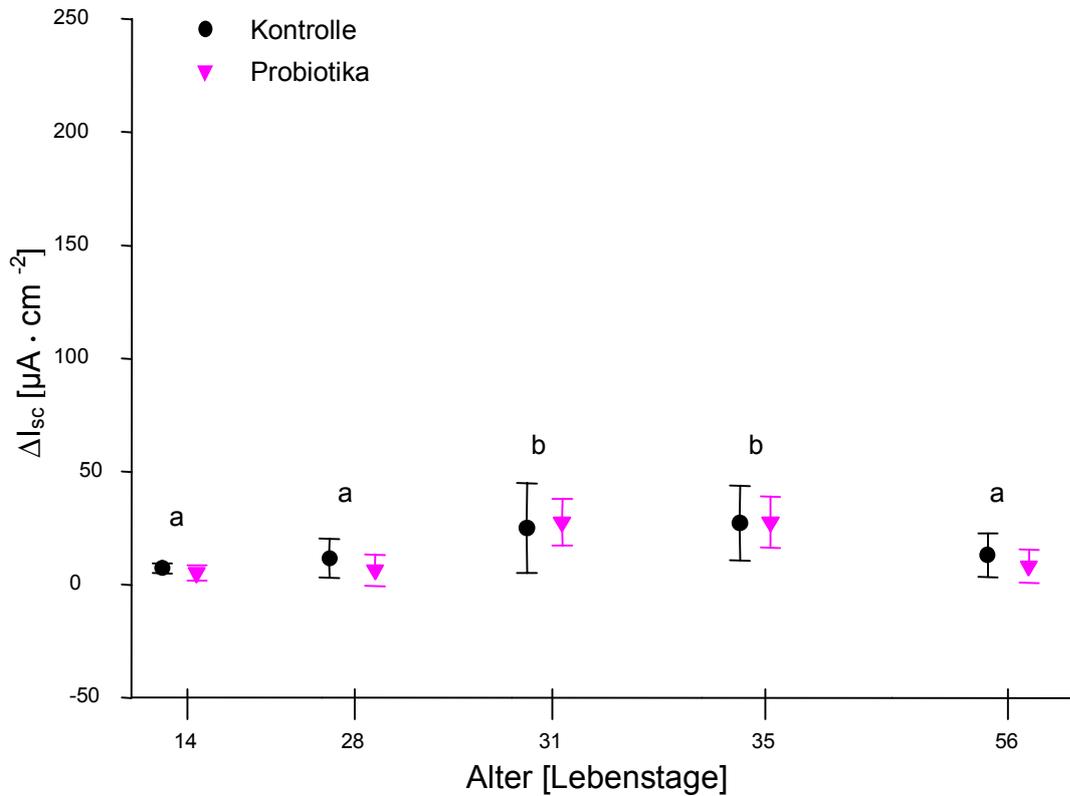


Abb. 24: ΔI_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die mukosale Zugabe von $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Glucose [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$]

Bei beiden Fütterungsgruppen zeigen sich in Abbildung 24 am 31. und 35. LT signifikante Unterschiede im mittleren ΔI_{sc} verglichen mit den anderen Altersgruppen. Die Fütterungsgruppen selbst weisen keine signifikanten Unterschiede auf.

Glucose, 1 mmol · l⁻¹

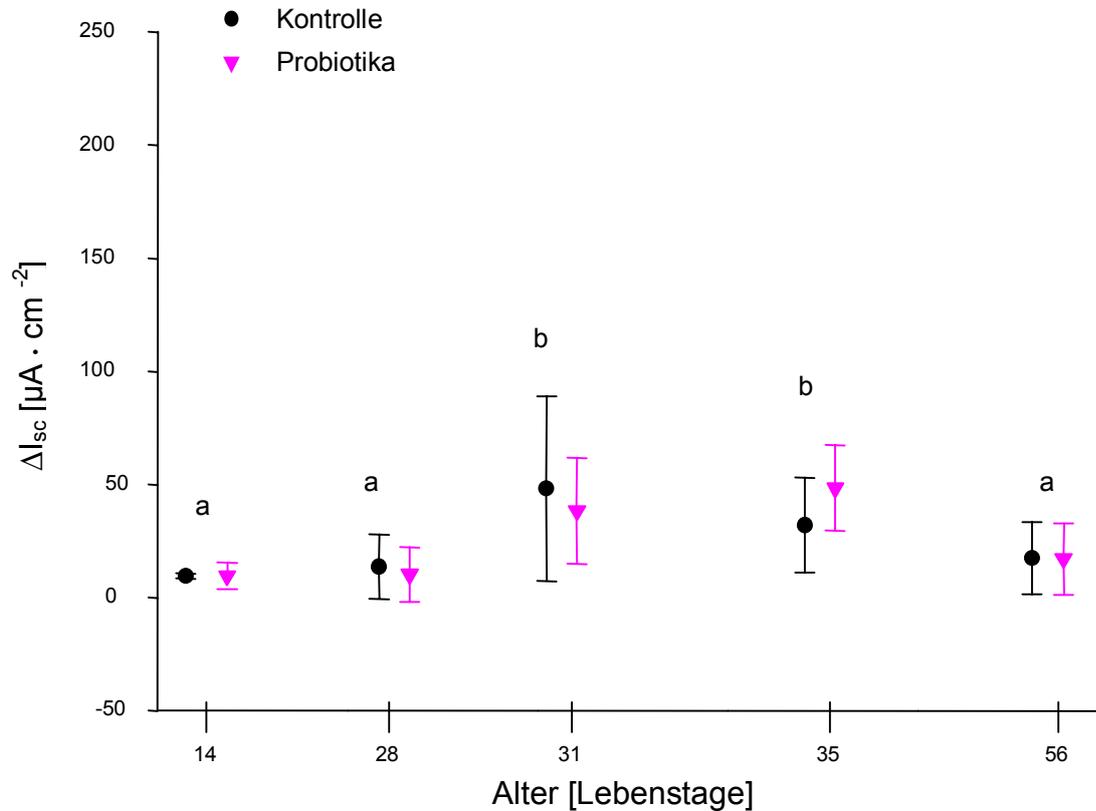


Abb. 25: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die mukosale Zugabe von 1 mmol · l⁻¹ Glucose [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, p \leq 0,05]

Abbildung 25 zeigt die Reaktion des I_{sc} auf die mukosale Zugabe von 1 mmol · l⁻¹ Glucose. Die Werte der Altersgruppen 31. und 35. LT liegen dabei signifikant über denen der anderen Altersgruppen. Auch hier zeigen die Fütterungsgruppen keine signifikanten Unterschiede.

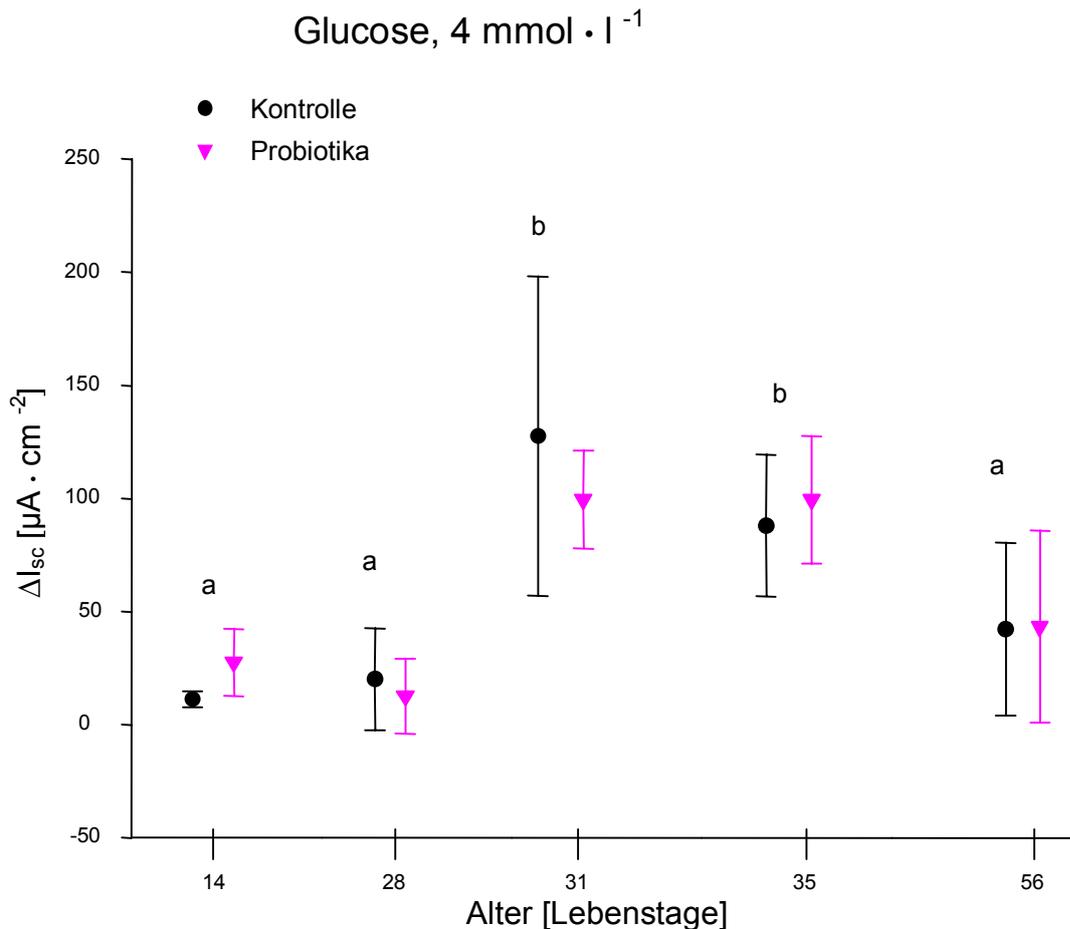


Abb. 26: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die mukosale Zugabe von 4 mmol · l⁻¹ Glucose [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$]

Wie in Abbildung 26 ersichtlich, verhalten sich bei einer Konzentration von 4 mmol · l⁻¹ Glucose die Alters- und Fütterungsgruppen wie bei der Reaktion auf 1 mmol · l⁻¹ Glucose. Auch hier liegen die Mittelwerte der Altersgruppe 31. und 35. LT auf einem signifikant höheren Niveau als die der anderen Altersgruppen. Die Fütterungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant.

Glucose; $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

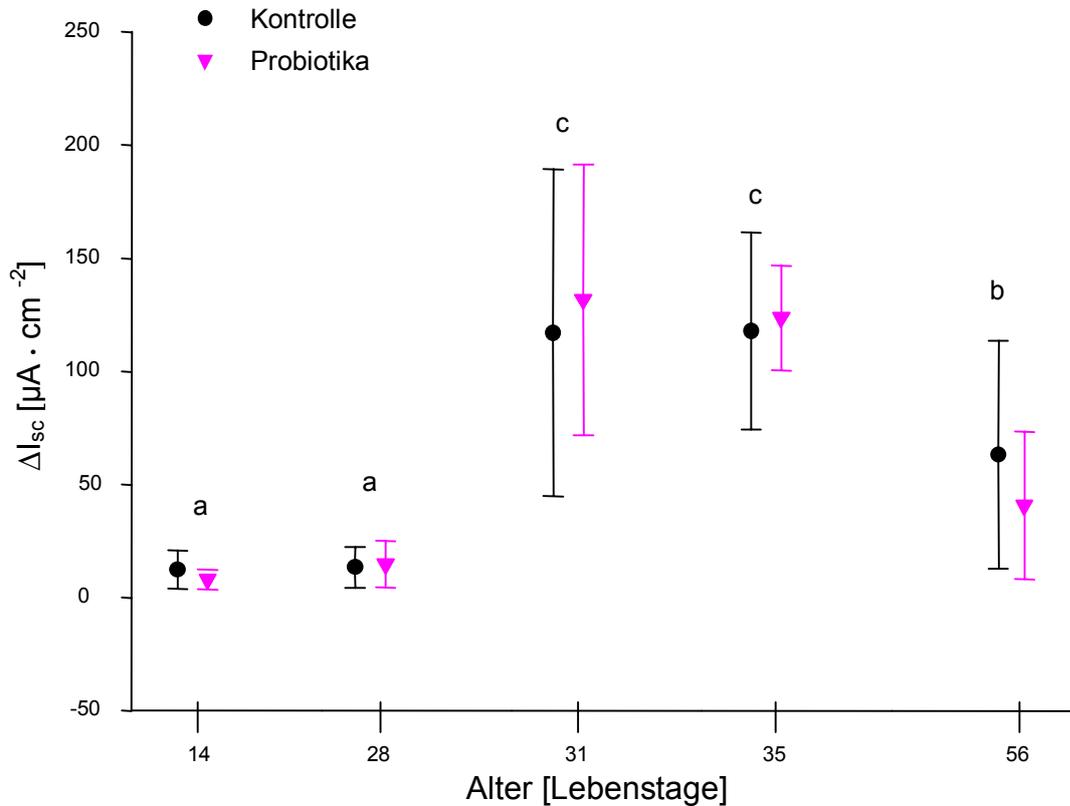


Abb. 27: ΔI_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die mukosale Zugabe von $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Glucose [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$]

Abbildung 27 zeigt die Reaktionen der unterschiedlichen Altersgruppen auf die Zugabe von $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ Glucose. Tiere des 14. und 28. LT unterscheiden sich nicht voneinander. Die Altersgruppen des 31. und 35. LT liegen signifikant über den anderen Altersgruppen. Bezüglich der Fütterungsgruppen treten keinerlei Signifikanzen auf.

Die Abbildungen 28 bis 32 zeigen die Dosis-Wirkungs-Beziehungen des ΔI_{sc} innerhalb der einzelnen Altersgruppen.

14. LT

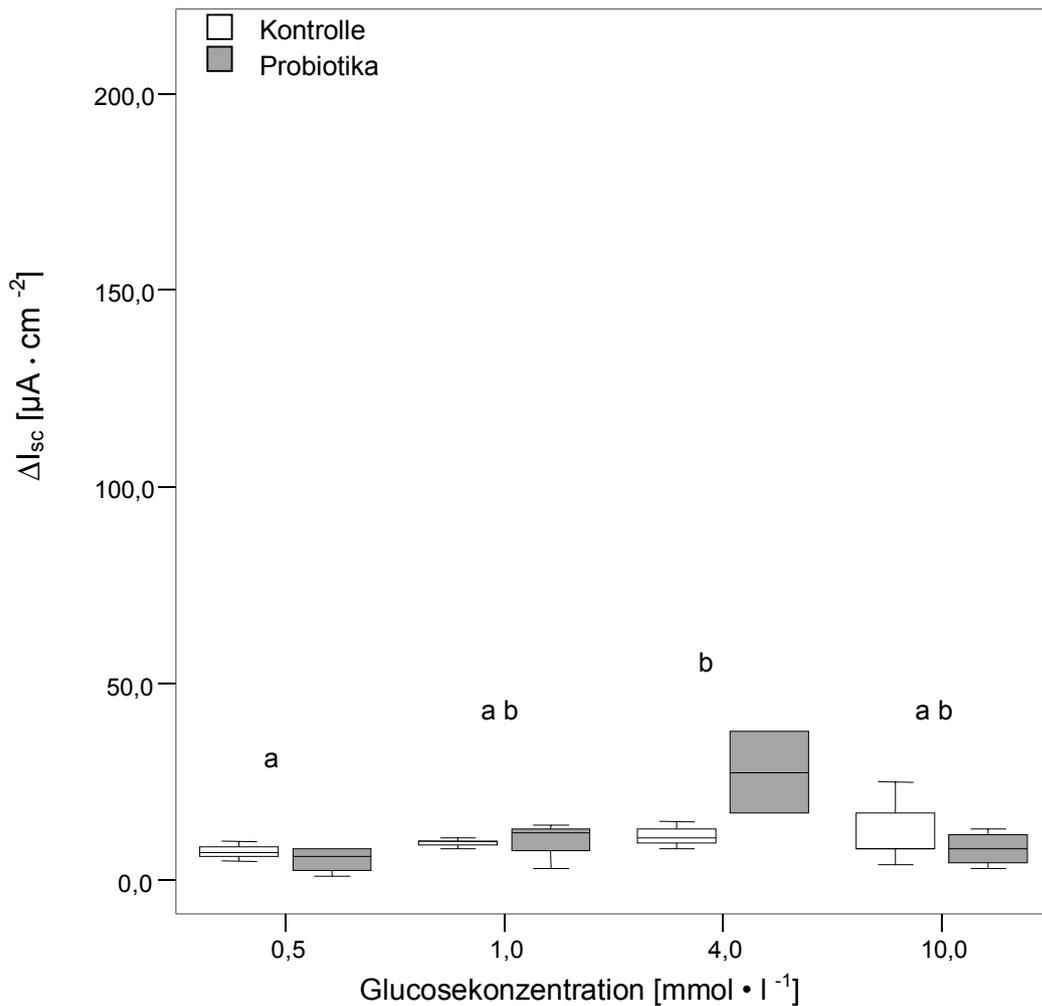


Abb. 28: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 14. Lebenstag nach mukosaler Zugabe von Glucose zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot]

Wie Abbildung 28 zeigt, reagiert die Altersgruppe 14. LT im Median kaum auf steigende Glucosekonzentrationen. Die Fütterungsgruppen unterscheiden sich mit Ausnahme der Konzentration $4,0 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ nicht voneinander. Hier liegt der Median des ΔI_{sc} bei der Probiotika-Gruppe oberhalb des Medians der Kontroll-Gruppe.

28. LT

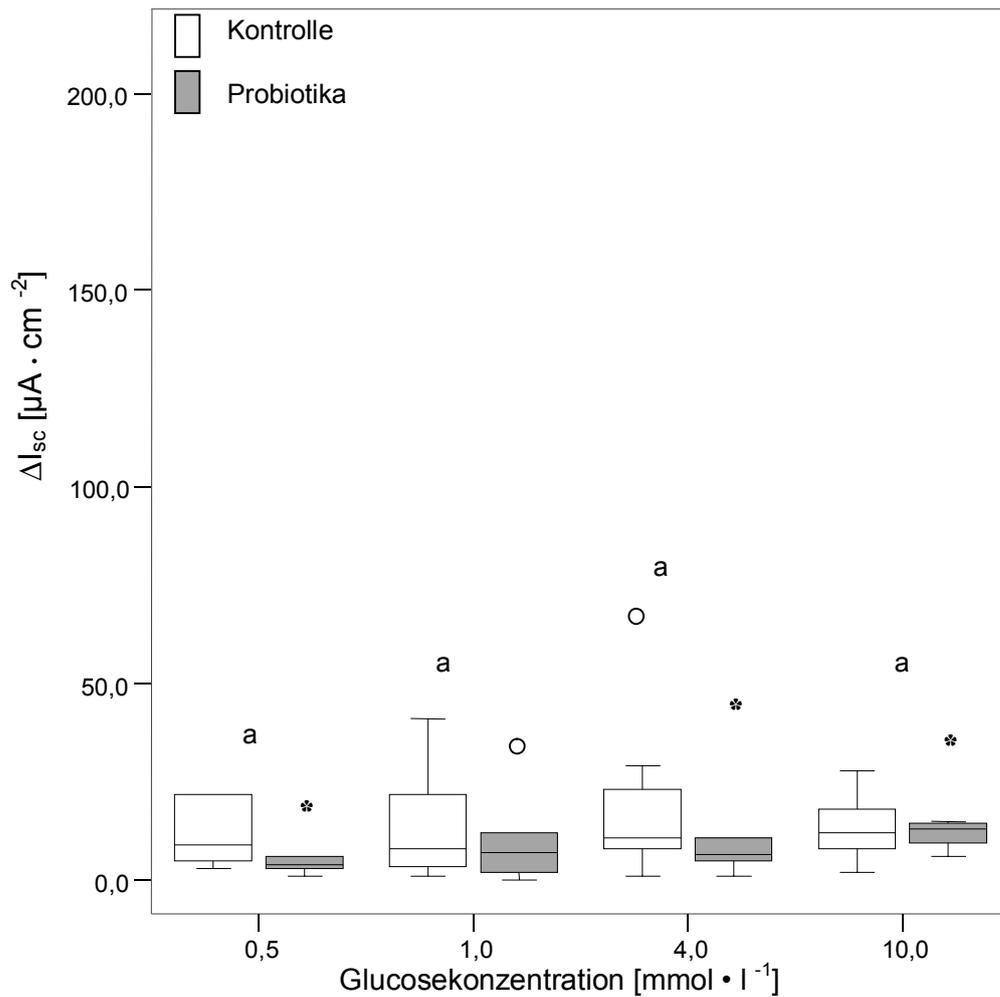


Abb. 29: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 28. Lebenstag nach mukosaler Zugabe von Glucose zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot²]

Bei allen Glucosekonzentrationen weisen in Abbildung 29 Tiere der Kontrolle höhere 25 %- und 75 %-Quartile auf. Diese Ergebnisse sind nicht signifikant. Mit Ausnahme der Konzentration 10 mmol · l⁻¹ liegen die Mediane der ΔI_{sc} -Werte bei der Kontroll-Gruppe höher als bei der Probiotika-Gruppe.

² Sternchen stellen extreme Werte, Kreise Ausreißer dar

31. LT

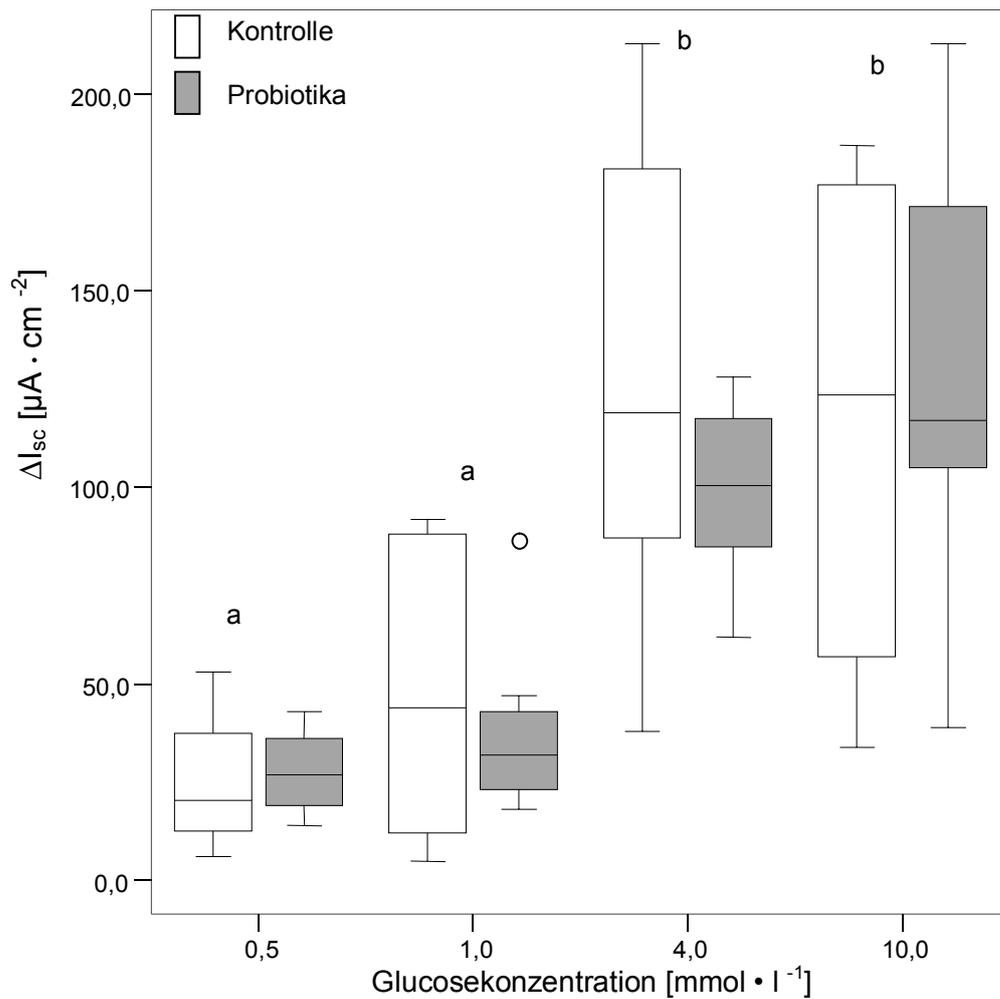


Abb. 30: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 31. Lebenstag nach mukosaler Zugabe von Glucose zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot²]

In Abbildung 30 zeigt die Altersgruppe 31. LT einen Anstieg des Medians der ΔI_{sc} -Werte auf ansteigende Glucosekonzentrationen. Dabei lässt sich eine sprunghafte Reaktion von der Konzentration $1,0 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$ auf $4,0 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$ feststellen. Bei den Konzentrationen $4,0 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$ und $10 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$ sind darüber hinaus bei beiden Fütterungsgruppen größere Streuungen zu beobachten als bei den Konzentrationen $0,5$ und $1,0 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$.

35. LT

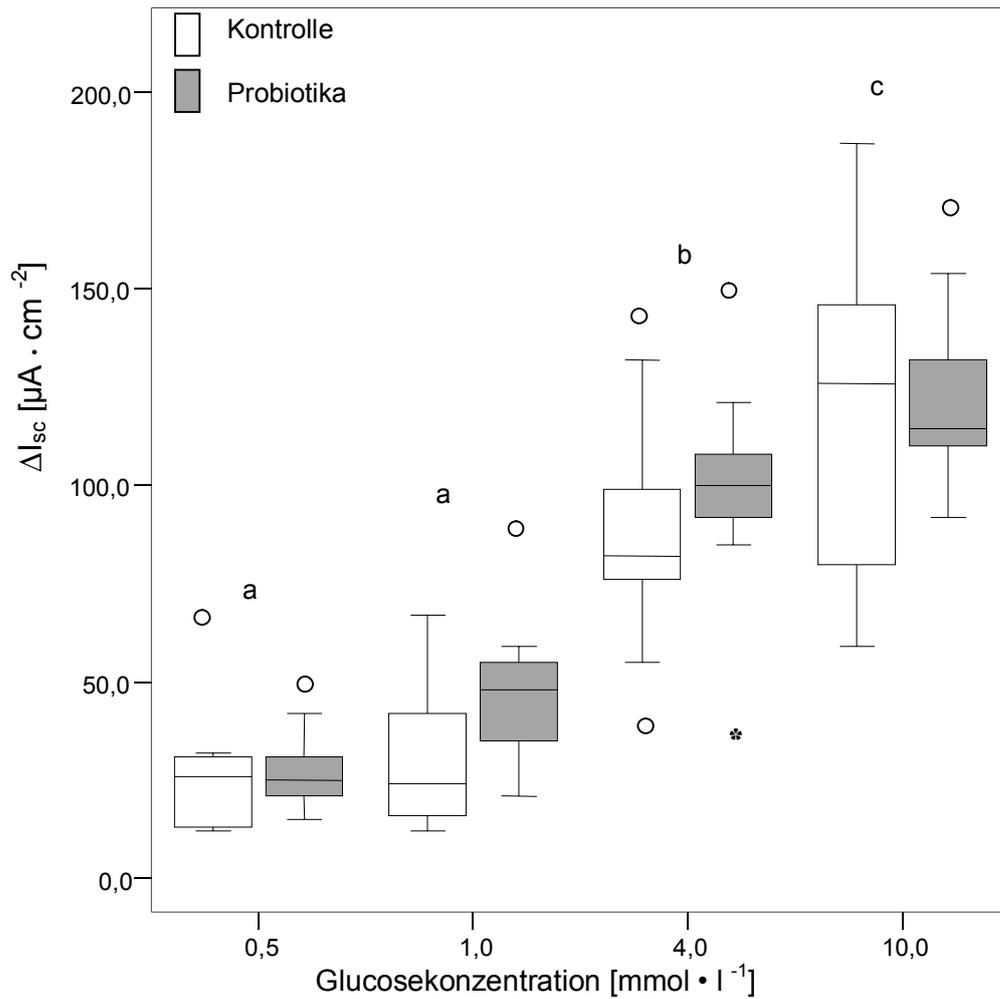


Abb. 31: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 35. Lebenstag nach mukosaler Zugabe von Glucose zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot²]

Auch in der Altersgruppe 35. LT zeigt sich, wie in Abbildung 31 dargestellt, mit steigender Glucosekonzentration ein stetiger Anstieg im ΔI_{sc} . Mit Ausnahme der Konzentrationen $0,5 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$ und $10,0 \text{ mmol} \cdot l^{-1}$ liegen die Medianwerte bei der Probiotika-Gruppe höher als in der Kontroll-Gruppe.

56. LT

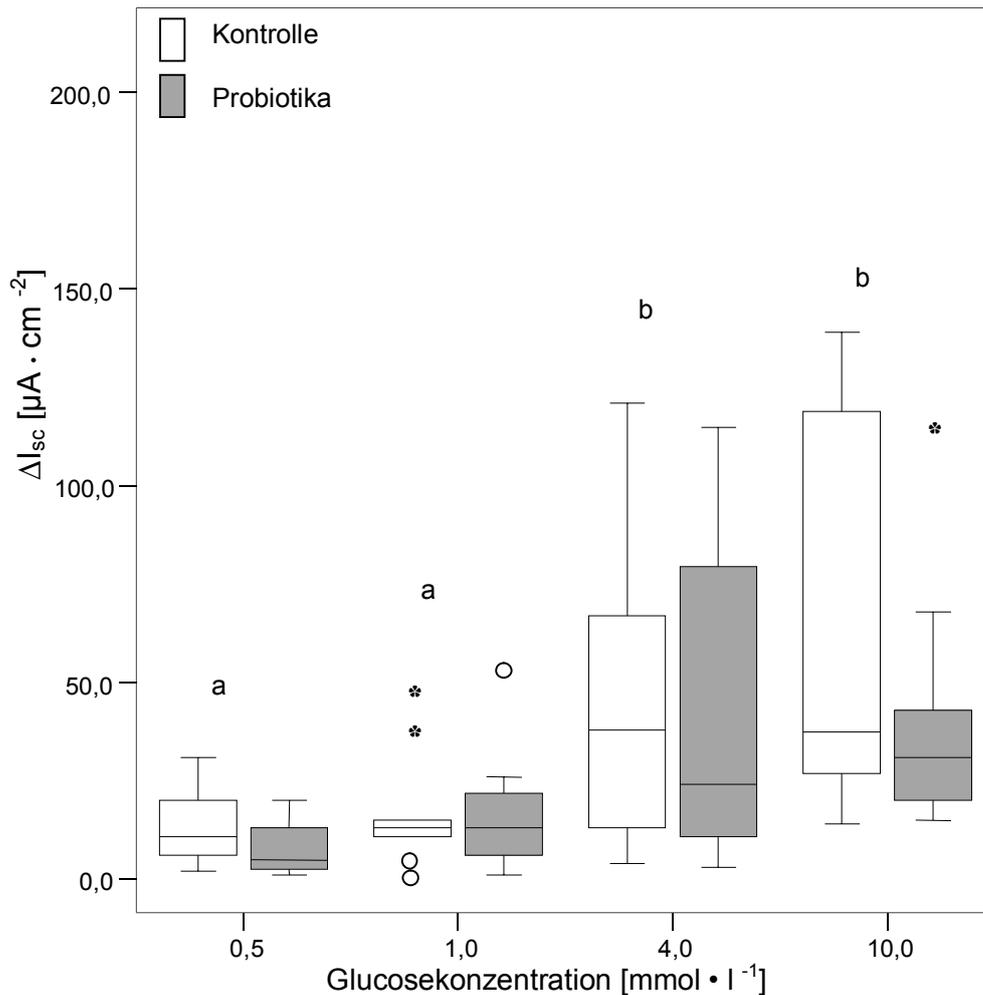


Abb. 32: Dosis-Wirkungs-Beziehung des ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] innerhalb der Altersgruppe 56. Lebenstag nach mukosaler Zugabe von Glucose zu Jejunumepithelien von Schweinen [Mediane \pm Interquartilsdistanzen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 8; signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$; Boxplot²]

In Abbildung 32 zeigt sich bei der Altersgruppe 56. LT eine eher schwache Reaktion auf einen Anstieg der Glucosekonzentration. Die Probiotika-Gruppe liegt mit ihren Median-Werten dabei gleichauf bzw. unterhalb der Medianwerte der Kontroll-Gruppe. Deutlich werden bei beiden Fütterungsgruppen die größeren Streuungen bei den Konzentrationen 4 $mmol \cdot l^{-1}$ und 10 $mmol \cdot l^{-1}$.

Generell zeigen sich bei fütterungsunabhängiger Betrachtung der Altersgruppen bei Anwendung der Post-Hoc-Tests nach Scheffé signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Altersgruppen mit Ausnahme zwischen dem 14. und 28. LT sowie dem 31. und 35. LT. Die 31. und 35. Tage alte Tiere zeigen gegenüber den anderen Altersgruppen bei allen Glucosekonzentrationen signifikante Unterschiede. Bei 10 $mmol \cdot l^{-1}$ Glucose ergeben

sich auch bei der Altersgruppe 56.LT signifikante Unterschiede zu den anderen Altersgruppen.

4.1.3 Reaktion des Kurzschlussstroms auf mukosale Zugaben von $12 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-Glutamin

Da L-Glutamin lediglich in einer Konzentration ($12 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) zugesetzt wurde, erfolgt hier die Darstellung für die verschiedenen Altersgruppen vergleichend für die Kontroll- und Probiotika-Gruppe. Bei den Boxplots ist zu bemerken, dass zum Teil die Stichproben weniger als sechs Epithelien umfasst und somit deren Aussagekraft gemindert wird.

In Tabelle 9 sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen für ΔI_{sc} nach Zugabe von $12 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-Glutamin angegeben.

Tabelle 9: Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung des ΔI_{sc} [$\mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$] nach mukosaler Zugabe von $12 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-Glutamin, aufgeschlüsselt nach Alters- und Fütterungsgruppe; Jejunumepithel des Schweines (n = Anzahl der Epithelien; N = Anzahl der Tiere)

Alter	14 Tage		28 Tage		31 Tage		35 Tage		56 Tage	
	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415
12	5,00 \pm 3,16 (n = 4, N = 2)	9,00 \pm 3,00 (n = 3, N = 1)	14,44 \pm 21,63 (n = 9, N = 4)	10,33 \pm 12,87 (n = 12, N = 4)	58,36 \pm 33,09 (n = 11, N = 4)	54,15 \pm 25,93 (n = 13, N = 4)	41,10 \pm 26,50 (n = 20, N = 4)	44,24 \pm 16,38 (n = 17, N = 5)	14,47 \pm 10,84 (n = 17, N = 5)	9,77 \pm 6,47 (n = 13, N = 5)

Wie in Tabelle 9 und Abbildung 33 dargestellt, liegen die mittleren ΔI_{sc} -Werte der Kontroll-Gruppe zu 60 % über denen der Probiotika-Gruppe. Die Standardabweichungen sind bei der Kontroll-Gruppe zu 100 % höher als die der Probiotika-Gruppe.

Der Effekt der Faktoren 'Alter' und 'Tier' ist auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant. Bezüglich des Faktors 'Fütterung' zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

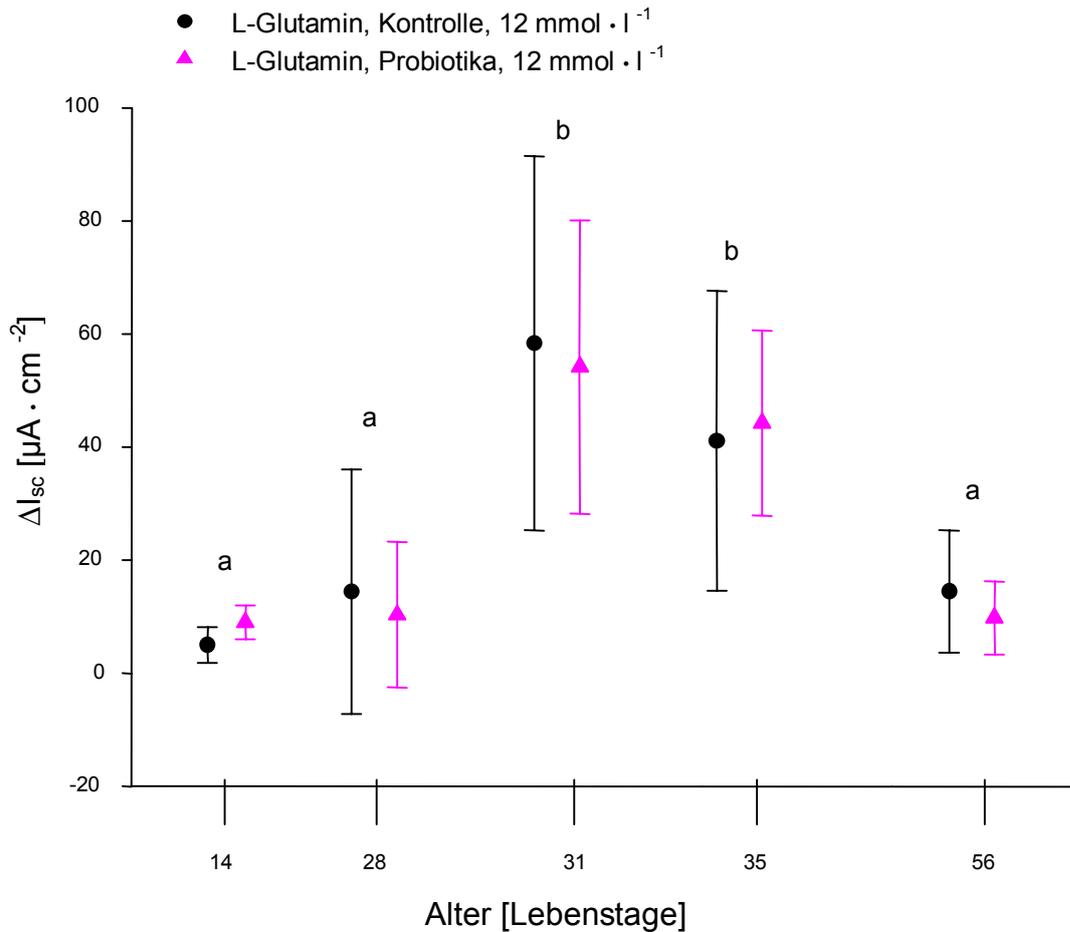


Abb. 33: ΔI_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$] des Jejunumepithels von Ferkeln verschiedener Alters- und Fütterungsgruppen als Antwort auf die mukosale Zugabe von 12 mmol · l⁻¹ L-Glutamin [Mittelwerte \pm Standardabweichungen, zur Anzahl der jeweiligen Tiere bzw. Epithelien siehe Tabelle 9; signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen werden durch ungleiche Buchstaben gekennzeichnet; Varianzanalyse mit Post-Hoc-Scheffé-Test, $p \leq 0,05$]

Wie aus Tabelle 9 und Abbildung 33 deutlich wird, zeigen sich bei den Tieren der Altersgruppe 31. und 35. LT signifikant höhere Werte im mittleren ΔI_{sc} . Die Fütterungsgruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Reaktion auf die mukosale Zugabe von 12 mmol · l⁻¹ L-Glutamin.

4.2 Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max}

Nachfolgend werden die Michaelis-Menten-Konstante K_m und die maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} für den PGE₂- und Glucose-stimulierten Transport dargestellt. Die Berechnung der Ergebnisse erfolgt mittels nichtlinearer Regression für die einzelnen Altersgruppen beider Fütterungsgruppen. In den Tabellen sind neben den K_m - und V_{max} -Werten auch die zugehörigen 95 %-Konfidenzintervalle angegeben.

Zur Berechnung mittels nichtlinearer Regression sind Startwerte notwendig, die anhand linearer Regression ermittelt wurden. Die genaue Vorgehensweise bei der Berechnung ist in Kapitel 3.5 und 3.6 beschrieben.

4.2.1 Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} für die Reaktion des Jejunumepithels auf die Zugabe von PGE₂

Zunächst erfolgt die getrennte Darstellung beider Fütterungsgruppen. Die verwendeten Daten für K_m und V_{max} können Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} für die PGE₂-stimulierte Ionensekretion im Jejunum des Schweines in den Altersgruppen 14. LT, 28. LT, 31. LT, 35. LT und 56. LT, aufgeteilt nach Fütterungsgruppen [Nichtlineare Gesamtregression über die jeweilige Gruppe \pm 95 %-Konfidenzintervall, n = Anzahl der Epithelien; N = Anzahl der Tiere; signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen werden für K_m durch # und für V_{max} durch * gekennzeichnet]

Alter	14. LT		28. LT		31. LT		35. LT		56. LT	
	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	<i>E. faecium</i> NCIMB 10415
K_m [$\mu\text{mol/ml}$]	0,02 [-0,02; 0,06]	0,03 [-0,04; 0,09]	0,02 [-0,01; 0,05]	0,09 # [-0,04; 0,22]	0,08 [0,00; 0,15]	0,07 [0,03; 0,11]	0,13 [0,03; 0,23]	0,08 [0,04; 0,12]	0,08 # [0,02; 0,14]	0,03 [-0,02; 0,08]
V_{max} [$\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]	2,53 [1,77; 3,30]	2,49 [1,55; 3,43]	2,58 [2,03; 3,13]	2,50 [1,59; 3,41]	5,22 [3,97; 6,47]	5,69 * [4,81; 6,58]	5,07 [4,05; 6,10]	4,64 [4,10; 5,18]	3,92 * [3,21; 4,63]	2,74 [1,97; 3,52]
Berechnungsgrundlage	n = 24 N = 4	n = 21 N = 3	n = 31 N = 4	n = 23 N = 3	n = 26 N = 4	n = 30 N = 4	n = 37 N = 5	n = 38 N = 5	n = 39 N = 5	n = 35 N = 5

Tabelle 10 zeigt, dass bis auf die Altersgruppe 31. und 56. LT alle K_m -Werte der Probiotika-Gruppe über den Werten der Kontroll-Gruppe liegen. Der V_{max} -Wert der Probiotika-Gruppe liegt lediglich bei der Altersgruppe 31. LT über den entsprechenden Werten der Kontroll-Gruppe. Die 95%-Konfidenzintervalle sind bezüglich K_m bei der Probiotika-Gruppe am 14. und 28. LT größer als in der Kontroll-Gruppe.

In Tabelle 11 sind die Werte für die Altersgruppen unabhängig von der Fütterung dargestellt.

Tabelle 11: Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} für die PGE₂-stimulierte Ionensekretion im *Jejunum* des Schweines in den Altersgruppen 14. LT, 28. LT, 31. LT, 35. LT und 56. LT, unabhängig von der jeweiligen Fütterung [Nichtlineare Gesamtregression über die jeweilige Gruppe \pm 95 %-Konfidenzintervall, n = Anzahl der Epithelien; N = Anzahl der Tiere; signifikante Unterschiede von V_{max} zwischen den Altersgruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet]

Alter	14. LT	28. LT	31. LT	35. LT	56. LT
K_m [$\mu\text{mol}/\text{ml}$]	0,02 [-0,01; 0,05]	0,04 [0,00; 0,08]	0,07 [0,03; 0,11]	0,10 [0,06; 0,14]	0,05 [0,01; 0,09]
V_{max} [$\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$]	2,51 [1,94; 3,08] ab	2,53 [2,05; 3,02] a	5,45 [0,03; 0,11] c	4,82 [4,28; 5,36] bc	3,34 [2,81; 3,87] ab
Berechnungs- grundlage	n = 45 N = 7	n = 54 N = 7	n = 56 N = 8	n = 75 N = 10	n = 74 N = 10

Bei fütterungsunabhängiger Betrachtung wird eine kontinuierliche Zunahme von K_m und V_{max} mit zunehmendem Alter der Ferkel bis einschließlich dem 31. LT (V_{max}) bzw. 35. LT (K_m) deutlich. Bei V_{max} zeigen sich dabei am 31. LT die höchsten Werte, wobei generell signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen auftreten. K_m zeigt zwischen den Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede.

4.2.2 Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} bezüglich der Reaktion des Jejunumepithels auf die Zugabe von Glucose

Tabelle 12 zeigt die K_m - und V_{max} -Werte aufgeteilt nach Alters- und Fütterungsgruppen.

Tabelle 12: Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} für den Natriumabhängigen Glucosetransport im *Jejunum* des Schweines in den Altersgruppen 14. LT, 28. LT, 31. LT, 35. LT und 56. LT, aufgeteilt nach Fütterungsgruppen [Nichtlineare Gesamtregression über die jeweilige Gruppe \pm 95 %-Konfidenzintervall, n = Anzahl der Epithelien; N = Anzahl der Tiere; signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen werden für K_m durch # und für V_{max} durch * gekennzeichnet]

Alter	14. LT		28. LT		31. LT		35. LT		56. LT	
	Kontrolle	E. <i>faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	E. <i>faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	E. <i>faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	E. <i>faecium</i> NCIMB 10415	Kontrolle	E. <i>faecium</i> NCIMB 10415
K_m [mmol/ml]	0,36 [-0,26; 0,98]	0,52 [-1,09; 2,12]	0,21 [-0,61; 1,04]	0,67 [-1,31; 2,65]	1,80 [-1,34; 4,94]	2,95 # [0,20; 5,70]	3,14 [0,52; 5,77]	2,11 [1,08; 3,14]	3,90 # [-3,22; 11,02]	1,74 [-1,44; 4,91]
V_{max} [mmol \cdot cm ⁻² \cdot h ⁻¹]	0,48 [0,31; 0,64]	0,54 [0,14; 0,95]	0,64 [0,28; 0,99]	0,65 [0,18; 1,12]	5,80 * [2,43; 9,17]	6,31 [4,03; 8,60]	5,80 [3,99; 7,62]	5,61 [4,70; 6,52]	3,24 * [0,86; 5,63]	1,98 [0,83; 3,12]
Berechnungs- grundlage	n = 17 N = 3	n = 13 N = 2	n = 28 N = 4	n = 19 N = 3	n = 18 N = 3	n = 29 N = 4	n = 37 N = 5	n = 38 N = 5	n = 37 N = 5	n = 33 N = 5

K_m und V_{max} liegen bis zum 31. LT bei der Probiotika-Gruppe über den entsprechenden Werten der Kontroll-Gruppe. Am 31. LT liegt die Michaelis-Menten-Konstante K_m sowie der V_{max} dabei in der Probiotika-Gruppe signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. Am 56. LT

weist hingegen die Kontrolle sowohl einen signifikant höheren K_m -Wert als auch V_{max} -Wert als die Probiotika-Gruppe auf.

Wie bei den Versuchen mit PGE_2 werden nachfolgend auch hier die K_m - und V_{max} -Werte in Tabelle 13 fütterungsunabhängig für die einzelnen Altersgruppen dargestellt.

Tabelle 13: Michaelis-Menten-Konstante K_m und maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} für den Natriumabhängigen Glucosetransport im mittleren Jejunum des Schweines in den Altersgruppen 14. LT, 28. LT, 31. LT, 35. LT und 56. LT. [Nichtlineare Gesamtregression über die jeweilige Gruppe \pm 95 %-Konfidenzintervall; n = Anzahl der Epithelien; N = Anzahl der Tiere; signifikante Unterschiede von V_{max} zwischen den Altersgruppen werden durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet]

Alter	14. LT	28. LT	31. LT	35. LT	56. LT
K_m [mmol/ml]	0,44 [-0,25; 1,14]	0,35 [-0,42; 1,12]	2,33 [0,36; 4,31]	2,53 [1,38; 3,68]	2,53 [-0,60; 5,65]
V_{max} [mmol \cdot cm ⁻² \cdot h ⁻¹]	0,51 [0,33; 0,68] a	0,64 [0,37; 0,91] a	6,00 [4,17; 7,83] b	5,67 [4,76; 6,57] b	2,51 [1,43; 3,60] ab
Berechnungs- grundlage	n = 30 N = 5	n = 47 N = 7	n = 47 N = 7	n = 75 N = 10	n = 70 N = 10

Bei fütterungsunabhängiger Betrachtung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m kann ein kontinuierlicher Anstieg bis zum 35. LT festgestellt werden. Bezüglich der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} zeigt sich bis zum 31. LT ein deutlicher Anstieg. Ab dem 35. LT sinkt V_{max} wieder kontinuierlich ab. Die Altersgruppen weisen bezüglich K_m keine signifikanten Unterschiede auf. Bei V_{max} kann hingegen ein signifikanter Unterschied vor allem des 31. und 35. LT zu den anderen Altersgruppen festgestellt werden.

4.3 Die Wirkung von IL-1 α auf Jejunumepithelien von Schweinen

Da es Hinweise gibt, dass das proinflammatorische Interleukin IL-1 α sowohl sekretorische (z.B. CFTR) als auch absorptive Eigenschaften (z.B. SGLT-1) des Jejunumepithels beeinflussen kann (Hardin et al., 2000) (siehe Kapitel 2.5), sollte in den vorliegenden Versuchen untersucht werden, inwiefern IL-1 α den SGLT-1 stimuliert, und ob diese Stimulation durch Zugabe von Phlorizin als spezifischer SGLT-1-Hemmer beeinflusst werden kann. Des Weiteren war von Interesse, ob eine Supplementierung mit dem Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 darauf Einfluss nehmen kann.

4.3.1 Vorversuch: Antwort des Kurzschlussstroms auf die serosale Zugabe steigender IL-1 α -Konzentrationen

Um für die nachfolgenden Versuchsansätze die optimale Konzentration an IL-1 α zu bestimmen, wurden mittels Ussing-Kammer-Methode aufsteigende IL-1 α -Konzentrationen (0 ng/ml, 0,1 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml) serosal zu Jejunumepithelien von Schweinen der Altersgruppen 14., 28., 31., 35. und 56. Lebenstag zugegeben und deren

Effekt auf den Kurzschlussstrom gemessen. Den größten Anstieg im Kurzschlussstrom zeigte sich nach der serosalen Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α . Für die nachfolgenden Versuche wurde daher diese Konzentration ausgewählt.

4.3.2 Antwort des Kurzschlussstroms auf die serosale Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α

Aufgrund des kleinen Stichprobenumfanges werden Kontrolle und Probiotika-Gruppe zur Darstellung der Epithelreaktionen zusammengefasst.

Um festzustellen, ob der durch IL-1 α ausgelöste Anstieg im Kurzschlussstrom ausschließlich über den SGLT-1 vermittelt wird, wurde im Versuchsansatz der Effekt der serosalen Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α auf den Kurzschlussstrom mit und ohne mukosaler Zugabe von Phlorizin (spezifische Hemmung des SGLT-1) untersucht. Dabei wurden zur Bestimmung der optimalen Dosis an Phlorizin die Konzentrationen 100 μ mol/l Phlorizin und 500 μ mol/l Phlorizin mukosal getestet. Die Konzentration von 100 μ mol/l Phlorizin zeigte dabei nur geringe hemmende Wirkung und wurde nicht in die Versuchsreihe aufgenommen. Die mukosale Zugabe von 500 μ mol/l Phlorizin zeigte eine deutliche Verminderung im I_{sc} und wurde in den weiteren Versuchen verwendet.

Bei allen Versuchsansätzen wurde sowohl der maximale Anstieg im Kurzschlussstrom, bewirkt durch IL-1 α , innerhalb von 45 Minuten (ΔI_{sc} Max45) als auch die maximale Hemmung des Kurzschlussstromes, durch den mukosalen Einsatz von Phlorizin, innerhalb von zehn Minuten (ΔI_{sc} Min10) nach deren Zugabe bestimmt.

Nachfolgend werden zunächst die zu erwartenden Reaktionen der einzelnen Versuchsansätze schematisch dargestellt.

Bei der Kontrolle wird erwartet, dass sich bei der Messung des Kurzschlussstromes über die Zeit keine Änderung zeigt (Abbildung 34).

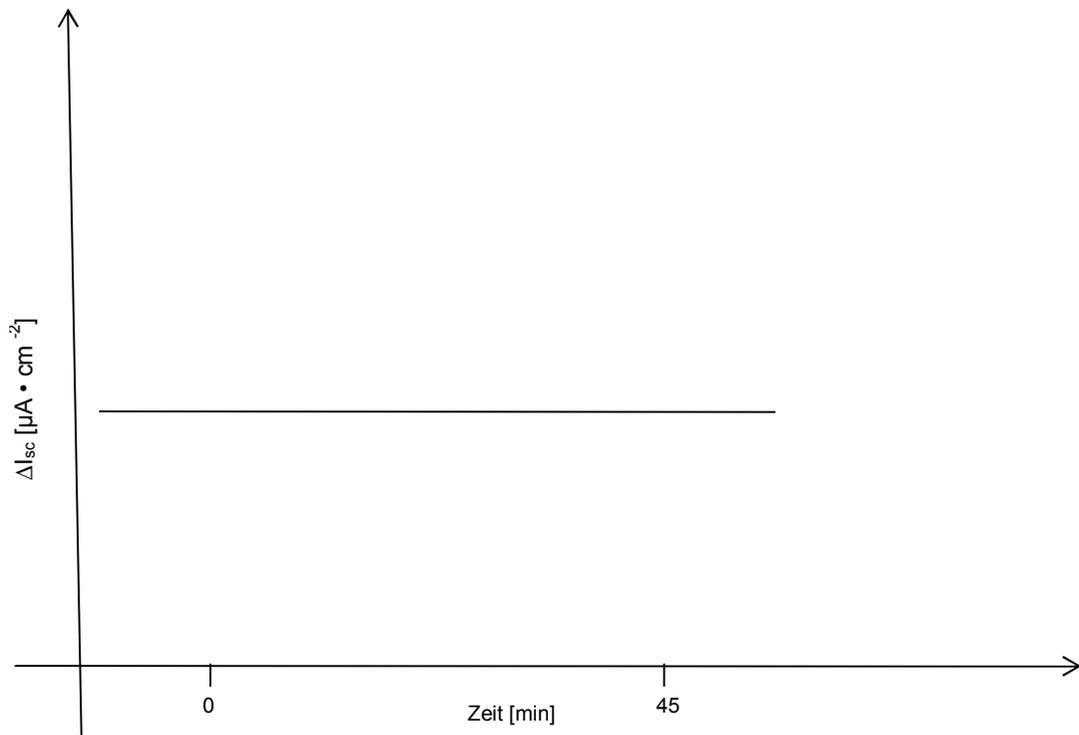


Abb. 34: Schematische Darstellung der I_{sc} -Reaktion in Abhängigkeit von der Zeit; Kontrolle

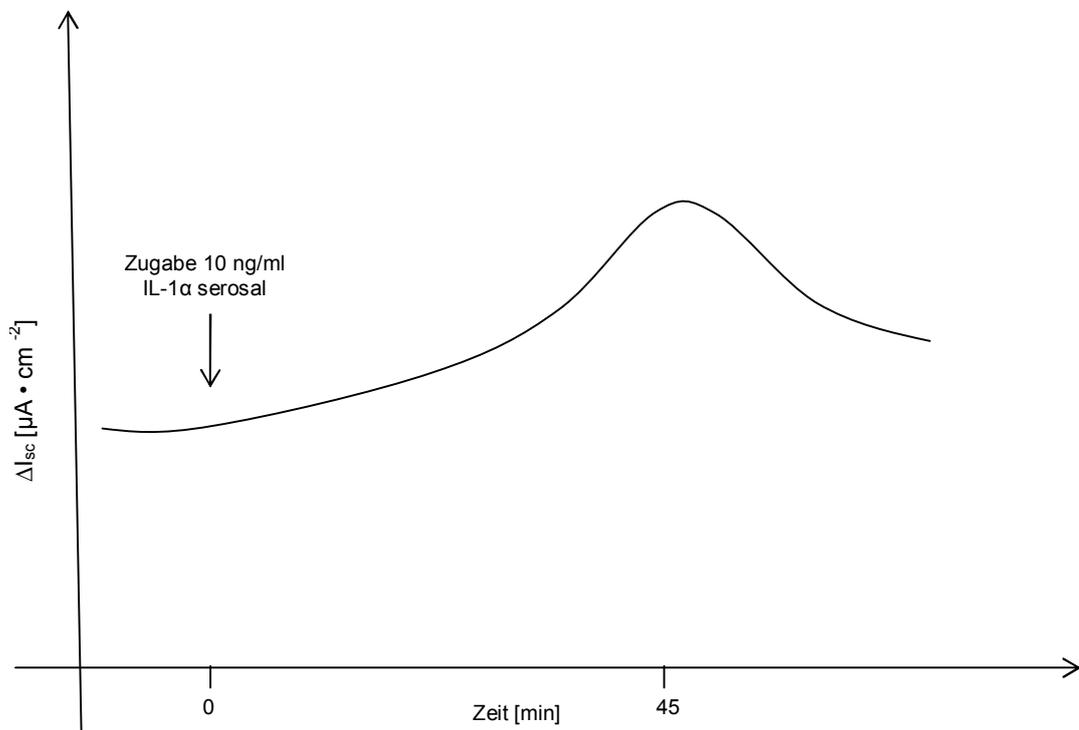


Abb. 35: Schematische Darstellung der I_{sc} -Reaktion in Abhängigkeit von der Zeit; Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α serosal

In Abbildung 35 wird der durch serosale Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α erwartete Anstieg im Kurzschlussstrom dargestellt. Ein Peak im Kurzschlussstrom sollte demnach nach etwa 45 Minuten zu beobachten sein. Anschließend kann sich im Zeitverlauf ein erneutes Absinken des Kurzschlussstroms zeigen.

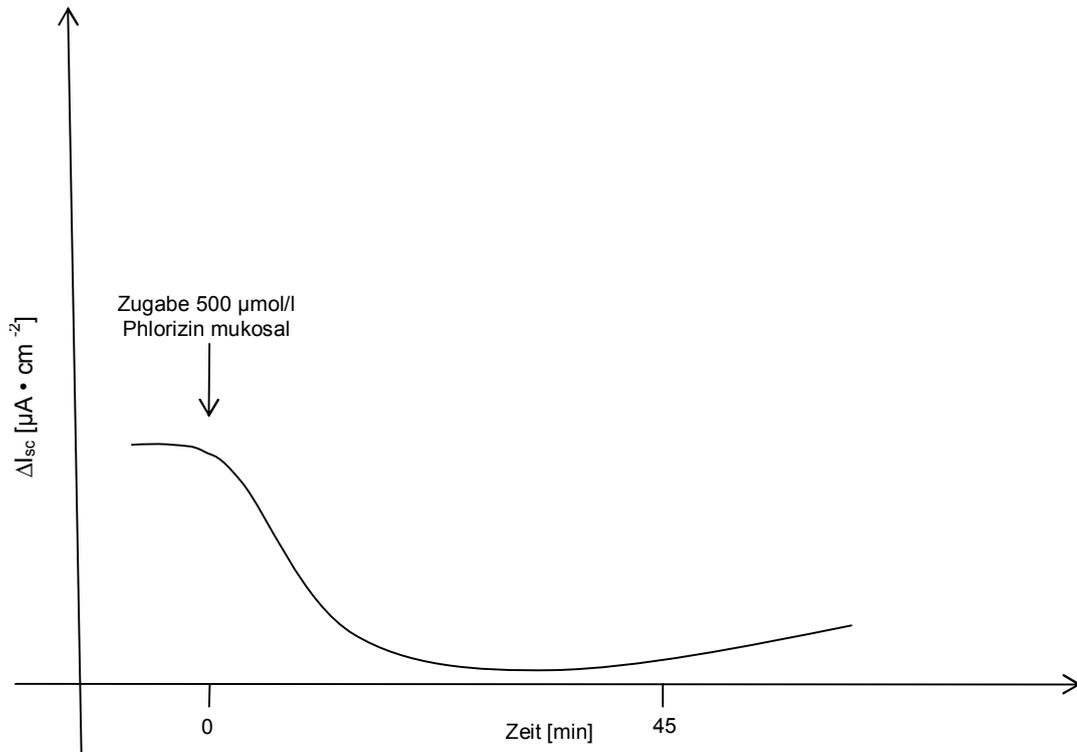


Abb. 36: Schematische Darstellung der I_{sc} -Reaktion in Abhängigkeit von der Zeit; Zugabe von 500 $\mu mol/l$ Phlorizin mukosal

Abbildung 36 zeigt die durch die mukosale Zugabe von 500 $\mu mol/l$ Phlorizin zu erwartende maximale Hemmung des Na⁺-abhängigen Glucosetransporters (SGLT-1) innerhalb von ca. zehn Minuten nach Zugabe. Ein Abfall im Kurzschlussstrom sollte zu beobachten sein. Im weiteren Verlauf ist allerdings ein erneuter, wenn auch leichter, Anstieg des Kurzschlussstromes zu erwarten.

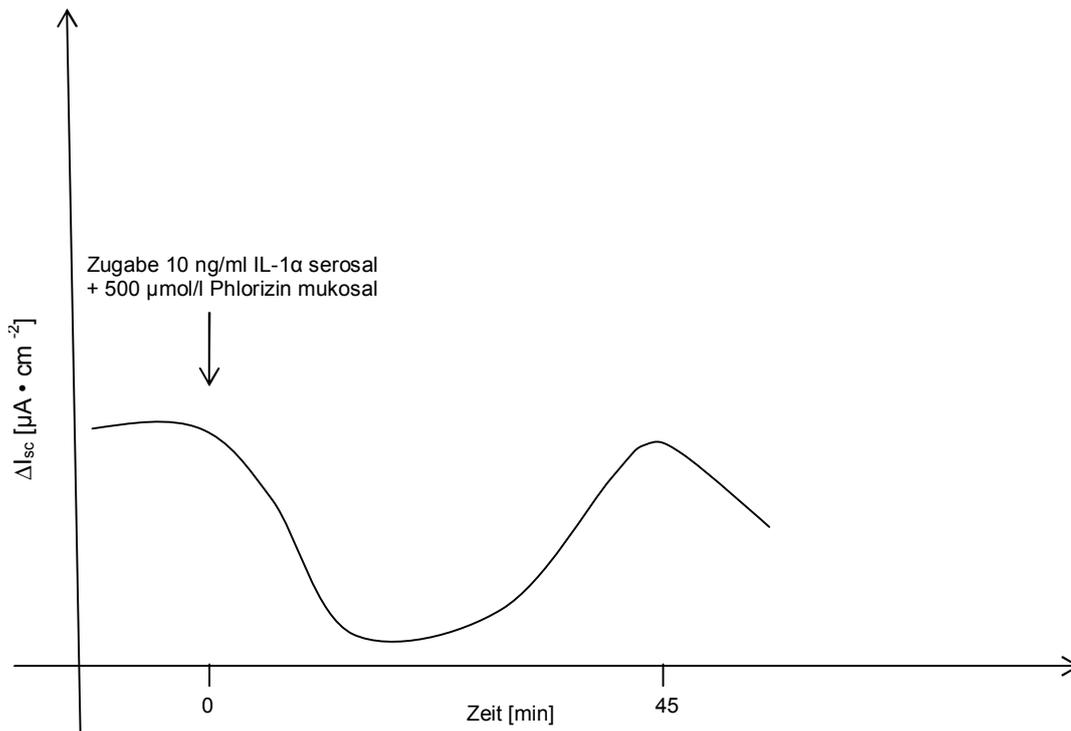


Abb. 37: Schematische Darstellung der I_{sc} -Reaktion in Abhängigkeit von der Zeit; Zugabe von 500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal und 10 ng/ml IL-1 α serosal

Um zu untersuchen, inwieweit der Stromanstieg durch IL-1 α tatsächlich über eine Steigerung der Aktivität des SGLT-1-Transporters verursacht wird, wurde zeitgleich serosal 10 ng/ml IL-1 α und 500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal hinzugegeben. Wenn der Anstieg des Kurzschlussstromes ausschließlich über die Stimulation des SGLT-1 erfolgt, so sollte dieser Effekt durch Phlorizin (spezifische Hemmung des SGLT-1) herabgesetzt werden (eine detaillierte Erklärung der jeweiligen Einflussnahme auf den SGLT-1 ist Kapitel 2.5 zu entnehmen). Da die Wirkung von Phlorizin sofort einsetzt, die Wirkung von IL-1 α aber erst nach 20 bis 30 Minuten (Chiossone et al., 1990), ist zu erwarten, dass nach gleichzeitiger Zugabe beider Substanzen zunächst der Kurzschlussstrom durch die Wirkung des Phlorizins abfällt, es aber durch die zeitversetzte IL-1 α -Wirkung im späteren Zeitverlauf erneut zu einem Anstieg des I_{sc} oder es aber zu keiner Hemmung im durch IL-1 α stimulierten Anstieg im Kurzschlussstrom kommt, falls die Wirkung von IL-1 α nicht vollständig durch Phlorizin gehemmt, bzw. wenn der Stromanstieg nicht alleine durch Stimulation des SGLT-1 verursacht wird (Abbildung 37).

Um die einzelnen Versuchsansätze statistisch mittels des T-Tests vergleichen zu können, wurden folgende vier Vergleiche durchgeführt:

- Vergleichspaar 1: Vergleich von „Kontrolle“ mit „10 ng/ml IL-1 α serosal“;

- Vergleichspaar 2: Vergleich von „Kontrolle“ mit „10 ng/ml IL-1 α serosal + 500 μ mol/l Phlorizin mukosal“;
- Vergleichspaar 3: Vergleich von „Kontrolle“ mit „500 μ mol/l Phlorizin mukosal“;
- Vergleichspaar 4: Vergleich von „10 ng/ml IL-1 α serosal“ mit „10 ng/ml IL-1 α serosal + 500 μ mol/l Phlorizin mukosal“;
- Vergleichspaar 5: Vergleich von „500 μ mol/l Phlorizin mukosal“ mit „10 ng/ml IL-1 α serosal + 500 μ mol/l Phlorizin mukosal“.

Eine alters- und fütterungsunabhängige grafische Darstellung der Vergleichspaare sind zum besseren Verständnis der I_{sc} -Verläufe im Anhang aufgeführt.

Für diese Paarungen wurden neben des maximalen Stromanstiegs innerhalb von 45 Minuten (Max45) auch die maximale Hemmung des Kurzschlussstromes innerhalb von zehn Minuten (Min10) nach Substanzzugabe bestimmt und verglichen.

Zur statistischen Berechnung wurde der T-Test für gepaarte Stichproben angewendet.

Aufgrund der geringen Stichprobe der einzelnen Altersgruppen wurde, basierend auf ähnlichen Reaktionen der Altersgruppen 14. und 28. LT sowie 31. und 35. LT, eine Zusammenfassung zu drei Altersgruppen vorgenommen:

- Altersgruppe 1: 14. und 28. LT („vor dem Absetzen“);
- Altersgruppe 2: 31. und 35. LT („kurz nach dem Absetzen“);
- Altersgruppe 3: 56. LT.

Nachfolgend werden zur fütterungsunabhängigen grafischen Darstellung die Mittelwerte \pm Standardabweichung des jeweiligen Versuchsansatzes gewählt. Die Kreise beschreiben jeweils die Lage der Stichprobenmittelwerte. Dargestellt werden lediglich die Vergleichspaare 1, 3, 4 und 5. Je nach Vergleichspaar werden die maximalen ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten oder die maximal gehemmten ΔI_{sc} -Werte innerhalb von zehn Minuten nach Substanzzugabe betrachtet.

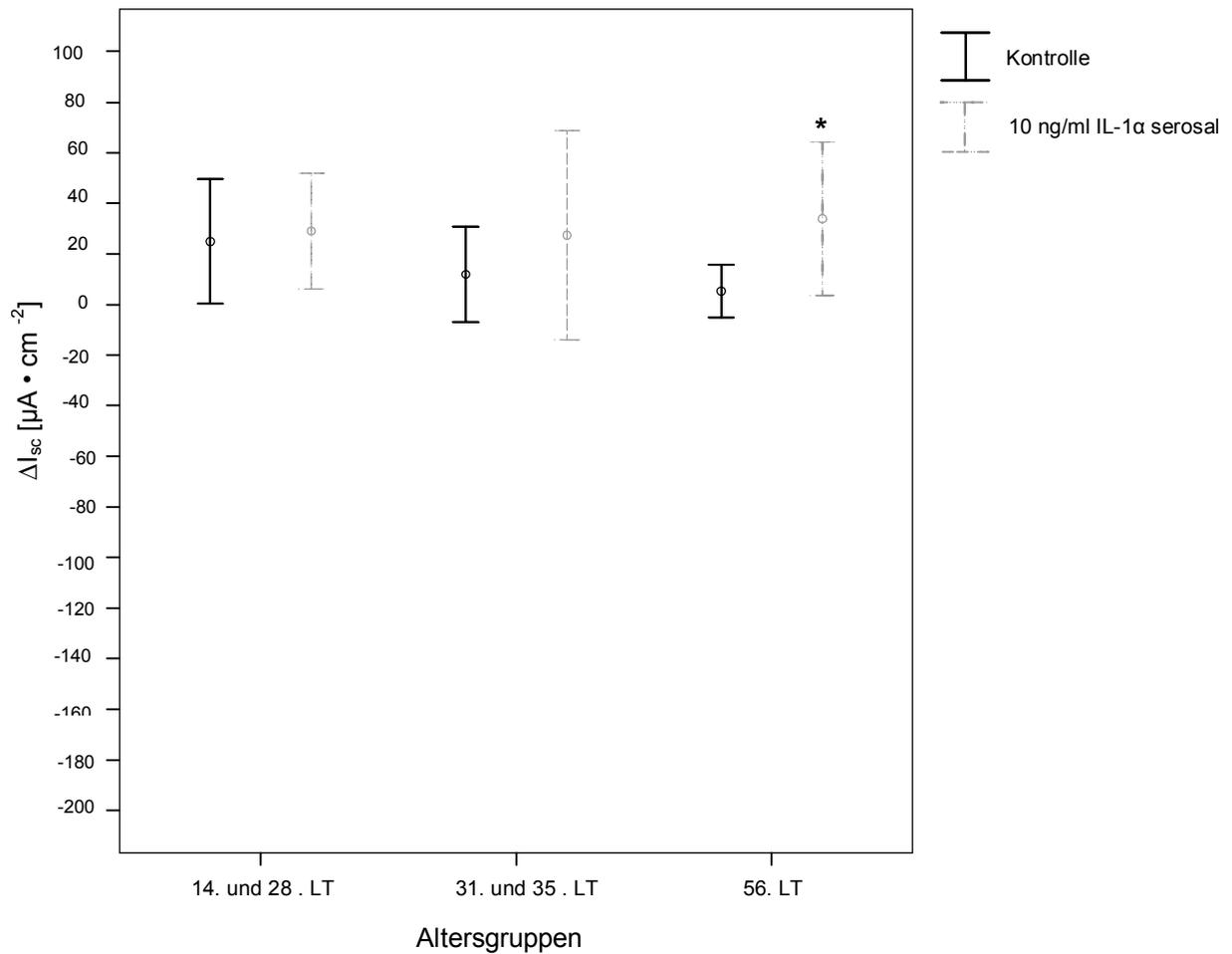


Abb. 38: Vergleich von ΔI_{sc} der 'Kontrolle' mit '10 ng/ml IL-1 α serosal' über die Altersgruppen [Messung des maximalen ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten; Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem * gekennzeichnet; $\alpha \leq 0,05$; zur Anzahl der Vergleichspaare siehe Tabelle 14]

Abbildung 38 zeigt, dass die Unterschiede in der Altersgruppe 1 (14. und 28. LT) deutlich geringer ausgeprägt sind als bei den Altersgruppen 2 (31. und 35. LT) und 3 (56. LT), wobei die ΔI_{sc} -Werte nach Zugabe von IL-1 α über denen der Kontrolle liegen. Signifikant unterscheiden sich aber lediglich die Werte in Altersgruppe 3 (56. LT).

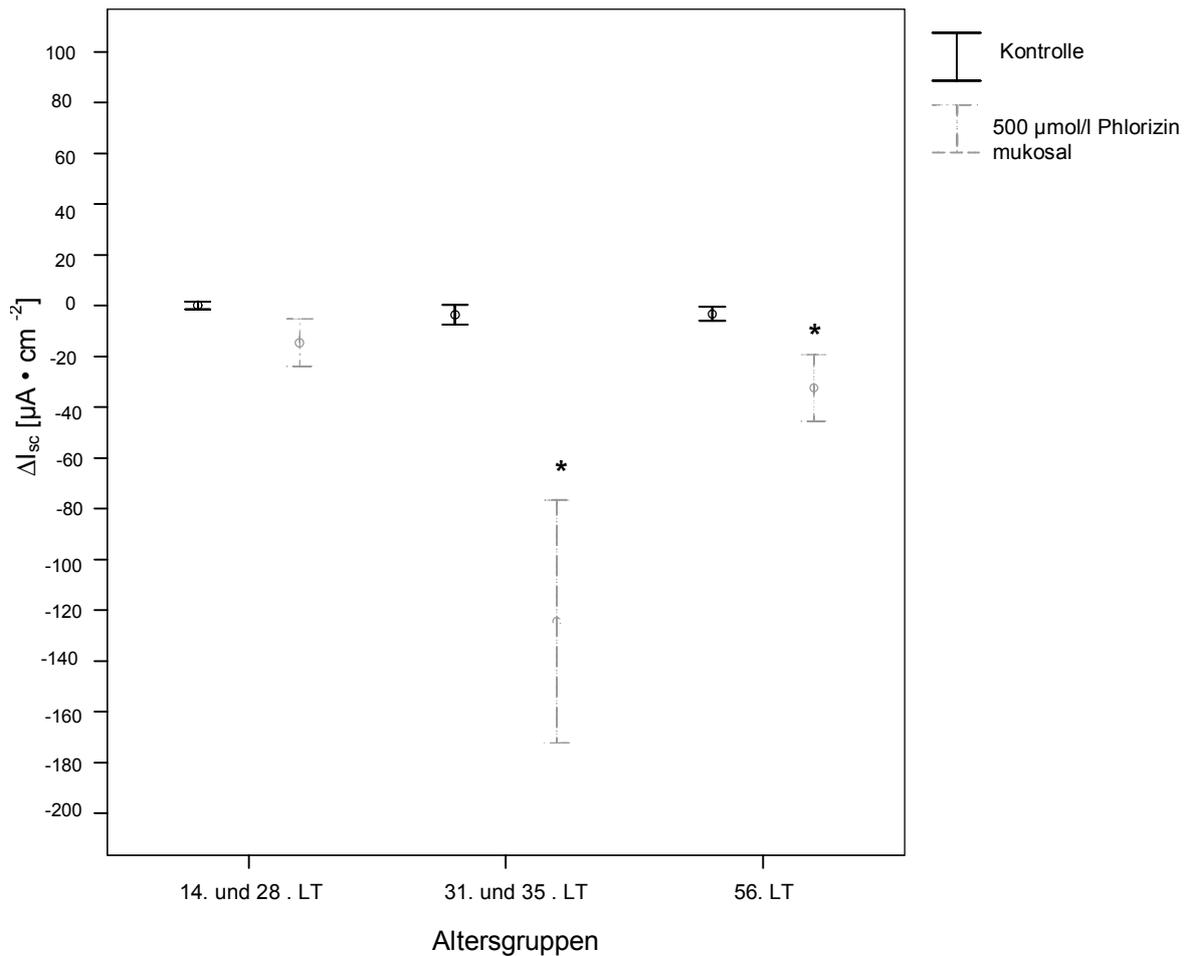


Abb. 39: Vergleich von ΔI_{sc} der 'Kontrolle' mit '500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal' über die Altersgruppen [Messung der maximalen Hemmung des ΔI_{sc} innerhalb von 10 Minuten; Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit einem * gekennzeichnet; $\alpha \leq 0,05$]

Phlorizin bewirkt innerhalb von zehn Minuten eine deutliche Hemmung des Kurzschlussstromes. In den Altersgruppen 2 (31. und 35. LT) und 3 (56. LT) ist der Unterschied zwischen Kontrolle und mit Phlorizin behandelten Epithelien signifikant.

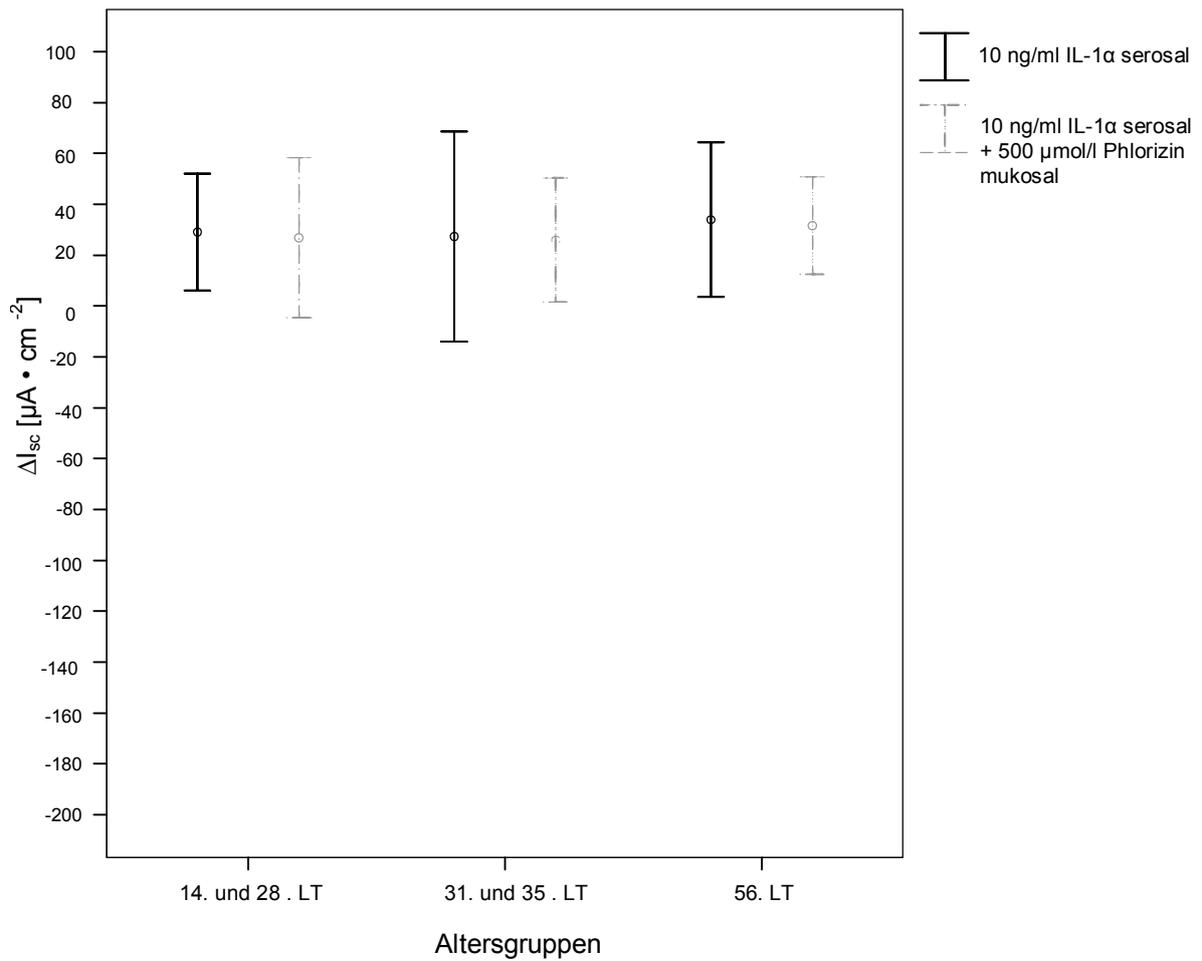


Abb. 40: Vergleich von ΔI_{sc} '10 ng/ml IL-1 α serosal' mit '10 ng/ml IL-1 α serosal + 500 μ mol/l Phlorizin mukosal' über die Altersgruppen [Messung des maximalen ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanzen; Mittelwerte \pm Standardabweichung; $\alpha \leq 0,05$]

In Abbildung 40 zeigen sich bei dem Vergleich von „10 ng/ml IL-1 α “ mit „10 ng/ml IL-1 α + 500 μ mol/l Phlorizin“ in keiner der Altersgruppen signifikante Unterschiede.

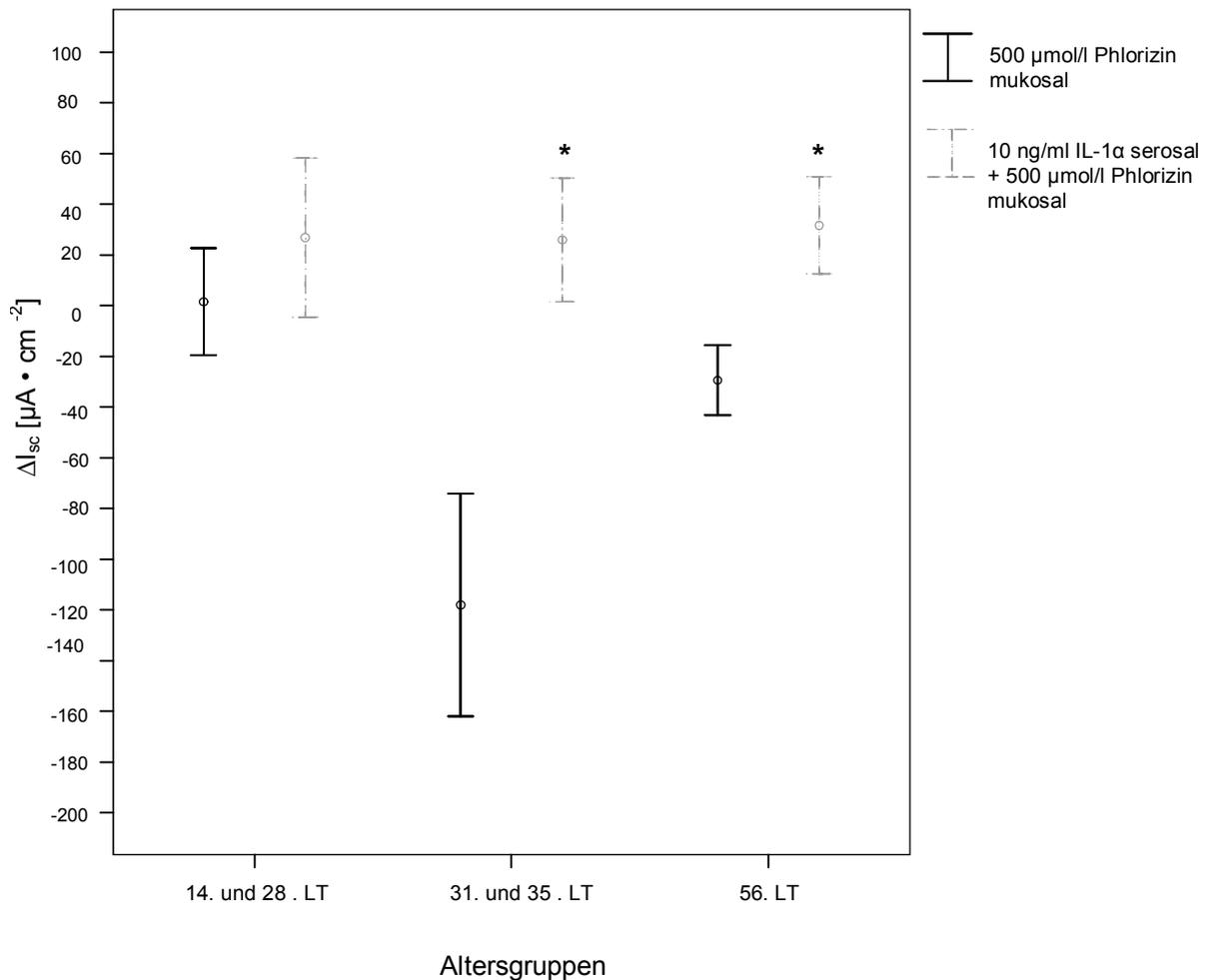


Abb. 41: Vergleich von ΔI_{sc} '500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal' mit '10 ng/ml IL-1 α serosal + 500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal' über die Altersgruppen [Maximum ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanzen; Mittelwerte \pm Standardabweichung; signifikante Unterschiede der Vergleichspaare sind mit einem * gekennzeichnet; $\alpha \leq 0,05$]

In Abbildung 41 sind in allen Altersgruppen deutliche Unterschiede zwischen den beiden Versuchsansätzen zu erkennen, wobei ebenfalls ein Alterseffekt deutlich wird. Signifikant unterscheiden sich aber lediglich die Altersgruppen 2 (31. und 35. LT) und 3 (56. LT).

Tabelle 14 zeigt im Gegensatz zu den grafischen Darstellungen die mittels T-Test ermittelten Differenzen der Mittelwerte mit zugehörigen 95%-Konfidenzintervalle für die einzelnen Vergleichsgruppen.

Tabelle 14: Differenz der Mittelwerte \pm 95%-Konfidenzintervall des ΔI_{sc} der Vergleichspaare bei fütterungsunabhängiger Betrachtung (Angaben für den niedrigsten Wert des ΔI_{sc} innerhalb von 10 Minuten (Min10) sowie den maximalen Peak des ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten (Max45) nach Substanzzugabe; N = Anzahl der Vergleichspaare; signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen der jeweiligen Vergleichspaare sind mit einem * gekennzeichnet; $\alpha \leq 0,05$)

Experiment: Altersgruppen:	Vergleich Kontrolle mit 10 ng/ml IL-1 α	Vergleich Kontrolle mit 10 ng/ml IL-1 α + 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleich Kontrolle mit 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleich 10 ng/ml IL-1 α mit 10 ng/ml IL- 1 α + 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleich 500 μ mol/l Phlorizin mit 10 ng/ml IL-1 α + 500 μ mol/l Phlorizin
Altersgruppe 1 (14. und 28. LT)					
Differenz der Mittelwerte Max45	-6,58	-11,33	22,17	10,72	24,06
95%-Konfidenzintervall Max45	[24,875; -38,042]	[9,130; -31,797]	[94,168; -49,835]	[45,298; -23,854]	[69,038; -20,927]
Differenz der Mittelwerte Min10	2,08	11,11	13,83	10,17	4,56
95%-Konfidenzintervall Min10	[7,546; -3,380]	[30,306; -8,083]	[87,953; -60,286]	[32,983; -12,650]	[15,798; -6,687]
Berechnungsgrundlage	N = 4	N = 3	N = 2	N = 3	N = 3
Altersgruppe 2 (31. und 35. LT)					
Differenz der Mittelwerte Max45	-15,42	-23,89	119,22 *	-4,56	143,11 *
95%-Konfidenzintervall Max45	[9,600; -40,434]	[10,570; -58,348]	[155,654; 82,791] *	[53,701; -62,812]	[194,151; 92,071] *
Differenz der Mittelwerte Min10	0,88	95,67 *	117,50 *	95,67 *	21,83
95%-Konfidenzintervall Min10	[4,572; -2,805]	[122,294; 69,040] *	[155,254; 79,746] *	[117,441; 73,893] *	[51,648; -7,981]
Berechnungsgrundlage	N = 10	N = 6	N = 6	N = 6	N = 6
Altersgruppe 3 (56. LT)					
Differenz der Mittelwerte Max45	-28,40 *	-25,50	32,11 *	2,39	57,61 *
95%-Konfidenzintervall Max45	[-6,835; -49,965] *	[16,553; -67,553]	[48,471; 15,752] *	[75,220; -70,442]	[114,503; 0,719] *
Differenz der Mittelwerte Min10	-1,63	23,28	26,33 *	25,17	3,06
95%-Konfidenzintervall Min10	[0,208; -3,475]	[71,515; -24,960]	[47,863; 4,804] *	[71,779; -21,445]	[33,101; -26,990]
Berechnungsgrundlage	N = 5	N = 3	N = 3	N = 3	N = 3

Bei Betrachtung von „10 ng/ml IL-1 α “ mit „10 ng/ml IL-1 α + 500 μ mol/l Phlorizin“ ist lediglich für Altersgruppe 2 (31. und 35. LT) ein signifikanter Unterschied bezüglich der maximalen

Hemmung des ΔI_{sc} innerhalb von zehn Minuten nach Versuchsbeginn festzustellen. Diese Beobachtung könnte mit einer höheren Empfindlichkeit des SGLT-1-Transporters auf Stimuli zum Zeitpunkt des Absetzens der Ferkel vom Muttertier zusammenhängen.

Ein Vergleich von „500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin“ mit „10 ng/ml IL-1 α + 500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin“ zeigt für die Altersgruppen 2 (31. und 35. LT) und 3 (56. LT) für die ΔI_{sc} -Peaks innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanzen signifikante Unterschiede. Bei beiden Altersgruppen ist der Anstieg im Kurzschlussstrom nach Zugabe von „10 ng/ml IL-1 α + 500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin“ annähernd gleich. Die hemmende Wirkung durch die alleinige Zugabe von „500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin“ ist allerdings bei Altersgruppe 2 (31. und 35. LT) wesentlich stärker ausgeprägt als bei Altersgruppe 3 (56. LT).

Abbildung 42 zeigt die alters- und fütterungsunabhängige Darstellung der jeweiligen maximalen Peaks im ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanzen in Form von Fehlerbalken (gepaarte Differenzen der Vergleichspaare; Mittelwertdifferenzen \pm 95%-Konfidenzintervalle). Die Kreise beschreiben jeweils die Lage der Stichprobenmittelwerte. Die Anzahl der Versuche (N) sind der Tabelle 15 zu entnehmen.

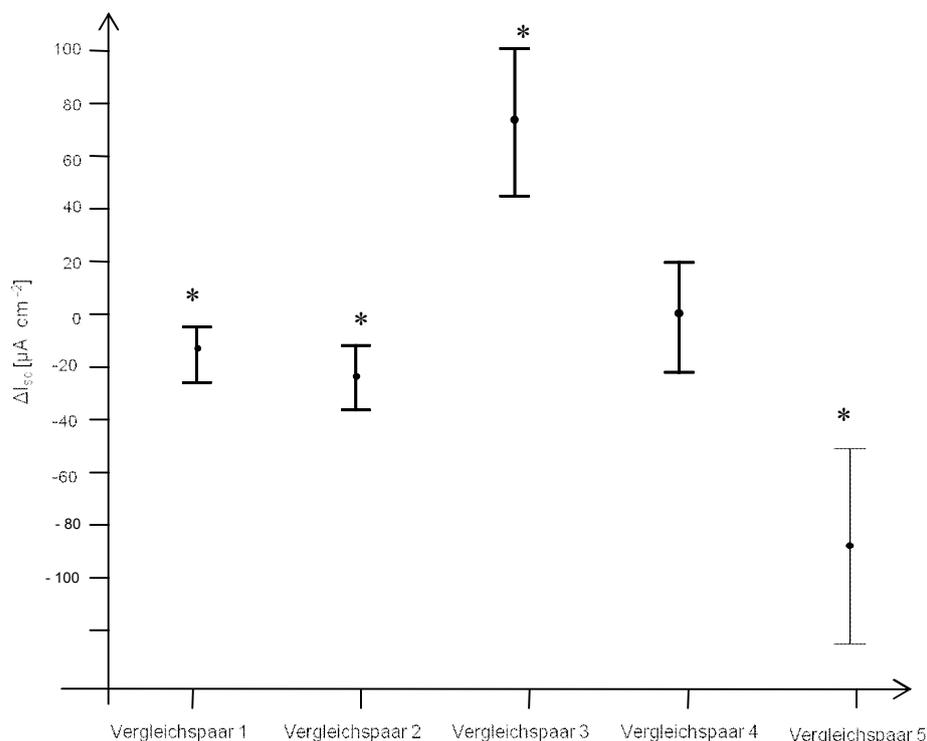


Abb. 42: Alters- und fütterungsunabhängige Darstellung der Vergleichsgruppen, Maximum ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe der entsprechenden Substanzen [Mittelwertdifferenzen \pm 95%-Konfidenzintervall; signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der jeweiligen Vergleichspaare sind mit einem * gekennzeichnet; $\alpha \leq 0,05$]

Die mittels T-Test ermittelten und in Abbildung 42 dargestellten Differenzen der Mittelwerte mit den zugehörigen 95%-Konfidenzintervallen des ΔI_{sc} für die alters- und

fütterungsunabhängige Betrachtung der Vergleichspaare können der Tabelle 15 entnommen werden. Tabelle 16 zeigt die entsprechenden Werte für die maximale Hemmung innerhalb von 10 Minuten nach Zugabe von Phlorizin.

Tabelle 15: Differenz der Mittelwerte \pm 95%-Konfidenzintervall des ΔI_{sc} der Vergleichspaare bei alters- und fütterungsunabhängiger Betrachtung (Angaben für den maximalen Peak des ΔI_{sc} innerhalb von 45 Minuten (Max45) nach Substanzzugabe; N = Anzahl der Vergleichspaare; signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen der jeweiligen Vergleichspaare sind mit einem * gekennzeichnet; $\alpha \leq 0,05$)

Experiment: Ergebnisse:	Vergleichspaar 1 Kontrolle mit 10 ng/ml IL-1 α	Vergleichspaar 2 Kontrolle mit 10 ng/ml IL-1 α + 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleichspaar 3 Kontrolle mit 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleichspaar 4 10 ng/ml IL-1 α mit 10 ng/ml IL- 1 α + 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleichspaar 5 500 μ mol/l Phlorizin mit 10 ng/ml IL-1 α + 500 μ mol/l Phlorizin
Differenz der Mittelwerte Max45	-16,97 *	-21,15 *	77,82 *	1,00	-91,97 *
95%-Konfidenzintervall Max45	[-3,296; -30,651]	[-5,719; -36,587]	[113,95; 41,69]	[26,694; -24,694]	[-133,328; -50,616]
Versuche	N = 19	N = 12	N = 11	N = 12	N = 12

Tabelle 16: Differenz der Mittelwerte \pm 95%-Konfidenzintervall des ΔI_{sc} der Vergleichspaare bei alters- und fütterungsunabhängiger Betrachtung (Angaben für die maximale Hemmung des ΔI_{sc} innerhalb von zehn Minuten (Min10) nach Substanzzugabe; N = Anzahl der Vergleichspaare; signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen der jeweiligen Vergleichspaare sind mit einem * gekennzeichnet; $\alpha \leq 0,05$)

Experiment: Ergebnisse:	Vergleichspaar 1 Kontrolle mit 10 ng/ml IL-1 α	Vergleichspaar 2 Kontrolle mit 10 ng/ml IL-1 α + 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleichspaar 3 Kontrolle mit 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleichspaar 4 10 ng/ml IL-1 α mit 10 ng/ml IL- 1 α + 500 μ mol/l Phlorizin	Vergleichspaar 5 500 μ mol/l Phlorizin mit 10 ng/ml IL-1 α + 500 μ mol/l Phlorizin
Differenz der Mittelwerte Min10	0,47	56,43 *	73,79 *	56,67 *	12,82
95%-Konfidenzintervall Min10	[2,50; -1,55]	[85,350; 27,512]	[111,850; 35,726]	[84,831; 28,502]	[26,829; -1,190]
Versuche	N = 19	N = 12	N = 11	N = 12	N = 12

Signifikante Unterschiede sind bezüglich der ΔI_{sc} -Peaks innerhalb von 45 Minuten nach Zugabe der entsprechenden Substanzen für alle Vergleichspaare, mit Ausnahme des Vergleichspaares 4, festzustellen. Bei Messung der maximalen Hemmung des ΔI_{sc} innerhalb von zehn Minuten nach Versuchsbeginn zeigen sich, mit Ausnahme von den Vergleichspaaren 1 und 5, signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichspaaren.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

4.4.1 Ergebniszusammenfassung: PGE₂

Nachfolgend werden die Epithelreaktionen auf unterschiedliche Konzentrationen serosal zugegebenen PGE₂ kurz zusammengefasst:

- Die Effekte des ΔI_{sc} der Faktoren 'Tier', 'Konzentration' und 'Alter' sind auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant.
- Die Fütterungsgruppen unterscheiden sich nicht signifikant.
- Bei 70 % der Vergleiche liegt der mittlere ΔI_{sc} der Kontroll-Gruppe über dem der entsprechenden Alters- und Konzentrationsgruppe der Probiotika-Gruppe, wobei alle Tiere der Probiotika-Gruppe am 14. und 28. LT niedrigere Zunahmen des ΔI_{sc} aufweisen als in der Kontroll-Gruppe.

Konzentrationseffekt:

- Mit Anstieg der einzelnen PGE₂-Konzentrationen nimmt auch die Höhe der Reaktion des I_{sc} zu.

Alterseffekt:

- Beide Fütterungsgruppen weisen am 31. und 35. LT bei den Konzentrationen $0,5 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ und $3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ signifikante höhere ΔI_{sc} -Werte als an den anderen Lebensstagen auf.

Kinetik:

- Am 28. LT liegt der K_m -Wert der Probiotika-Gruppe signifikant über, am 56. LT signifikant unter dem Wert der Kontroll-Gruppe.
- Der V_{max} -Wert der Probiotika-Gruppe liegt bei der Altersgruppe 31. LT signifikant über, am 56. LT signifikant unterhalb des entsprechenden Wertes der Kontroll-Gruppe.
- Die 95%-Konfidenzintervalle sind bezüglich K_m bei der Probiotika-Gruppe am 14. und 28. LT größer als in der Kontroll-Gruppe.
- Bei fütterungsunabhängiger Betrachtung nehmen K_m und V_{max} mit den Lebensstagen bis zum 35. LT kontinuierlich zu.

4.4.2 Ergebniszusammenfassung: Glucose

Die Reaktionen des Dünndarmepithels auf unterschiedliche Konzentrationen mukosal zugegebener Glucose lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Effekte des ΔI_{sc} der Faktoren 'Tier', 'Alter' und 'Konzentration' sind auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant.
- Der Faktor 'Fütterung' ist nicht signifikant.
- Beim Vergleich der mittleren ΔI_{sc} liegen genau 50% der Kontroll-Gruppe über dem der entsprechenden Alters- und Konzentrationsgruppe der Probiotika-Gruppe respektive umgekehrt. Am 35. LT weisen allerdings alle Tiere der Probiotika-Gruppe höhere Zunahmen des ΔI_{sc} auf als in der Kontroll-Gruppe.

Konzentrationseffekt:

- Eine Erhöhung der Glucosekonzentration bewirkt eine Zunahme im ΔI_{sc} .

Alterseffekt:

- Bei fütterungs- und altersabhängiger Betrachtung der einzelnen Konzentrationen weisen der 31. und 35. LT signifikant höhere ΔI_{sc} -Werte als bei allen anderen Altersgruppen auf.

Kinetik:

- K_m und V_{max} liegen bei der Probiotika-Gruppe am 31.LT signifikant über den entsprechenden Werten der Kontroll-Gruppe.
- Am 56. LT weist die Kontrolle signifikant höhere K_m - und V_{max} -Werte als die Probiotika-Gruppe auf.
- Bei Zusammenfassung der Fütterungsgruppen weisen die Altersgruppen bezüglich K_m keine signifikanten Unterschiede auf. Bei V_{max} wird ein signifikanter Unterschied vor allem des 31. und 35. LT zu den anderen Altersgruppen deutlich.

4.4.3 Ergebniszusammenfassung: L-Glutamin

Bezüglich der mukosalen Zugabe von $12 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-Glutamin konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

- Der Effekt der Faktoren 'Alter' und 'Tier' ist auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant.
- Der Faktor 'Fütterung' zeigt keine signifikanten Effekte auf den I_{sc} als Reaktion auf Zugabe von L-Glutamin.
- Die mittleren ΔI_{sc} -Werte der Kontrolle liegen zu 60 % über denen der Probiotika-Gruppe.

Alterseffekt:

- In beiden Fütterungsgruppen liegen die ΔI_{sc} bei den Altersgruppen 31. und 35. LT signifikant über den ΔI_{sc} der anderen Altersgruppen.

4.4.4 Ergebniszusammenfassung: diverse Konzentrationen von Interleukin-1 α

Die Konzentration 10 ng/ml IL-1 α zeigt die deutlichsten Effekte auf den Kurzschlussstrom und wird daher als Konzentration für die weiteren Versuche ausgewählt.

4.4.5 Ergebniszusammenfassung: Interleukin-1 α mit Phlorizin

- Aufgrund des geringen Stichprobenumfanges werden beide Fütterungsgruppen für die Versuchsauswertung zusammengefasst.
- Die serosale Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α führt beim Vergleich mit der Kontrolle zu einem Anstieg im ΔI_{sc} .
- Die mukosale Zugabe von 500 μ mol/l Phlorizin führt beim Vergleich mit der Kontrolle zu einer Hemmung des ΔI_{sc} .
- Bei simultaner Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α serosal und 500 μ mol/l Phlorizin mukosal kann ein Effekt von IL-1 α auf ΔI_{sc} (Anstieg im Zeitverlauf) nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass Phlorizin nur zu einer teilweisen bzw. zeitlich begrenzten Hemmung der IL-1 α -Wirkung führt.

5. Diskussion

Bevor nachfolgend die Ergebnisse der einzelnen Versuchsansätze diskutiert werden, wird zunächst, zum besseren Verständnis der Ergebnisse und deren Interpretation, auf den Versuchsaufbau kritisch eingegangen.

5.1 Diskussion der Methode

5.1.1 Haltung und Fütterung der Versuchstiere

Die Haltung und Fütterung der Tiere erfolgte im Institut für Tierernährung der Freien Universität Berlin. Die Kontroll- und Probiotika-Tiere wurden dabei unter gleichen Bedingungen, jedoch in voneinander getrennten Abteilungen gehalten. Das Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 wurde vom ersten bis zum 34. LT jedem Tier direkt oral mittels Spritze eingegeben. Um zu vermeiden, dass es aufgrund der Eingabe stressbedingte Beeinflussungen der Tiere gab, wurde die Kontroll-Gruppe gleich behandelt, wobei hier eine Glucoselösung als Placebo diente. Vom 15. LT an erhielten alle Ferkel zusätzlich zur oralen Gabe Saugferkelergänzungsfutter, wobei dem Futter der Probiotika-Gruppe *E. faecium* NCIMB 10415 in definierter Menge zugesetzt wurde (siehe Kapitel 3. *Tiere, Material und Methoden*). Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass jahreszeitliche Beeinflussungen eine Auswirkung auf die Tiere hatten oder aber bei der Probiotika-Gruppe eine unterschiedliche Futteraufnahme der Wurfgeschwister und damit eine unterschiedlich hohe Menge an aufgenommenem Probiotikum vorlagen.

Es wurden ausschließlich klinisch gesunde Tiere ausgewählt, wobei versucht wurde je Altersgruppe sowohl für die Kontroll- als auch für die Probiotika-Gruppe entweder männliche oder weibliche Tiere in die Untersuchung aufzunehmen, um so eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Aufgrund der unterschiedlichen Wurfgrößen konnte dies jedoch nicht immer realisiert werden. Daher ist eine durch das Geschlecht bedingte Beeinflussung der Versuchsergebnisse nicht ausgeschlossen.

Zur Vermeidung negativer Einflüsse auf die Ergebnisse wurden bezüglich der Epithelien und der Tiere mehrere Auswahlkriterien getroffen. Zeigten die Tiere eine Veränderung der Kotkonsistenz, so wurden bei Durchfall mit Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens die Tiere vom Versuch ausgeschlossen. War alleinig die Kotkonsistenz leicht verändert, die Tiere aber vom Allgemeinbefinden ungestört, so wurden sie mit in die Versuche aufgenommen. Bei einigen dieser Tiere zeigte sich bei der Präparation des Darmes ein schleimiger Belag auf der Mukosa, der durch vorsichtiges Schwenken in der Pufferlösung abgewaschen wurde, ohne die Mukosa zu beeinträchtigen. Wenn diese Vorbehandlung nicht

möglich war, wurden diese Epithelien aus der Auswertung herausgenommen. Ebenso wurde mit Epithelien verfahren, die bereits adspektorisch Auffälligkeiten aufwiesen und in der Auswertung deutlich abweichende Werte zeigten.

5.1.2 Versuchstiertötung und Versuchsablauf

Die Tötung der Versuchstiere sowie der Transport des Epithels erfolgten wie in den Versuchen von Jansen (2004). Nach Sedierung der ausgewählten Tiere mit einer Kombination aus Ketamin[®] 10% (Wirkstoff Ketaminhydrochlorid) und Stressnil[®] (Wirkstoff Azaperon) erfolgte im Versuchsraum nach Vertiefung der Narkose durch intraperitoneale Gabe von Eutha 77[®] (Wirkstoff Pentobarbital-Natrium) die Eröffnung der Bauchhöhle und die Entnahme des mittleren Dünndarmes für die eigenen Versuche. Nach Abschluss der Probenentnahme für alle beteiligten Institute wurde das Versuchstier durch die intravenöse Gabe von Eutha 77[®] schmerzlos getötet. Die zeitliche Dauer bis zur erforderlichen Narkosetiefe, die eine schmerzlose Eröffnung der Bauchhöhle ermöglichte, gestaltete sich unterschiedlich lange. Zum Teil betrug die Zeitspanne zwischen Narkose und Entfernen des benötigten Darmabschnittes zehn Minuten, es gab aber auch Versuchstage, an denen sich Verzögerungen von bis zu 30 Minuten ergaben, bevor der Darm entfernt werden konnte. Bei diesen Epithelien wurde auch im nachfolgenden Ussing-Kammer-Versuch eine teilweise deutliche Beeinträchtigung der Reaktionen des Kurzschlussstroms beobachtet, die zum Ausschluss bei der Auswertung führte (siehe *3.6.1 Kriterien zur Aufnahme in die Auswertung*).

Direkt nach Entnahme des Darmes im Versuchsraum des Instituts für Tierernährung wurde dieser zunächst in 38 °C warmen und mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begasten Transportpuffer verbracht, der Indomethacin in einer Dosierung von 2,8 µmol/l enthielt. Ziel war es, durch Indomethacin, als nicht-selektiven Inhibitor der Cyclooxygenase, die endogene Prostaglandinsynthese zu unterdrücken, um für die nachfolgenden PGE₂-Versuche Verfälschungen infolge dieser endogenen Prostaglandinbildung zu vermeiden. Nachdem die anderen Darmabschnitte an die beteiligten Institute aufgeteilt waren, wurden für die eigenen Versuche von dem Darm die *Serosa* sowie die darunter befindlichen Muskelschichten entfernt (sogenanntes 'Strippen'), das Darmrohr gewebeschonend eröffnet und die präparierten Darmteile in ein mit Transportpuffer (versetzt mit Indomethacin) gefülltes Dewargefäß verbracht und weiterhin begast. Je nach Altersgruppe gestaltete sich das 'Strippen' des Darmes unterschiedlich schwierig. Vor allem bei Tieren des 14. LT erschien der Darm sehr fragil, so dass eine negative Beeinflussung des Epithels durch die mechanische Belastung nicht ausgeschlossen werden konnte.

Vom Zeitpunkt der Präparation bis zum Einbauen des letzten Epithels in die Ussing-Kammer im Versuchslabor des Instituts für Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin vergingen zwischen 30 und 60 Minuten. Direkt nach Ankunft im Versuchslabor wurden die Epithelien in mit Carbogen begasten Mannitpuffer zum Spülen verbracht. Dabei enthielt der Mannitpuffer des für die PGE₂-, Glucose- und L-Glutamin-Versuche bestimmten Darmes weiterhin Indomethacin (1,4 µmol/l), der für die Versuche mit IL-1α verwendete Mannitpuffer enthielt kein Indomethacin mehr. Ein weiterer Pufferwechsel erfolgte nach dem Einspannen in die Ussing-Kammern.

Mit Hilfe der Technik nach Ussing und Zehran (1951) ist es möglich, repräsentative Rückschlüsse auf die *in vivo*-Situation zu ziehen, auch wenn die *in vivo*-Bedingungen natürlich nur bedingt nachgestellt werden können. Um den einzelnen Epithelien die Adaptation an die neuen Bedingungen zu ermöglichen und Messfehler durch die Anpassung zu vermeiden, wurde nach dem Einspannen der Epithelien in die Kammern und nach Zugabe der jeweiligen Pufferlösungen zehn Minuten bis zur Applikation des Kurzschlussstromes gewartet. Unter Kurzschlussbedingungen wurden passive Ionenströme sowie der elektrische Gradient ausgeschaltet, so dass der gemessene Kurzschlussstrom auf eine aktive Ionenbewegung zurückzuführen war. Dadurch konnte angenommen werden, dass ein positiver Kurzschlussstrom (gemessen als negativer Klemmenstrom) entweder durch eine Kationenresorption und/oder durch eine Anionensekretion sowie ein negativer Kurzschlussstrom (positiver Klemmenstrom) durch eine Kationensekretion und/oder eine Anionenresorption verursacht wurde (Scheffler, 1984). Diese Technik erlaubte damit die Untersuchung absorptiver und sekretorischer Vorgänge an Epithelien.

Die verwendeten Epithelien wurden anhand von zuvor festgelegten Ausschlusskriterien ausgewählt (siehe dazu Kapitel 3.6.1 *Kriterien zur Aufnahme in die Auswertung*).

5.1.3 Berechnung und Auswertung der Daten

Die Erfassung des Kurzschlussstroms erfolgte über die gesamte Versuchsdauer alle sechs Sekunden, um mögliche Veränderungen im Zeitverlauf exakt erfassen zu können. Die Verwendung des ΔI_{sc} für die jeweiligen Berechnungen ermöglichte die Vergleichbarkeit aller Epithelien, da dadurch die relativen Veränderungen, unabhängig von den basalen Kurzschlussströmen, berücksichtigt wurden.

Dass es sich bei der PGE₂-stimulierten Ionensekretion beziehungsweise bei dem Na⁺-abhängigen Glucosetransporter um sättigbare Reaktionen handelt, wurde in vorangegangenen Versuchen bereits bestätigt (Lodemann et al., 2003). In Anlehnung an die Arbeit von Lorenz (2006) mit dem Probiotikum *Bacillus cereus* var. *toyoi*, in der bezüglich

PGE₂, Glucose und L-Glutamin der gleiche Versuchsaufbau verwendet wurde, erfolgte auch in der vorliegenden Dissertation die Berechnung von K_m und V_{max} anhand der Michaelis-Menten-Gleichung, indem zunächst mittels linearer Regression Startwerte für die gegenüber Extremwerten stabilere nichtlineare Regression ermittelt wurden. Die Bildung der Gesamtregression ermöglichte einerseits eine höhere Genauigkeit der Ergebnisse. Andererseits ergaben sich aber auch, wie in den Untersuchungen von Lorenz (2006), Probleme bei der direkten Vergleichbarkeit der 95%-Konfidenzintervalle infolge der unterschiedlichen Gruppengrößen. Daher wurden die in den Versuchen für die Einzeltiere mittels nichtlinearer Regression gewonnenen Ergebnissen für K_m und V_{max} der Varianzanalyse unterzogen. Die Ergebnisse der einzelnen Lebensstage wurden sowohl fütterungsabhängig als auch fütterungsunabhängig ausgewertet.

Die Darstellung der Ergebnisse aus den Versuchen mit PGE₂, Glucose, L-Glutamin sowie IL-1 α erfolgte anhand von Mittelwerten \pm Standardabweichung sowie zum Teil mittels Boxplots mit Medianen und zugehörigen 25 %- und 75 %-Perzentilen. Wiesen die Fütterungsgruppen keine Unterschiede auf, wurden diese für die weitere Auswertung zusammengefasst und die Beeinflussung durch die Fütterung vernachlässigt. Für die Verwendung von Boxplots für die Versuchsdarstellung der Reaktionen des I_{sc} auf unterschiedliche Konzentrationen von PGE₂ und Glucose ist normalerweise eine Stichprobe von $n \geq 6$ notwendig. Diese Anzahl wurde zum Teil deutlich unterschritten. Dennoch wurde diese Art der Darstellung gewählt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der Beeinflussung der PGE₂-stimulierten Sekretion durch *E. faecium* NCIMB 10415

Das Prostaglandin PGE₂ bewirkt eine Stimulierung der Chloridsekretion über die Erhöhung von cAMP mit nachfolgender Öffnung von Chloridkanälen, wie den CFTR (Barrett und Keely, 2000). Der Transport von Chloridionen verursacht dabei einen osmotisch bedingten Wassertransport (Leonhard-Marek et al., 2009). Durch die Chloridsekretion wird in der technischen Apparatur Ussing-Kammer eine messbare Erhöhung des Kurzschlussstromes bewirkt. Laut Arbeitshypothese war zu prüfen, ob die Zugabe des probiotischen Keimes *E. faecium* NCIMB 10415 eine Reduktion der PGE₂-induzierten Chloridsekretion im mittleren *Jejunum* des Schweines bewirkt.

5.2.1.1 Reaktion des Kurzschlussstroms auf serosale Zugaben steigender PGE₂-Konzentrationen

Zur Untersuchung der sekretorischen Wirkung von PGE₂ wurden serosal vier unterschiedliche Konzentrationen zugegeben, deren Effekte auf das *Jejunum* bereits in vorangegangenen Versuchen untersucht wurden (Jansen, 2004; Lodemann et al., 2006; Lorenz, 2006; Unmack et al., 2001). Nachfolgend werden die Ergebnisse nach Konzentrations-, Fütterungs- und Alterseffekt betrachtet und diskutiert. Die Diskussion der Kinetik erfolgt in einem separaten Kapitel.

In der von uns durchgeführten Untersuchung ergaben sich signifikante Unterschiede bezüglich der Faktoren 'Konzentration' und 'Alter'. Der Faktor 'Fütterung' erwies sich hingegen als nicht signifikant.

- Konzentrationseffekt:

Die Stimulierung der Chloridsekretion mit PGE₂ zeigte unabhängig von Alter und Fütterung eine Zunahme des ΔI_{sc} mit steigender PGE₂-Konzentration. Der größte stimulierende Effekt konnte bei einer Konzentration von $3 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ PGE₂ erzielt werden. Diese Beobachtungen wurden auch bei Lodemann et al. (2006) gemacht.

- Fütterungseffekt:

Die Fütterungsgruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Vielmehr zeigte sich hier eine Beeinflussung der Fütterungseffekte durch das Alter der Tiere sowie die Konzentration an PGE₂, so dass die mittleren ΔI_{sc} der Probiotika-Gruppe, beeinflusst durch die anderen Faktoren, mal oberhalb, mal unterhalb der entsprechenden Werte der Kontroll-Gruppe lagen. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit den Veröffentlichungen von Jansen (2004) mit *E. faecium* NCIMB 10415 sowie von Lorenz (2006) mit dem Probiotikum *Bacillus cereus* var. *toyoi*. Auch in diesen Arbeiten zeigten sich Beeinflussungen des mittleren ΔI_{sc} durch die Faktoren 'Konzentration' und 'Alter', der Faktor 'Fütterung' war hier ebenfalls nicht signifikant. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Winckler et al. (1998) sowie Krammer et al. (1993) eine Reduzierung des PGE₂-Effektes auf den I_{sc} durch die Supplementierung des Probiotikums *Saccharomyces boulardii*. Eine Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse in der Wirkung könnte in den verschiedenartigen Wirkungsbereichen der jeweiligen Probiotika auf den Organismus (Immunologie, Wachstum, Transportphysiologie etc.) liegen. In vorhergehenden Projekten der DFG konnten durch die Supplementierung von *E. faecium* NCIMB 10415 und *B. cereus* var. *toyoi* signifikant positive Effekte auf die Durchfallhäufigkeit von Absatzferkeln festgestellt werden, wobei zu beachten ist, dass in diesen Versuchen auch bereits die

Muttersauen während der Trächtigkeit das Probiotikum erhielten (Simon, 2012; Taras et al., 2006).

- Alterseffekt:

Im Gegensatz zur Fütterung ergaben sich, wie in den Versuchen von Lodemann et al. (2006), signifikante altersabhängige Unterschiede. Vor allem am 31. und 35. LT zeigten die Versuchstiere bei beiden Fütterungsgruppen signifikant höhere ΔI_{sc} im Vergleich zu den anderen Altersgruppen. Die bezüglich des Faktors 'Alter' gewonnenen Daten stimmen teilweise mit den Versuchen von Jansen (2004) überein, in denen die höchsten ΔI_{sc} -Werte am 14. und 35. LT (der 31. LT wurde in dieser Studie nicht berücksichtigt) gemessen wurden. In der vorliegenden Arbeit fielen nach serosaler Zugabe von PGE_2 bei beiden Fütterungsgruppen die deutlich höheren mittleren ΔI_{sc} -Werte am 31. LT auf. Dies könnte mit dem Absetzen der Ferkel am Übergang vom 28. auf den 29. LT in Verbindung stehen. Auch in anderen Studien zur Untersuchung der Chloridsekretion im Dünndarm zeigten sich bei Absatzferkeln höhere Basis-Kurzschlussströme im Vergleich zu Saugferkeln und Mastschweinen (Leonhard-Marek et al., 2009). Darüber hinaus wiesen auch andere Arbeiten bezüglich der (mittels 5-Hydroxytryptamin bzw. des Vasoaktiven Intestinalen Polypeptids stimulierten) Sekretion einen Alterseffekt auf, wobei sich ebenfalls bereits die basalen I_{sc} verschiedener Altersgruppen deutlich unterschieden (7.-11. LT > 6-8 Wochen > 13-15 Wochen) (Erlwanger et al., 1999; Grondahl et al., 1996). In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass Ferkel empfänglicher für eine sekretorische Diarrhøe sind als erwachsene Schweine (McEwan et al., 1990). Der genaue Grund dafür ist noch unbekannt. Es wird vermutet, dass es mit zunehmendem Alter zu einer Abnahme des Wachstums pathogener *E. coli* sowie deren Adhäsion im Darm kommt, die Darmwand darüber hinaus weniger empfänglich für das *E. coli* Enterotoxin wird und die sekretorische Kapazität der Darmepithelzellen abnimmt (McEwan et al., 1990).

5.2.1.2 Kinetik der PGE_2 -stimulierten Sekretion

Bei serosaler Zugabe aufsteigender PGE_2 -Konzentrationen zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt auf den Kurzschlussstrom. Diese Tatsache ließ die Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante K_m und der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} zu. Bei der Kinetik zeigten sich bezüglich K_m und V_{max} zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungs- und Altersgruppen.

Bei Betrachtung des Fütterungseffektes auf die Chloridsekretion lag der K_m am 28. LT bei der Probiotika-Gruppe signifikant höher als bei der Kontrolle-Gruppe. Der 14. LT unterschied sich in beiden Fütterungsgruppen nur marginal. Die gleiche Beobachtung wurde auch in den

Versuchen von Lorenz (2006) gemacht. In der gleichen Studie erreichten, mit Ausnahme des 28. LT, alle Tiere der Probiotika-Gruppe bereits bei niedrigeren PGE_2 -Konzentrationen $V_{\max}/2$ und reagierten somit empfindlicher auf eine Stimulierung der Sekretion. Der V_{\max} lag in der vorliegenden Arbeit bei der Probiotika-Gruppe unterhalb der entsprechenden Werte der Kontroll-Gruppe, eine Ausnahme stellte lediglich der 31. LT dar, an dem der V_{\max} der Probiotika-Gruppe signifikant über der Kontroll-Gruppe lag. Am 56. LT wiesen hingegen sowohl V_{\max} als auch K_m in der Kontrolle signifikant höhere Werte als bei der Probiotika-Gruppe auf. Da V_{\max} durch die Anzahl der Transporter bestimmt wird (Wright et al., 1997), kann also eine höhere Anzahl an Chloridtransportern oder eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Kanals am 31. und eventuell auch am 35. LT vermutet werden. Dass am 31. und 35. LT die mit *E. faecium* NCIMB 10415 supplementierten Tiere kleinere 95%-Konfidenzintervalle sowohl bei K_m als auch bei V_{\max} aufwiesen als die Kontrolltiere, könnte auf einen stabilisierenden Effekt des Probiotikums auf den Darm gerade zum Zeitpunkt des Absetzens hindeuten.

Bei fütterungsunabhängiger Betrachtung wies V_{\max} im Gegensatz zu K_m signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen auf.

Über die Altersgruppen war ein stetiger Anstieg von K_m bis einschließlich des 35. LT zu beobachten. Am 56. LT sank K_m wieder deutlich ab. V_{\max} zeigte am 14. und 28. LT annähernd identische Werte, erreichte am 31. LT die höchsten Werte und sank ebenfalls zum 56. LT hin wieder kontinuierlich ab. Die Tatsache, dass V_{\max} und K_m am 31. LT bei fütterungsunabhängiger Betrachtung im Vergleich zu den anderen Lebensstagen deutlich erhöht war, könnte auf den Prozess des Absetzens und den daraus entstehenden Stress zurückzuführen sein. Eine Erhöhung des V_{\max} deutet auf eine Zunahme der Anzahl an Chloridtransporter oder eine höhere Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Kanals hin, der höhere K_m -Wert zeigte allerdings, dass erst mit einer höheren PGE_2 -Konzentration $V_{\max}/2$ erreicht werden konnte. Durch Betrachtung des Anfangsabschnittes der Sättigungskurve kann ein Hinweis auf die Empfindlichkeit bereits gegenüber niedrigen PGE_2 -Konzentrationen abgeleitet werden. In der Literatur wird jedoch der Prozess der erhöhten Chloridsekretion in den Darm, dem eine Wassersekretion folgt, nicht ausschließlich als pathophysiologischer Prozess gesehen, sondern er bietet auch einen gewissen Nutzen, indem eine bessere Durchmischung der *Ingesta*, eine Erhöhung der Aktivität der Verdauungsenzyme sowie ein Ausschwemmen pathogener Keime aus dem Darm erzielt werden kann (El Asmar et al., 2002).

5.2.2 Diskussion der Beeinflussung der Absorption durch *E. faecium* NCIMB 10415

5.2.2.1 Diskussion der Versuche mit steigenden Glucose-Konzentrationen

Die mukosale Zugabe von Glucose bewirkt eine Aktivierung des Na⁺-gekoppelten Glucosetransporters SGLT-1 (Ehrenkranz et al., 2005). Durch Einsatz der Ussing-Kammer-Methode kann somit die Messung des Kurzschlussstroms I_{sc} und damit des aktiven Ionen-Transportes über das Epithel erfolgen (Dipl.-Ing. K. Mußler, Aachen; Ussing und Zerahn, 1951). Versuchsziel war die mögliche Modulation der Absorption von Glucose durch die Fütterung von *E. faecium* NCIMB 10415.

5.2.2.1.1 Reaktion des Kurzschlussstroms auf mukosale Zugaben steigender Glucose-Konzentrationen

Bereits in früheren Studien wurde die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Darm verschiedener Spezies untersucht, die bereits pränatal stattfindet und sich nach der Geburt drastisch verändert (Pacha, 2000). In diesen Untersuchungen wurde das Augenmerk auf die Zeitpunkte direkt postpartal, während der Säugephase sowie nach dem Absetzen, auch hinsichtlich unterschiedlich zusammengesetzter Diäten (keine Probiotika), gerichtet (Austic, 1985; Boudry et al., 2002; Drozdowski et al., 2010; Madej et al., 1999; Puchal und Buddington, 1992; Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1997). Diese Studien wurden nachfolgend für die Interpretation der Ergebnisse herangezogen.

In der vorliegenden Arbeit waren die Faktoren 'Alter', 'Tier' und 'Glucosekonzentration' in der Varianzanalyse auf dem Niveau $p \leq 0,05$ signifikant. Die Fütterung wies, bezogen auf den mittleren ΔI_{sc} , keine signifikanten Unterschiede auf.

- **Konzentrationseffekt:**

Der Na⁺-gekoppelte Glucosetransport wurde durch steigende Konzentrationen von Glucose dosisabhängig, wie auch in der Arbeit von Lorenz (2006), signifikant erhöht. Lodemann et al. (2003a, 2006) konnten in ihrer Veröffentlichung ebenfalls eine Zunahme des ΔI_{sc} mit zunehmender Glucose-Konzentration messen, die allerdings auch altersabhängig war.

- **Fütterungseffekt:**

Bereits in früheren Versuchen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik wurde eine gesteigerte Glucoseabsorption bei Probiotika-supplementierten Tieren nachgewiesen, wobei eine Alters- und Konzentrationsabhängigkeit beobachtet wurde (Breves et al., 2000; Jansen, 2004; Lodemann et al., 2006; Lorenz, 2006).

Die eigenen Untersuchungen zeigten bei Betrachtung der einzelnen Lebenstage keine deutliche Tendenz des ΔI_{sc} zwischen den Fütterungsgruppen. In anderen Versuchen zeigten Ferkel der Probiotika-Gruppe höhere Absorptionsraten bezüglich Glucose im Vergleich zur Kontroll-Gruppe, jedoch waren die Unterschiede nicht signifikant (Lodemann et al., 2006). Eine Erklärung dafür, weshalb sich die Fütterungseffekte von der Studie von Lodemann et al. (2006) unterscheiden, könnte im Versuchsaufbau zu finden sein. In der vorliegenden Untersuchung wurden lediglich die Ferkel mit dem Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 supplementiert, die Muttersauen erhielten sowohl in der Probiotika- als auch in der Kontroll-Gruppe das gleiche Futter (ohne Probiotikum). In den Versuchen von Jansen (2004) und Lodemann et al. (2006) wurden zusätzlich die Muttersauen der Probiotika-Gruppe bereits *ante partum* mit *E. faecium* NCIMB 10415 supplementiert.

- Alterseffekt:

Bei fütterungsunabhängiger Betrachtung der Altersgruppen lagen in der vorliegenden Arbeit nach Durchführung des Post-Hoc-Tests nach Scheffé, wie auch in der Arbeit von Lodemann et al. (2006), signifikante Altersunterschiede vor, wobei in den eigenen Versuchen zusätzlich der 31. LT mit einbezogen wurde (31. LT > 35. LT > 56. LT ≥ 28. LT = 14. LT). Am 31. und 35. LT wies der ΔI_{sc} gegenüber allen anderen Altersgruppen bei allen Glucosekonzentrationen signifikant höhere Werte auf. Der Anstieg des mittleren ΔI_{sc} am 31. und 35. LT sowie dessen Absinken bis zum 56. LT kann durch die Beobachtung von Boudry et al. (2004) bestätigt werden, die in ihrer Studie am *Jejunum* von Schweinen den Einfluss des Absetzens auf die sekretorischen und absorptiven Eigenschaften des Darmes untersuchten. Einen vorübergehenden, aber signifikanten Anstieg der Na^+ -abhängigen Glucoseabsorption wurde zwei Tage nach dem Absetzen festgestellt, was auf den Stress während der Absetzphase zurückgeführt wurde (Boudry et al., 2004). Vom zweiten Tag nach dem Absetzen an sank die Na^+ -abhängige Glucoseabsorption kontinuierlich ab, erreichte am fünften Tag nach dem Absetzen wieder die Werte vor dem Absetzen und sank anschliessend bis zum 15. Tag nach dem Absetzen sogar weiter ab (Boudry et al., 2004). Diese Beobachtungen wurden von weiteren Studien bestätigt, in denen die höchste Aktivität an Aldoheosetransportern im Dünndarm zum Zeitpunkt der Geburt nachzuweisen war, während der Säugeperiode stark absank, in der Absetzphase wieder erhöhte Transportraten für Glucose und auch Fructose aufwies, um anschließend erneut abzusinken (Puchal und Buddington, 1992; Younoszai und Lynch, 1975). Puchal et al. (1992) liefern drei mögliche Erklärungen für den postnatalen Rückgang an Aldoheosetransportern: (a) Rückgang in der Transporterdichte, (b) Veränderung des Aldoheosetransportertypes und (c) eine Veränderung in der Aktivität der einzelnen Transporter. Das Absinken der Glucosetransportrate könnte ebenso mit der „Vermischung“ neonataler Enterozyten mit noch

unreifen Enterozyten zu erklären sein, die noch keine Transporter aufweisen (Drozdowski et al., 2010).

Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Ferkel am Übergang vom 28. zum 29. LT abgesetzt wurden, könnten die von Puchal et al. (1992) beobachteten ΔI_{sc} -Werte mit dem Alter (31 und 35 Tage alte Tiere) erklärt werden (Anstieg der Transportrate für Glucose und Fructose). Boudry et al. (2002) konnten ebenfalls in Versuchen an Ratten eine Zunahme der Na^+ -abhängigen Glucoseabsorption, verbunden mit einer Zunahme der SGLT-1-Expression, kurz nach dem Absetzen nachweisen.

Zusätzlich zu den entwicklungsbedingten Veränderungen des Darmes waren auch positive fütterungsabhängige Beeinflussungen der Glucoseaufnahme von Zhang et al. (1998) in ihrer Untersuchung der strukturellen und funktionellen Reaktionen des Darmes innerhalb der ersten sechs Lebensstunden an Ferkeln beobachtet worden, die entweder mit Kolostrum, Milchaustauscher, einer oralen Elektrolytlösung gefüttert wurden, oder denen das Futter gänzlich entzogen wurde. Das Ergebnis, dass Kolostrum gefütterte Ferkel ein signifikant höheres Darmgewicht, Darmoberfläche und Schleimhautmasse aufwiesen, könnte durch die Aktivierung von Transportern, eine Erhöhung der Transportrate oder aber durch eine Verschiebung des Verhältnisses verschiedener Transporter zueinander bewirkt werden (Zhang et al., 1998). Laut Breves et al. (2000) müssen auch luminale Signale, wie die Modulation der Transporterdichte durch unter anderem D-Glucose, D-Fructose und D-Galactose über positive Feedbackmechanismen, als auch systemische Faktoren, wie die mögliche positive Wirkung bioaktiver Peptide auf den intestinalen Zuckertransport, berücksichtigt werden.

5.2.2.1.2 Kinetik der Glucose-Absorptionsversuche

Bei Betrachtung des mittleren ΔI_{sc} war über die Altersgruppen ein Konzentrationseffekt zu beobachten, der die Berechnung der Michaelis-Menten-Konstanten K_m sowie der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} erlaubte. Für K_m war kein signifikanter Unterschied bei den Faktoren 'Alter', 'Tier' und 'Fütterung' erkennbar. Bei V_{max} hingegen zeigten sich bezogen auf den Faktor 'Alter' signifikante Unterschiede.

Bei Betrachtung der Fütterungseffekte lag in der vorliegenden Studie V_{max} und K_m der Probiotika-Gruppe bis einschließlich dem 31. LT signifikant oberhalb der entsprechenden Werte der Kontrolle. Wie in den Versuchen von Breves et al. (2000) mit den Probiotika *S. boulardii* und *B. cereus* var. *toyoï* waren auch in den vorliegenden Versuchen die Unterschiede bei K_m nicht signifikant. Die signifikant höheren V_{max} -Werte der Glucoseabsorption können auf eine Erhöhung der Transporterdichte in der apikalen

Membran, eine erhöhte Umsatzrate der einzelnen Transporter oder auf eine Zunahme der Absorptionsfläche zurückgeführt werden (Breves et al., 2000). Bei Supplementierung von *S. boulardii* und *B. cereus* var. *toyoi* konnte beispielsweise eine Zunahme der Zottenlänge, nicht aber der Kryptentiefe gemessen werden (Baum et al., 2002). Durch die erhöhte Zottenlänge vergrößert sich damit auch die absorptive Fläche des Darmes. Eine Erhöhung der Aktivität von in der Bürstensaummembran lokalisierten Disaccharidasen durch die Fütterung von *S. boulardii* ohne morphologische Veränderungen der Dünndarmmukosa beschreiben Buts et al. (1986). Morphologische Untersuchungen von Scharek et al. (2005) zeigten bei Fütterung von *E. faecium* SF68 keine Unterschiede in der Länge der Mikrovilli oder der Kryptentiefe im Vergleich zur Kontrolle.

Bei Betrachtung des Alterseffektes bezüglich der Michaelis-Menten-Konstante K_m und der maximalen Transportgeschwindigkeit V_{max} ergab sich bei beiden Werten ein Anstieg bis zum 31. LT. Am 35. und 56. LT fielen sowohl K_m als auch V_{max} wieder ab. Die sinkenden V_{max} -Werte ab dem 35. LT decken sich mit den Ergebnissen von Puchal et al. (1992), die die Entwicklung des Monosaccharidtransportes in verschiedenen Bereichen des Dünndarms von Schweinen direkt nach der Geburt, nach zehn Tagen sowie am 30. Lebenstag (abgesetzt wurden die Tiere am 21. Tag) untersuchten. Hier konnten die höchsten maximalen Transportraten direkt postnatal gemessen werden, welche mit zunehmender Säugeperiode rapide abnahmen und sich nach dem Absetzen vom proximalen zum mittleren Dünndarm verlagerten (Puchal und Buddington, 1992).

Die K_m -Werte blieben in den Untersuchungen von Puchal et al. (1992) konstant, wobei hier allerdings davon ausgegangen wurde, dass aufgrund der Einflüsse des 'unstirred layers' die K_m -Werte nicht akkurat dargestellt wurden.

In allen Säugetieren entwickeln sich die Glucosetransporter erst mit Differenzierung des Darmes in Krypten, Villi und Mikrovilli (Drozdowski et al., 2010). Da ausgereifte Villusenterozyten nicht mehr in der Lage sind, ihre Anzahl an Glucosetransportern zu ändern, erfolgt die Steuerung der Transporteranzahl durch die fütterungsbedingte Regulierung über noch unreife Zellen in den Krypten, die dann anschließend zur Villusspitze transportiert werden (Ferraris und Diamond, 1992; Ferraris und Diamond, 1997). Die durchschnittliche Lebenszeit eines Enterozyten beträgt beim Schwein zwischen fünf und zehn Tagen (Fan et al., 2001).

Darüber hinaus spiegeln die Alterseffekte die Verteilung von Enzymen in der Bürstensaummembran des Darmes wider, so dass beispielsweise während des Säugens durch den hohen Gehalt an Laktose (Hauptkohlenhydratquelle zu diesem Zeitpunkt, bestehend aus Glucose und Galaktose) die Laktaseaktivität und damit die Transportrate von

Glucose erhöht wird (Puchal und Buddington, 1992). Nach dem Absetzen werden über das Futter komplexere Kohlenhydrate aufgenommen, die durch weitere Enzyme aufgeschlossen werden müssen, bevor sie von den Enzymen der Bürstensaummembran zu Monosacchariden gespalten werden (Puchal und Buddington, 1992). Gemäß Ferraris et al. (1997) zeigt sich eine Abhängigkeit der Anzahl der in der intestinalen Mukosa lokalisierten Glucosetransporter von der jeweiligen Fütterung, wobei eine kohlenhydratreiche Diät den intestinalen Glucosetransport stimuliert (Diamond et al., 1984) und signifikant höhere Absorptionsraten liefert als bei Milchfütterung (Boudry et al., 2002).

5.2.2.2 Diskussion der Versuche mit L-Glutamin

Zur Prüfung weiterer absorptiver Leistungen wurde die Aminosäure L-Glutamin eingesetzt.

Beim fütterungsabhängigen Vergleich des ΔI_{sc} lagen die Mittelwerte \pm Standardabweichung bei der Probiotika-Gruppe nur am 14. und 35. LT oberhalb der entsprechenden Werte der Kontrolle. Für den 14. und 35. LT stimmten die Ergebnisse mit den Daten von Lorenz (2006) mit dem Probiotikum *Bacillus cereus* var. *toyo*i überein, wobei sich hier aber auch am 28. LT für die Probiotika-Gruppe höhere mittlere ΔI_{sc} als bei der Kontrolle zeigten. Die Unterschiede in der genannten Arbeit waren jedoch nicht signifikant (Lorenz, 2006). Ähnliche Ergebnisse sind der Arbeit von Jansen (2004) zu entnehmen, die mit dem Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 durchgeführt wurde. Allerdings lagen in dieser Studie die mittleren ΔI_{sc} der Probiotika-Gruppe bei allen Altersgruppen über den Werten der Kontrolle.

Da bezüglich der Fütterung keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden, eine Beobachtung, die sich ebenfalls in anderen Versuchen mit *E. faecium* NCIMB 10415 (Jansen, 2004) oder auch *Bacillus cereus* var. *toyo*i zeigte (Lorenz, 2006), erfolgt im Weiteren die Diskussion der Ergebnisse für L-Glutamin fütterungsunabhängig.

Bei Zusammenfassung der Fütterungsgruppen zeigten sich am 31. und 35. LT höhere ΔI_{sc} -Werte im Vergleich zu den anderen Altersgruppen, die nur sehr schwach auf L-Glutamin reagierten. Im Gegensatz zur Arbeit von Lorenz (2006) erwiesen sich diese Unterschiede als signifikant. In verschiedenen Absorptionsstudien mit Aminosäuren, Proteinen und Messungen von Enzymgehalten wurden ebenfalls starke Abhängigkeiten bezüglich der Tierart, des Alters des Tieres und damit der Entwicklung des Gastrointestinaltraktes, der Fütterung sowie der zu betrachtenden Einzelsubstanz (Unterschiede innerhalb der Aminosäuren, Proteine etc.) deutlich (Batt und Schachter, 1969; Puchal und Buddington, 1992; Vega et al., 1992; Zhang et al., 1998; Zhang et al., 1997), wobei allerdings die Absorptionsfähigkeit zum Zeitpunkt der Geburt und während der Säugeperiode am höchsten war. Dennoch könnten in all diesen Faktoren die unterschiedlich hohen ΔI_{sc} -Werte sowie

deren Absinken am 56. LT begründet liegen. Versuche von Buddington et al. (1992) mit Kaninchendarm ergaben die höchsten Transportraten für Aminosäuren und Glucose zum Zeitpunkt der Geburt. Anschließend verringerten sich die Transportraten, um jedoch einige Wochen nach dem Absetzen wieder geringgradig anzusteigen, wobei allerdings auch tierartige Unterschiede auftraten (Buddington und Diamond, 1992).

Gemäß Huo et al. (2003) kann ein Ferkel Glutamin selbst synthetisieren (nicht-essentielle Aminosäure), so dass dieses nicht über die Fütterung separat zugeführt werden muss. Allerdings kann Glutamin in Situationen, wie zum Beispiel bei Stress, Durchfall oder anderen Faktoren, die die Darmintegrität stören können (Huo et al., 2003), sich fördernd auf die Gesundheit des Darmes auswirken, beziehungsweise eventuell sogar eine schnellere Genesung bewirken.

5.2.3 Mögliche Beeinflussung des Natriumabhängigen Glucosetransporters SGLT-1 durch IL-1 α

Für das Probiotikum *E. faecium* NCIMB 10415 wurde in verschiedenen Studien die Fähigkeit, Immunzellpopulationen zu beeinflussen, nachgewiesen (Mafamane, 2008; Scharek-Tedin, 2009; Scharek et al., 2005). In Challenge-Versuchen wurde bei Supplementierung mit *E. faecium* NCIMB 10415, nach einer herbeigeführten Infektion mit *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104, eine Zunahme der mRNA-Expression von Zytokinen in Blut (IL-1 β , IL-1 α und IL-8), den distalen Peyer'schen Platten (IL-1 α , IFN- γ) sowie im Jejunumepithel (IL-10) mittels Real-Time PCR-Analyse nachgewiesen (Abschlussbericht der Forschergruppe FOR 438). Das in den Peyer'schen Platten durch Supplementierung vermehrt exprimierte proinflammatorische Interleukin IL-1 α wirkt nachweislich stimulierend auf die Glucoseabsorption im *Jejunum* von Kaninchen (Hardin et al., 2000), in Astrozyten von Mäusen (Vega et al., 2002; Yu et al., 1995) und in menschlichen Hautfibroblasten (Taylor et al., 1992).

Die Ergebnisse bezüglich der Beeinflussung der Immunität des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 im Darm (Anstieg von IL-1 α) sowie die positive Wirkung von IL-1 α auf die Glucoseabsorption, führten zu folgender Arbeitshypothese.

Die Versuchsdurchführung basierte auf der Annahme, dass IL-1 α den Anstieg im Kurzschlussstrom durch Beeinflussung des Na⁺-abhängigen Glucosetransporters (SGLT-1) bewirkt. Der Co-Transport des positiv geladenen Natriumions (das Verhältnis von Na⁺/Glucose ist dabei 2:1) kann dabei elektrophysiologisch als Anstieg im Kurzschlussstrom erfasst werden und ist somit proportional dem Glucosetransport (Mackenzie et al., 1998; Wright et al., 1997). Dass IL-1 α als proinflammatorisches Interleukin in der Lage ist, die

Absorption von Glucose über den Na⁺-gekoppelten Glucosetransporter SGLT-1 positiv zu beeinflussen, wurde bereits in Studien von Hardin et al. (2000) an Jejunumepithelien von Kaninchen nachgewiesen. Die genauen Effekte wurden in den Kapiteln 2.5 und 2.7 beschrieben. In Vorversuchen mit aufsteigenden IL-1 α -Konzentrationen zeigte die serosale Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α die deutlichste Steigerung des I_{sc}. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Hardin et al. (2000) und Chiossone et al. (1990), die eine maximale Glucoseabsorption durch die Stimulierung mit 5 ng/ml IL-1 α erzielten und sogar bei einer Konzentration von 10 ng/ml IL-1 α suboptimale Anstiege im I_{sc} messen konnten. Ein Grund für die unterschiedlichen notwendigen Konzentrationen könnte darin zu finden sein, dass die Untersuchungen an Epithelien des *Jejunum* und des *Ileum* unterschiedlicher Spezies erfolgten.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob der durch IL-1 α ausgelöste Anstieg im Kurzschlussstrom auf eine Stimulierung des Na⁺-abhängigen Glucosetransporters zurückzuführen ist. Dazu wurde der SGLT-1 spezifisch mit dem Glycosid Phlorizin in einer Konzentration von 500 μ mol/l gehemmt (Boudry et al., 2002; Mackenzie et al., 1998; Murray et al., 2008; Yu et al., 2005). Diese Konzentration zeigte sich sowohl in Versuchen mit Zellkulturen (Caco-2-Zellen) (Yu et al., 2005) als auch mit Darmepithelien von Schweinen (Boudry et al., 2002) als effektiv.

Aufgrund der kleinen Stichproben und der nicht signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen erfolgte eine fütterungsunabhängige Auswertung der Daten. Da zwischen dem 14. und 28. LT sowie dem 31. und 35. LT keine signifikanten Unterschiede auftraten, wurden diese zu je einer Altersgruppe zusammengefasst. Der 56. LT bildete eine eigene Altersgruppe.

Die Messung der durch das proinflammatorische Zytokin IL-1 α über den SGLT-1 resultierenden maximalen Δ I_{sc}-Werte erfolgte über einen Zeitraum von 45 Minuten nach serosaler Zugabe. Diese Messdauer wurde aufgrund des in der Literatur bestätigten späten maximalen Wirkungseintrittes von IL-1 α (20 bis 30 Minuten nach Zugabe) ausgewählt (Chiossone et al., 1990).

Die serosale Zugabe des proinflammatorischen Interleukins ergab bei einem Vergleich mit der Kontrolle in der Altersgruppe 3 (56. LT) einen signifikanten Anstieg im Δ I_{sc}. In den Altersgruppen 1 (14. und 28. LT) und 2 (31. und 35. LT) wurde durch IL-1 α ein nicht signifikanter Anstieg im Kurzschlussstrom induziert, wobei in der Altersgruppe 2 bereits eine deutliche Zunahme der Interleukinwirkung zu beobachten war. Die deutlichen Anstiege im I_{sc},

wie sie auch bei Glucose und L-Glutamin zu sehen war, in der Altersgruppe 2 (31. und 35. LT) und 3 (56. LT) decken sich mit anderen Ergebnissen in der Literatur (Boudry et al., 2004; Drozdowski et al., 2010). Die Steigerung des I_{sc} durch den aktiven Mechanismus der Erhöhung des L-Prolin- und Glucose-Fluxes von mukosal nach serosal über Stimulierung des SGLT-1 mittels des proinflammatorischen Zytokins IL-1 α wurde bereits an Jejunumepithelien von Kaninchen nachgewiesen und passive Transportvorgänge durch Einsatz der Ussing-Kammer-Methode ausgeschlossen (Hardin et al., 2000). Der Anstieg des Glucosetransportes war dabei nachweislich weder auf eine Zunahme des Gehaltes an SGLT-1 in der Bürstensaummembran noch auf eine Steigerung der Na⁺/K⁺-ATPase-Aktivität zurückzuführen und damit nicht durch Veränderungen des transzellulären Natriumgradienten bedingt (Hardin et al., 2000). Da weder Veränderungen der Na⁺/K⁺-ATPase noch die Expression von SGLT-1 in der Bürstensaummembran ursächlich für den Anstieg der Glucoseabsorption verantwortlich waren, lag die Vermutung nahe, dass proinflammatorische Interleukine diese durch Modulation der Effizienz bereits bestehender Na⁺/Glucose-Co-Transporter bewirken (Hardin et al., 2000).

Um die Wirkung von IL-1 α auf den SGLT-1 zu untersuchen, wurde der Na⁺-gekoppelte Glucosetransporter spezifisch mit Phlorizin in einer Dosierung von 500 μ mol/l gehemmt und zeigte im Vergleich zur Kontrolle ein Absinken des Kurzschlussstromes, der in den Altersgruppe 2 (31. und 35. LT) und 3 (56. LT) signifikant war. Die Beobachtung, dass der Effekt von Phlorizin ebenfalls bei Absatzferkeln am deutlichsten ausgeprägt war, deckt sich mit den molekularbiologischen Analysen des SGLT-1, in denen bei Absatzferkeln im Vergleich zu säugenden und erwachsenen Ratten eine stärkere Expression des SGLT-1 festgestellt wurde (Khan et al., 2000). Drozdowski et al. (2010) fanden ebenfalls in ihren Untersuchungen mit Mäusen heraus, dass Phlorizin den SGLT-1 bei säugenden und erwachsenen Tieren nicht im gleichen Maße hemmt wie bei Absetzern. Sie führten dies auf die möglicherweise bestehende Anwesenheit altersspezifischer alternativer Glucosetransportmechanismen oder auf das Vorhandensein altersabhängiger Bindungsstellen des SGLT-1 für Phlorizin zurück (Drozdowski et al., 2010). Laut Ferraris et al. (1997) erklärt sich die enorme absorptive Kapazität des Darmes zum Zeitpunkt des Absetzens hauptsächlich durch die massive Zunahme an Darmmasse.

Grundsätzlich ergaben die Versuche bezüglich der Beeinflussung des intestinalen SGLT-1: Wie in den Studien von Chiossone (1990) zur Wirkung des proinflammatorischen Interleukins IL-1 α bewirkte dies auch in den vorliegenden Versuchen einen Anstieg im Kurzschlussstrom. Dass dieser Anstieg alleine durch eine Beeinflussung des SGLT-1 erzeugt wurde, konnte nicht bestätigt werden. Denn unter der Annahme, dass IL-1 α lediglich einen Anstieg im ΔI_{sc}

über Aktivierung des SGLT-1 erzielt und Phlorizin diesen Transporter spezifisch und vollständig hemmt (Khan et al., 2000; Panayotova-Heiermann et al., 1995), müsste ein Vergleich der 'Kontrolle' mit 'IL-1 α und Phlorizin' zumindest annähernd gleich hohe ΔI_{sc} -Werte ergeben. Dies war jedoch in den durchgeführten Versuchen nicht der Fall. Dies kann folgendermaßen erklärt werden. Zum einen könnte dies auf den verschiedenen schnellen Wirkungseintritt der Substanzen zurückgeführt werden, wie es sich auch in den Kurvenverläufen von Phlorizin und IL-1 α alleine zeigte (siehe Kapitel 4.3.2.). Eine weitere Erklärung für den trotz der Zugabe von Phlorizin gemessene Anstieg im I_{sc} könnte die Existenz zusätzlicher elektrogener Transportmechanismen sein, die auch durch IL-1 α beeinflusst werden, wie zum Beispiel die Chloridsekretion (Chiossone et al., 1990). Beispielsweise konnte in Untersuchungen mit 100 ng/ml IL-1 α ein Anstieg im I_{sc} nachgewiesen werden, der durch die serosale Gabe von 100 μ mol/l Bumetanid (spezifischer Inhibitor des K⁺-Na⁺-2Cl⁻-Co-Transporters) alters- und fütterungsunabhängig signifikant gehemmt werden konnte (Klingspor, Institut für Veterinär-Physiologie, FU Berlin; persönliche Mitteilung). Hier bedarf es aber noch weiterer Untersuchungen.

5.3 Überblick über die Ergebnisse der Forschergruppe FOR 438

Da *E. faecium* NCIMB 10415 auf unterschiedliche Funktionen des Ferkelorganismus Effekte ausüben kann, arbeiteten im Rahmen der von der DFG unterstützten Forschergruppe FOR 438 mehrere veterinärmedizinische Forschungsinstitute zusammen. In Tabelle 17 werden die Resultate der einzelnen Teilprojekte dargestellt und die eigenen Forschungsergebnisse darin integriert. Die Ergebnisse beziehen sich dabei lediglich auf den Untersuchungszeitraum 2005 und 2006, in dem die eigenen Versuche stattfanden und somit auf die gleichen Tiere bzw. Epithelien. Anschließend wird ein kurzer Überblick über die Ergebnisse der bisherigen Versuche im Rahmen des DFG Forschungsprojektes FOR 438 dargestellt, in denen neben der Probiotikagabe an die Ferkel, beginnend mit dem ersten Lebenstag, auch die Muttersauen während der Trächtigkeit supplementiert wurden. Ob dieser Aspekt bezüglich der Ergebnisse relevant ist, wird anschließend in Kapitel 5.4 diskutiert.

Wie in den vorliegenden Untersuchungen ergaben sich auch bei einigen anderen Teilprojekten keine signifikanten Fütterungseffekte durch die Supplementierung mit *E. faecium* NCIMB 10415 (siehe Tabelle 17). Bei einem Großteil der durchgeführten Untersuchungen sind jedoch Alterseffekte auf die untersuchten Parameter zu beobachten, die zum Teil auch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Lebenstagen erkennen ließen. Vor allem die Phase nach dem Absetzen (31. und 35. LT), die ja auch in der Praxis einen kritischen Zeitraum darstellt, ist hierbei auffällig. Sekretorische wie absorptive Funktionen sind in dieser Phase signifikant erhöht (siehe Ergebnisse PGE₂, Glucose, L-

Glutamin) und die Erhöhung der TFF-Expression zeigt eine Aktivierung von Epithelschutzfunktionen des Organismus aufgrund einer Entzündungsreaktion des Darmes (siehe Tabelle 17). Es konnte in dieser Zeit allerdings kein signifikanter Effekt durch eine Supplementierung der Ferkel mit *E. faecium* NCIMB 10415 nachgewiesen werden.

Immunologische Parameter wiesen die größten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen vor dem Absetzen auf, vermutlich bedingt durch die Tatsache, dass *E. faecium* NCIMB 10415 die stärkste Besiedelung des GIT während der Säugeperiode sowie während der parallel dazu erfolgten Supplementierung erreicht (Klär, 2008).

Ein wichtiger Hinweis durch die Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung des GIT ist, dass *E. faecium* NCIMB 10415 die Magen-Darm-Passage überleben und somit zur Stabilisierung des GIT durch Besiedlung (in diesem Fall signifikant) beeinflussen kann (Klär, 2008).

Tabelle 17: Darstellung der Forschungsergebnisse der beteiligten Teilprojekte am DFG-Projekt FOR 438

	Forschungsergebnisse
Beeinflussung der Transport- und Barrierefunktion des mittleren <i>Jejunums</i> (eigene Ergebnisse)	<p>Beeinflussung der Sekretion PGE₂: ΔI_{sc} wurde signifikant durch die Faktoren 'Tier', 'Konzentration' und 'Alter' beeinflusst. Abhängig von der PGE₂-Konzentration zeigten der 31. und 35. LT signifikant höhere ΔI_{sc}-Werte.</p> <p>Beeinflussung der Absorption Glucose: ΔI_{sc} wurde signifikant durch die Faktoren 'Tier', 'Konzentration' sowie 'Alter' beeinflusst. Abhängig von der Glucose-Konzentration zeigten der 31. und 35. LT signifikant höhere ΔI_{sc}-Werte.</p> <p>L-Glutamin: ΔI_{sc} wurde signifikant durch die Faktoren 'Alter' und 'Tier' beeinflusst. In beiden Fütterungsgruppen lagen die ΔI_{sc} bei den Altersgruppen 31. und 35. LT signifikant über den Werten der anderen Altersgruppen.</p> <p>Der Faktor 'Fütterung' erwies sich bei diesen Untersuchungen als nicht signifikant.</p>
Beeinflussung der Stoffwechselaktivität gastrointestinaler Mikrobiota sowie der epithelialen Oberflächenintegrität des Darmes (Sharbati, 2010)	<p>In den durchgeführten Untersuchungen lagen während des Absetzens (31. und 35. LT) die signifikant höchsten Expressionswerte an TFF2 vor. Des Weiteren konnte während der Absetzphase eine nicht signifikante Erhöhung der TFF3-Expression gemessen werden.</p> <p>TGFα zeigte im <i>Jejunum</i> und <i>Ileum</i> am 7. und 14. LT die höchsten Expressionswerte.</p> <p>Der Rezeptor für Wachstumsfaktoren (EGF-R) zeigte am 7. LT die höchsten Expressionswerte, wobei die Gehalte im <i>Jejunum</i> der Probiotika-Gruppe um das 4-fache reduziert waren.</p> <p>In beiden Fütterungsgruppen war die Expression von COX-2 am 7. und 14. LT erhöht.</p> <p>Es konnte bei allen Faktoren kein signifikanter Fütterungseffekt festgestellt werden.</p>
Immunologische Beeinflussung des Dünndarmes (Scharek-Tedin, 2009)	<p>Es lag eine signifikante altersabhängige Entwicklung von CD21⁺-Zellen sowie IgA⁺-Zellen in den Peyer'schen Platten aus dem distalen <i>Jejunum</i> vor. Der Faktor 'Fütterung' war hierbei nicht signifikant.</p> <p>Die CD4⁺CD8⁺-Zellen waren in der Kontrolle signifikant stärker exprimiert als in der Probiotika-Gruppe.</p> <p>Zwischen den Fütterungsgruppen lagen bezüglich CD21⁺, IgA⁺, MHC II, SWC3a, CD16 und CD4 keine signifikanten Unterschiede vor.</p> <p>In der Probiotika-Gruppe zeigten sich signifikant höhere CD1-Zellzahlen.</p> <p>Ein signifikant höherer Gehalt an CD4⁺CD8⁻-Zellen, sowie ein signifikant niedrigerer Gehalt an CD16⁺-Zellen konnte im Blut der Probiotika-Gruppe gemessen werden.</p>
Beeinflussung der mikrobiellen Besiedelung des Dünndarmes (Klär, 2008; Schierack et al., 2007)	<p>Die Untersuchung ergab ein Überleben des Probiotikums während der Magen-Darm-Passage.</p> <p>Die stärkste Besiedelung des GIT mit <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 fand während der Säugephase bzw. während der Supplementierung mit $4,8 \cdot 10^9$ ($0,46 \cdot 10^9$) CFU/ml/d statt.</p> <p>Die Erhöhung des Probiotikums ab dem 15. LT bewirkte keine Konzentrationserhöhung der probiotischen Bakterien im MDT.</p> <p>Prozentual besaß <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 nach dem Absetzen höhere Anteile an der eubakteriellen Population in Magen und <i>Jejunum</i> als während der Säugeperiode. Im <i>Colon</i> war es umgekehrt.</p> <p>Über die Zeit betrachtet konnte keine Veränderung der prozentualen Anteile des probiotischen Bakteriums an der gesamten Enterokokken-Population gemessen werden.</p> <p>Im Magen waren signifikant höhere Zellzahlen zu finden als im <i>Jejunum</i>.</p> <p>Die höchste Konzentration an <i>E. faecium</i> NCIMB 10415-Zellen konnte an allen Beobachtungstagen im <i>Colon ascendens</i> beobachtet werden.</p> <p>Die Fütterung zeigte keinen signifikanten Effekt auf Anzahl oder Diversität von <i>Enterobacteriaceae</i>-Spezies.</p> <p>Es konnte keine signifikante Beeinflussung der Gesamtzahl, Diversität, Hämolyse und Verteilung von virulenten <i>E. coli</i> festgestellt werden.</p> <p>Bezüglich der Stabilität der gastrointestinalen Mikrobiota wurde eine signifikante Beeinflussung durch <i>E. faecium</i> NCIMB 10415 festgestellt.</p> <p>Nach dem Absetzen zeigten supplementierte Ferkel signifikant diversere Magen-, <i>Jejunum</i>- und <i>Colon ascendens</i>-Mikrobioten als Kontrolltiere.</p> <p>Die Untersuchung der probiotischen Beeinflussung der Populationen an <i>Lactobacillus spp.</i>, <i>Enterococcus spp.</i>, <i>Bifidobacterium spp.</i> und <i>E. coli spp.</i> zeigte zum Teil Fütterungs- und Alterseffekte.</p>

In einigen innerhalb des DFG-Projektes FOR 438 durchgeführten Versuchen wurden auch die Muttertiere während der Trächtigkeit mit verschiedenen probiotischen Stämmen supplementiert. Dadurch zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede in den Versuchsergebnissen verglichen mit der vorliegenden Studie. Nachfolgend wird auf die im Zusammenhang mit den eigenen Untersuchungen wichtigsten Ergebnisse kurz eingegangen. Dabei wird sich lediglich auf Versuche mit *E. faecium* NCIMB 10415 bezogen.

Erfolgte die Supplementierung der Muttersauen bereits während der Trächtigkeit, ergab sich keine signifikante Verringerung der Ferkelsterblichkeit innerhalb der ersten drei Lebensstage (Macha, 2004; Taras et al., 2006). Bezüglich der Gewichtszunahme der Ferkel wurde zwischen beiden Fütterungsgruppen keine signifikante Beeinflussung durch das Probiotikum festgestellt (Macha, 2004; Taras et al., 2006). Im gesamten Zeitraum nach dem Absetzen waren jedoch in der Probiotika-Gruppe eine signifikant niedrigere Durchfallhäufigkeit sowie ein signifikant geringeres Auftreten flüssigen Kotes als in der Kontroll-Gruppe zu verzeichnen (Macha, 2004; Taras et al., 2006). Die bakterielle Diversität im Ferkelkot wies bis auf den 56. LT (tendenziell höhere bakterielle Diversität bei Kontrolltieren) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen auf (Macha, 2004).

In Untersuchungen von Vahjen et al. (2007) und Macha (2004) konnte *E. faecium* NCIMB 10415 bei Saugferkeln bereits vor der Supplementierung über das Futter nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass eine Besiedlung des Darmes bereits über den Kontakt mit den maternalen Fäzes erfolgt. Durch das Probiotikum konnte der Gesamtgehalt an *E. faecalis* reduziert werden, auf die Gesamt-*E. faecium*-Zellzahl hatte es jedoch keinen Einfluss (Vahjen et al., 2007).

Mikrobiologisch zeigten die Fütterungsgruppen keine Unterschiede bezüglich anaerober sowie coliformer Bakterien, weder bei den Ferkeln noch bei den Muttersauen, wobei die Anzahl β -hämolytischer *E. coli* und O141-Serovare bei Ferkeln der Probiotika-Gruppe deutlich reduziert waren (die Sauen zeigten keine Fütterungsunterschiede) (Scharek et al., 2005). Auch in Untersuchungen von Macha (2004) lagen bis auf wenige Ausnahmen (siehe hierzu die entsprechende Dissertation) bei den Ferkeln zwischen den Fütterungsgruppen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellzahlen von Enterokokken, Coliformen, Milchsäurebakterien und Gesamt-Anaerobiern vor.

Bei einer Untersuchung der Beeinflussung der *E. faecium* NCIMB 10415-Supplementierung auf die natürliche Chlamydien-Infektionsrate bei Ferkeln zeigte sich eine nicht-signifikant geringere Anzahl an *Chlamydia*-positiven Proben aus Darm und Fäzes in der Probiotika-Gruppe (Pollmann, 2005).

Scharek et al. (2005) zeigten in ihren Versuchen über die Einflussnahme des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 auf die Entwicklung des Immunsystems und der gastrointestinalen

Besiedelung von Sauen und Ferkeln nachfolgende Ergebnisse. In der Studie zur Immunität unterschied sich der IgG-Gehalt im Serum der Sauen und Ferkel (vom 7. bis 28. LT) in beiden Fütterungsgruppen nicht voneinander; ab dem 28. LT stiegen der IgG-Gehalt im Serum bei Ferkeln der Kontroll-Gruppe an, während dieser in der Probiotika-Gruppe absank (Guth, 2006; Scharek et al., 2007; Scharek et al., 2005). Die Untersuchung des IgA-Gehaltes in der Molke der Muttersauen ergab keine signifikanten Fütterungseinflüsse (Guth, 2006). Bei Sauen beider Fütterungsgruppen konnte bezüglich des IgA-Gehaltes in den Fäzes kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Scharek et al., 2007; Scharek et al., 2005). Hingegen zeigten die Ferkel je nach Lebenstag signifikante Fütterungseffekte bezüglich des IgA-Gehaltes im Kot (Guth, 2006; Scharek et al., 2005). Sowohl die in den Peyer'schen Platten lokalisierten Lymphozyten als auch deren Gehalt an CD4⁺ und CD8⁺ wies keinen Fütterungseffekt auf (Scharek et al., 2005). Aus dem proximalen *Jejunum* wurden allerdings bei Ferkeln der Probiotika-Gruppe signifikant weniger CD8⁺-Zellen isoliert als in der Kontrolle (Scharek et al., 2005).

Bei der histologischen Untersuchung des Jejunumepithels wurde kein Effekt auf Villuslänge oder Kryptentiefe durch das Probiotikum festgestellt (Scharek et al., 2005). Die Zottenlänge des Dünndarmes zeigte in den Untersuchungen von Reiter (2005) signifikante Unterschiede zwischen den Darmabschnitten der einzelnen Altersgruppen, für die jedoch aufgrund der individuell stark schwankenden Zottenlänge bei allen Tieren kein Fütterungseffekt nachgewiesen wurde. Ebenso verhält es sich mit der Kryptentiefe und dem Vergrößerungsfaktor für die Schleimhautoberfläche aufgrund von Zotten- oder Kryptenbildung. Auch hier wurden keine Fütterungseffekte, aber deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Darmabschnitten und bezüglich des Alters ermittelt (Reiter, 2005).

Eine zur Transportphysiologie durchgeführte Untersuchung von Jansen (2004) ergab in der Probiotika-Gruppe eine nicht signifikant höhere L-Glutamin-Absorption bei allen Altersstufen. Bezüglich der Glucoseabsorption wurde ein zum Teil signifikanter Alters- und Konzentrationseffekt bestimmt, wobei vor allem in der Probiotika-Gruppe Epithelien des 14. LT (bis auf eine Konzentration von 4 mmol/l) signifikant höhere Absorptionsraten aufwiesen (Jansen, 2004). Grundsätzlich lagen die Absorptionsraten in der Probiotika-Gruppe, mit wenigen Ausnahmen, tendenziell über denen der Kontrolle (Jansen, 2004). Die Untersuchungen zur Chlorid-Sekretion mit PGE₂ ergab, mit Ausnahme des 28. LT, tendenziell niedrigere ΔI_{sc} -Werte in der Probiotika- als in der Kontroll-Gruppe, die allerdings statistisch nicht signifikant waren (Jansen, 2004).

Bei Betrachtung dieser beiden Versuchansätze wird der positive Effekt, den eine Supplementierung der Muttersauen mit Probiotika auf die Ferkel ausübt, deutlich.

5.4 Diskussion des Zeitpunktes der probiotischen Supplementierung

Die transportphysiologisch vorhandenen Unterschiede bezüglich der Absorption von Glucose und L-Glutamin in der vorliegenden Arbeit und der von Jansen (2004) könnten durch die Einbeziehung der Muttersauen in die Supplementierung entstanden sein. Die in früheren Studien gezeigten deutlich höheren, aber nicht signifikanten Absorptionsraten (Jansen, 2004; Lodemann et al., 2006) waren in den eigenen Versuchen lediglich zum Teil vorhanden. All diese Beobachtungen scheinen darauf hinzudeuten, dass eine Probiotikum-Gabe an tragende Sauen die positiven Effekte auf die Ferkel unterstützt.

So zeigt ein Vergleich verschiedener Veröffentlichungen, dass die Probiotika-Supplementierung von Sauen bereits während der Trächtigkeit ein wesentlicher Faktor für die probiotische Wirksamkeit auf die Nachkommen zu sein scheint (Alexopoulos et al., 2004; Kenny et al., 2010; Taras et al., 2005; Taras et al., 2006). Ein großer Vorteil ist sicherlich die frühe und effiziente Inokulation der Ferkel mit dem Probiotikum durch den Kontakt mit maternalen Fäzes sowie über die Sauenmilch (Vahjen et al., 2007). Ein Hinweis auf Elimination bzw. Reduktion pathogener Keime durch die Supplementierung der Muttersauen mit *E. faecium* NCIMB 10415 (synonym SF68) zeigt sich bereits bei einem Vergleich der Studie von Scharek et al. (2005), in der bei Ferkeln der Probiotika-Gruppe ein deutlich niedriger Gehalt an enteropathogenen Bakterien festgestellt wurde, und der Studie von Schierack (2007), in der lediglich die Ferkel nach dem Absetzen ein Probiotikum erhielten und dadurch die *Enterobacteriaceae* des Darmes (zu denen neben der autochthonen Flora auch pathogene *E. coli*-Stämme zählen) nicht beeinflusst wurde. Die Einbeziehung der Muttersauen in die Probiotikafütterung könnte das Vorkommen pathogener *E. coli* daher möglicherweise reduzieren und sollte in weiteren Untersuchungen geprüft werden.

Des Weiteren ergaben sich Hinweise auf eine potentiell positive Beeinflussung der Immunreaktion von Sauen und Ferkeln im Vergleich zu Kontrolltieren, wobei die Wirkung deutlich vom verwendeten Probiotikum abhing (Scharek et al., 2007). So bewirkte die Gabe von *Bacillus cereus* var. *toyoi* bereits an Muttersauen während der Trächtigkeit bei diesen eine Stimulierung von IgA im Darm, wogegen *E. faecium* NCIMB 10415 keinerlei Einfluss auf die humorale Immunantwort nahm (Scharek et al., 2007). Taras et al. (2006) stellten allerdings eine signifikant niedrigere Durchfallhäufigkeit nach dem Absetzen fest, wenn sowohl Sauen als auch Ferkel *E. faecium* NCIMB 10415 erhielten. In den von uns durchgeführten Versuchen des Forschergruppenprojektes FOR 438 war dieser Unterschied auch zu erkennen, allerdings nicht signifikant. Im Hinblick auf die gewünschte Reduzierung der Ferkelsterblichkeit nach der Geburt ergaben sich nicht eindeutig die erwünschten Effekte, deren Objektivierung weitere Untersuchungen erfordert.

5.5 Schlussfolgerung

Bereits in den vergangenen Jahren wurden die durch den Einsatz probiotischer Mikroorganismen erzielbaren positiven Effekte für verschiedene Tierarten untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf das Milchsäurebakterium *E. faecium* NCIMB 10415 gelegt, welches zur physiologischen Darmflora von Mensch und Tier gehört (Benyacoub et al., 2003). Laut Wenk (2002) zeigt die Supplementierung von Probiotika, Präbiotika und Enzymen beim Tier eine bessere Wirksamkeit, wenn der Darm sich noch im Entwicklungsstadium befindet. Daher wurde *E. faecium* NCIMB 10415 direkt nach der Geburt der Ferkel oral verabreicht. Die Muttersauen erhielten kein Probiotikum.

Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung der Einflussnahme des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 auf Transportvorgänge im *Jejunum* von Schweinen im Alter von 14, 28, 31, 35 und 56 Lebenstagen. Die Einbeziehung des 31. LT in die Studie ermöglichte die zeitnahe Beobachtung von durch das Absetzen (vom 28. auf den 29. LT) verursachten Auswirkungen auf den Darm. Der Einsatz von *E. faecium* NCIMB 10415 zeigte bezogen auf absorptive und sekretorische Beeinflussungen einen Alterseffekt, der vor allem bei Tieren des 31. und 35. LT ausgeprägt war. Sowohl bei der Stimulierung der Sekretion mittels PGE₂ als auch der Absorption mit Hilfe von Glucose und L-Glutamin zeigten sich am 31. und 35. LT deutlich höhere Reaktionen im ΔI_{sc} . Allerdings ist zu beachten, dass trotz numerischer Differenzen im ΔI_{sc} zwischen den Fütterungsgruppen keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren. Beim Vergleich mit anderen Untersuchungen (Jansen, 2004) wird deutlich, dass eine Supplementierung der Muttersauen bereits während der Trächtigkeit einen entscheidenden Einfluss auf die Wirkung von Probiotika ausüben könnte und sollte daher weiter untersucht werden.

Wichtig bei der Bewertung der vorliegenden Ergebnisse ist, dass in den durchgeführten Versuchen Haltungsbedingungen gegeben waren, die in der Praxis in der Regel meist so nicht anzutreffen sind. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass je nach Haltung eine Beeinflussung auf die Wirksamkeit probiotischer Futtermittel erfolgen kann. Studien belegen, dass, je suboptimaler die Bedingungen, desto besser die Effekte des Einsatzes von Probiotika sind (Kenny et al., 2010; Benyacoub et al., 2003), so dass bei bereits optimalen Haltungsbedingen eventuell nur geringere positive Ergebnisse erzielt werden können.

Die Phase des Absetzens allerdings muss durch den für die Ferkel entstehenden Stress als eine suboptimale Bedingung angesehen werden, so dass gerade in diesem Lebensabschnitt der Tiere eine positive Unterstützung durch Supplementierung probiotischer Mikroorganismen erfolgen könnte, wie es sich in vorangehenden Untersuchungen mit

E. faecium NCIMB 10415 zeigte (Senkung der Durchfallhäufigkeit und der Sterberate von Ferkeln nach dem Absetzen (Taras et al., 2006)).

6. Zusammenfassung

Der Einfluss des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 auf die absorptiven und sekretorischen Eigenschaften des Jejunumepithels beim Schwein

Seit dem Verbot des Einsatzes von Antibiotika als Leistungsförderer ab dem 01. Januar 2006 werden verstärkt Probiotika als mögliche Alternative diskutiert. Die potentielle Beeinflussung absorptiver und sekretorischer Eigenschaften durch Supplementierung von Ferkeln mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 direkt *post partum* auf das Jejunumepithels beim Schwein wurde mit Hilfe der Ussing-Kammer-Methode untersucht.

Dazu wurden Ferkel zufällig in zwei Fütterungsgruppen (Probiotika- und Kontroll-Gruppe) aufgeteilt. Beide Gruppen hatten *ad libitum*-Zugang zu Wasser. Die Muttersauen erhielten kein Probiotikum. Die orale Gabe des Probiotikums erfolgte vom 0. bis einschließlich des 34. Lebenstages (LT) in einer Dosierung von $4,5 \cdot 10^9$ CFU. Ab dem 15. LT wurde zusätzlich *E. faecium* NCIMB 10415 auch über das Ferkelfutter supplementiert ($1,2 \cdot 10^{10}$ CFU/kg). Am Übergang vom 28. zum 29. LT wurden die Ferkel abgesetzt. *E. faecium* NCIMB 10415 wurde danach über das Ferkelfutter weiter in einer Konzentration von $3,2 \cdot 10^9$ CFU/kg supplementiert.

Im Alter von 14, 28, 31, 35 und 56 Lebenstagen erfolgte die Untersuchung der absorptiven und sekretorischen Eigenschaften des mittleren *Jejunums* durch Stimulierung des Epithels mit PGE₂ (0,05 µmol/l, 0,1 µmol/l, 0,5 µmol/l und 3 µmol/l), Glucose (0,5 mmol/l, 1 mmol/l, 4 mmol/l und 10 mmol/l), 12 mmol · l⁻¹ L-Glutamin und IL-1α (10 ng/ml).

Bei den Versuchsansätzen mit PGE₂ zur Untersuchung sekretorischer Eigenschaften wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Fütterung, jedoch hinsichtlich des Alters und der PGE₂-Konzentration deutlich. Die Reaktion des I_{sc} war generell höher am 31. und 35. LT im Vergleich zu den anderen Altersgruppen. Bei Untersuchung der kinetischen Parameter zeigten sich bei K_m in der Probiotika-Gruppe am 28. LT signifikant höhere, am 56. LT signifikant niedrigere Werten als in der Kontroll-Gruppe. Bei V_{max} wies die Probiotika-Gruppe am 31. LT signifikant höhere, am 56. LT signifikant niedrigere Werte als die Kontroll-Gruppe auf.

Die Reaktion des I_{sc} auf die mukosale Zugabe aufsteigender Konzentrationen von Glucose ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Probiotika- und der Kontroll-Gruppe. Numerisch höhere Absorptionsraten, gemessen als ΔI_{sc}, traten am 35. LT bei der Probiotika-

Gruppe im Vergleich zur Kontrolle auf. Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede bezüglich des Alters und der Glucosekonzentration. Bei allen Konzentrationen lagen die ΔI_{sc} am 31. und 35. LT bei beiden Fütterungsgruppen signifikant über den entsprechenden Werten der anderen Lebensstage. Bei Betrachtung der transportkinetischen Parameter zeigte die Probiotika-Gruppe am 31. LT höhere, am 56. LT signifikant niedrigere K_m - und V_{max} -Werte als die Kontrolle.

Wie bei Glucose, so waren auch bei den Versuchen mit Stimulation durch $12 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-Glutamin signifikante Altersunterschiede zu erkennen. Auch hier zeigten sich bei den Tieren der Altersgruppe 31. und 35. LT signifikant höhere Werte im mittleren ΔI_{sc} . Die Fütterung beeinflusste die Reaktion des I_{sc} auf die Gabe von L-Glutamin nicht.

Da in vorherigen Studien eine positive Beeinflussung des Na^+ -abhängigen Glucosetransporters SGLT-1 durch das proinflammatorische Zytokin IL-1 α nachgewiesen wurde, sollte dies nochmals überprüft und eine potentielle Beeinflussung dieser Wirkungsweise durch die Gabe von *E. faecium* NCIMB 10415 untersucht werden. Dazu wurde das Glycosid Phlorizin als spezifischer Hemmer des SGLT-1 eingesetzt. Da sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Probiotika-Gruppe zeigten, erfolgte die Auswertung der Versuche fütterungsunabhängig. Die serosale Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α bewirkte einen Anstieg des I_{sc} , der teilweise durch Phlorizin gehemmt werden konnte. Dies könnte auf eine Beteiligung des SGLT-1 hindeuten.

Generell konnten in der vorliegenden Arbeit zwischen Kontroll- und Probiotika-Gruppe in allen Versuchsansätzen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dennoch sind Tendenzen sichtbar, dass *E. faecium* NCIMB 10415 einen positiven Effekt auf die Absorption nehmen könnte.

7. Summary

The influence of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 on absorptive and secretory characteristics of the mid-jejunum of pigs

Since the use of antibiotics as growth promoters was banned on January 1st, 2006, there has been an extended discussion about the use of probiotics as a possible alternative. The potential absorptive and secretory effects of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 fed directly *post partum* on absorptive and secretory properties of the isolated mid-jejunum of pigs were examined with conventional Ussing-Chamber-Method.

Piglets were randomly divided into two groups (probiotic group and control). Both groups had *ad libitum* access to water. The sows were not supplemented with the probiotic. The probiotic was daily given from day 0 until 34 an oral dose of $4,5 \cdot 10^9$ CFU. Beginning on day 15 *E. faecium* NCIMB 10415 was further fed with the diet ($1,2 \cdot 10^{10}$ CFU/kg). The piglets were weaned from day 28 to 29 of life. After weaning *E. faecium* NCIMB 10415 was supplemented in a concentration of $3,2 \cdot 10^9$ CFU/kg diet.

At 14, 28, 31, 35 and 56 days of age the absorptive and secretory characteristics of the mid-jejunum were examined by tissue stimulation using PGE₂ (0,05 µmol/l, 0,1 µmol/l, 0,5 µmol/l and 3 µmol/l), glucose (0,5 mmol/l, 1 mmol/l, 4 mmol/l and 10 mmol/l), 12 mmol · l⁻¹ L-glutamine and IL-1α (10 ng/ml).

The application of the probiotic did not influence the secretory response of PGE₂. However, there were notable age and concentration dependent effects. The I_{sc} response was generally higher on the 31st and 35th day of age. The kinetic parameter K_m of the probiotic group was significant higher on day 28 and significant lower on day 56 in comparison with the control group. Significant higher V_{max}-values were seen on day 31, significant lower values on day 56 in the probiotic group.

The I_{sc} response upon mucosal addition of rising concentrations of glucose caused no significant differences between the probiotic and control group. Numerical higher absorption rates, measured as ΔI_{sc}, were observed on the 35th day of age in the probiotic group and again significant different age and concentration dependent effects were demonstrated. The transport kinetic parameters, V_{max} and K_m, were in the probiotic group significant higher on the 31st day of age, and significantly lower on day 56.

As seen with glucose, the experiment using $12 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ L-glutamine showed significant differences with age. The feeding regime had no significant effect on the I_{sc} reaction to L-glutamine.

As recent studies showed a positive effect of the proinflammatory interleukine IL- α on the Na^+ /glucose cotransporter, SGLT-1, our aim was to verify this observation and to examine a potential influence of the administration of *E. faecium* NCIMB 10415 on this effect. The glycoside phlorizin was therefore used as a specific inhibitor of the SGLT-1. Since there was no significant difference found between the probiotic and control group, the analysis of the experiments was done independent of treatment. The serosal addition of 10ng/ml IL-1 α caused an increase of the I_{sc} , which could be partially inhibited by phlorizin. This suggests an involvement of the Na^+ /glucose cotransporter, SGLT-1.

In general, in the present study no significant differences could be demonstrated between the probiotic and the control group. Tendencies were observed regarding the absorptive properties, indicating a positive effect of *E. faecium* NCIMB 10415 on absorption.

8. Anhang

8.1 Verwendete Puffer

8.1.1 Glucosepuffer

Tabelle 18: Zusammensetzung des Glucosepuffers

Substanz	Summenformel	MG	mmol/l	g/5l
	NaCl	58,44	115,00	33,60
	NaHCO ₃	84,01	25,00	10,50
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	137,99	0,40	0,28
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	177,99	2,40	2,14
	KCl	74,56	5,00	1,86
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆ H ₂ O	198,18	10,00	9,909
Mannit	C ₆ H ₁₄ O ₆	182,17	2,00	1,8217
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	1,20	0,88
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,30	1,20	1,22
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,8	1,4 µM	2,5046 mg

8.1.2 Mannitpuffer

Tabelle 19: Zusammensetzung des Mannitpuffers

Substanz	Summenformel	MG	mmol/l	g/5l
	NaCl	58,44	115,00	33,60
	NaHCO ₃	84,01	25,00	10,50
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	137,99	0,40	0,28
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	177,99	2,40	2,14
	KCl	74,56	5,00	1,86
Mannit	C ₆ H ₁₄ O ₆	182,17	12,00	10,9302
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	1,20	0,88
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,30	1,20	1,22
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,8	1,4 µM	2,5046 mg

8.1.3 Transportpuffer

Tabelle 20: Zusammensetzung des Transportpuffers

Substanz	Summenformel	MG	mmol/l	g/5l
	NaCl	58,44	115,00	33,60
	NaHCO ₃	84,01	25,00	10,50
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	137,99	0,40	0,28
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂	177,99	2,40	2,14
	KCl	74,56	5,00	1,86
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	198,18	5,00	4,95
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	147,02	1,20	0,88
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	203,30	1,20	1,22
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	357,8	2,8 µM	5,0092 mg

Die Einstellung der Osmolarität von 300 mosmol/l erfolgt mittels des Osmometers Typ 5B, Nr. 9009010, Baujahr 1990 der Firma Roebling Messtechnik GmbH, Berlin.

8.2 Firmenverzeichnis

Tabelle 21: Firmenverzeichnis

Substanz / Handelsname	Summenformel	Firma	Reinheit
	NaCl	Carl Roth	≥ 99,5 % pro analysis (p.a.)
	NaHCO ₃	Merck	p.a.
	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	Merck	p.a.
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂	Merck	p.a.
	KCl	Carl Roth	≥ 99,5 % p.a.
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆ · H ₂ O	Merck	p.a.
Mannit	C ₆ H ₁₄ O ₆	Sigma	99 %
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Sigma	99 %
	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	Carl Roth	Ph. Eur. ≥ 98 %
Indomethacin	C ₁₉ H ₁₆ ClNO ₄	Sigma	99 %

Methanol		Merck	p.a.
Theophyllin		Sigma	99 %
L-Glutamin		Sigma	Biotechnology Performance Certified
Prostaglandin E ₂	C ₂ OH ₃₂ O ₅	Sigma	Approx. 99 % TLC
Ketamin (Ursotamin [®])		Serumwerk Bernburg AG	pro injectionem (p.i.)
Pentobarbital (Eutha [®] 77)		Essex Tierarznei	p.i.
Azaperon (Stressnil [®])		Janssen-Cilag GmbH	p.i.

8.3 Lösungen und Firmenadressen

Interleukin-1 α

PAN-BIOTECH GmbH, Am Gewerbepark 13, 94501 Aldenbach bzw.

R&D Systems GmbH, Borsigstrasse 7, 65205 Wiesbaden-Nordenstadt.

Zum Ansatz wurden 10 μ g IL-1 α in 10 ml 0,1 %iger BSA-PBS-Lösung verbracht. Dies ergab die Stammlösung (1 μ g/ml), welche aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt wurde.

Zum Erreichen der einzelnen Konzentrationen für den Versuch wurde am Versuchstag jeweils ein Röhrchen aufgetaut und zunächst 10 μ l mit 1 ml Glucosepuffer ohne Indomethacinzusatz verdünnt und 100 μ l zur serosalen Säule (10 ml) hinzugegeben, um die Konzentrationen von 0,1 ng/ml zu erreichen. Die Konzentrationen von 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml sowie 100 ng/ml wurden durch Zugabe von 10 μ l, 50 μ l, 100 μ l sowie 1 ml der Stammlösung zur serosalen Seite erreicht.

Indomethacin

SIGMA-ALDRICH LOGISTIK GmbH, Kappelweg 1, 91625 Schnelldorf.

Für den Ansatz von 1,4 μ mol/l Indomethacin wurden 60,1104 mg Indomethacin-Pulver in 4800 μ l Methanol gelöst, je 40 μ l in Eppendorfgefäße abgefüllt und tiefgefroren (-20 °C).

α -D(+)-Glucose Monohydrat

Carl Roth GmbH & Co., Schoemperlenstr. 1–5, 76185 Karlsruhe
(Chargen-Nummer 07253133).

Um eine 4 mM Stammlösung für den Ansatz der weiteren Konzentrationen zu erhalten, wurden 7,9272 mg Glucose-Pulver in 100 μ l Aqua bidest. gelöst. 25 μ l der 4 mM

Ausgangslösung wurden mit 75 µl Aqua bidest. Verdünnt und lieferte eine 1 mM Lösung. Eine Verdünnung von 12,5 µl der vier millimolaren Ausgangslösung mit 87,5 µl Aqua bidest. ergab eine Konzentration von 0,5 mmol/l.

PGE₂

SIGMA-ALDRICH LOGISTIK GmbH, Kappelweg 1, 91625 Schnelldorf
(Produkt-Referenz P5640, Chargen-Nummer 045K1107).

1 mg PGE₂ wurde zunächst in 100 µl Ethanol gelöst (Stammlösung). Um eine Konzentration von 3 µmol zu erreichen, wurden 50 µl davon mit 4205,3191 µl Aqua bidest. verdünnt. 90 µl dieser Verdünnung entsprachen einer Konzentration von 3 µmol. Die Verdünnung von 50 µl der Ausgangslösung mit 28318,794 µl Aqua bidest. ergab in der Menge von 100 µl eine Konzentration von 0,5 µmol. 5 ml der 0,5 µmolaren-Verdünnung, nochmals verdünnt mit 45 ml Aqua bidest., ergab bei Zugabe von 100 µl zur Säule eine Konzentration von 0,05 µmol und bei Zugabe von 200 µl zur Säule entsprechend eine Konzentration von 0,1 µmol.

L-Glutamin

SIGMA-ALDRICH LOGISTIK GmbH, Kappelweg 1, 91625 Schnelldorf.

Um 12 mmol/l L-Glutamin in der Säule (10 ml Puffer) zu erhalten, wurden 17,532 mg L-Glutamin-Pulver in 1 ml Mannitpuffer gelöst und dazugegeben.

Mannitgleich für L-Glutamin und Glucose

SIGMA-ALDRICH LOGISTIK GmbH, Kappelweg 1, 91625 Schnelldorf.

Um einen osmotischen Ausgleich für die mukosale Zugabe von 12 mmol/l L-Glutamin zu schaffen, wurden 5465,1 mg Mannit in 50 ml Glucosepuffer gelöst und die entsprechenden Konzentrationen zur serosalen Seite dazu gegeben.

Um eine Mannitkonzentration für den Glucose-Ausgleich von 4 mmol/l zu erhalten, wurden 7,2868 mg Mannit in 100 µl Aqua bidest. gelöst. 5 ml dieser Stammlösung vermischt mit weiteren 15 ml Aqua bidest. ergaben eine Konzentration von 1 mmol/l. 25 ml der Stammlösung verdünnt mit 175 ml Aqua bidest. lieferten eine Konzentration von 0,5 mmol/l.

Theophyllin

SIGMA-ALDRICH LOGISTIK GmbH, Kappelweg 1, 91625 Schnelldorf.

1729,92 mg Theophyllin wurden jeweils in 240 ml Glucose- bzw. Mannitpuffer gelöst und zu den entsprechenden Seiten der Säulen dazu gegeben.

Phlorizin-Dihydrate (Phloretin 2'- β -D-Glucoside; Phlorizin) from Apple Wood
SIGMA-ALDRICH LOGISTIK GmbH, Kappelweg 1, 91625 Schnelldorf
(Produkt-Referenz P3449, Chargen-Nummer 083K7072).

Um die Stammlösung mit einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ zu erhalten, wurden 23,6 mg Phlorizin in 2,50 ml absolutem Ethanol gelöst und mit 47,5 ml Glucosepuffer ohne Indomethacin zu Portionen von 5 ml aufgeteilt und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Von dieser Lösung wurden 100 μl mukosal zugegeben. Um eine Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ zu erhalten wurde die Menge an Phlorizin entsprechend verfünffacht.

8.4 Diätfutter

Tabelle 22: Zusammensetzung der einzelnen Diäten (persönliche Mitteilung von David Taras, Institut für Tierernährung, Freie Universität Berlin; (Klär, 2008; Scharek-Tedin, 2009))

	Tragende Sauen (91. bis 0. Tag ante partum)	Laktierende Sauen (0. bis 28. Tag post partum)	Saugferkel (15. bis 28. LT)	Absatzferkel (29. bis 56. LT)
Rohstoffe in %				
Gerste	17,60	20,50	-	13,00
Triticale	10,00	10,00	-	-
Weizenkleie	37,60	17,70	-	-
Weizen	13,00	15,00	45,47	64,00
Sojaschrot 48% Rohprotein	-	160,40	27,40	16,56
Mais	-	10,00	-	-
Magermilchpulver	-	-	12,00	-
Haferflocken	-	-	10,00	-
Sonnenblumen- extraktionsschrot	8,20	-	-	-
Sojaöl	-	-	1,00	1,30
Roggen	5,00	-	-	-
Erbsen	4,00	5,00	-	-
Calciumcarbonat	1,39	1,50	1,10	1,48
Pflanzenfett	0,25	2,00	-	-
Melasse	2,00	-	-	-
Prämix [§]	0,75	1,00	1,20	1,20
Monocalcium- Phosphat	-	0,75	1,30	1,56
Natriumchlorid	0,13	0,03	-	-
L-Lysin HCL	0,08	0,07	0,30	0,35
DL-Methionin	-	0,05	0,16	0,06
L-Threonin	-	-	-	0,09
L-Tryptophan	-	-	0,07	0,04
ME [MJ/kg]	10,60	13,0	13,8	13,1
Lysin g/kg	6,0	10,0	16,3	8,9

Anmerkung: * Kalkulierte Werte für ME, alle anderen Werte wurden analysiert.

[§] Die Diät wurde für tragende/laktierende Sauen/Ferkel pro kg der kompletten Diät supplementiert mit: 12.000/16.000/4.800 IU Vitamin A, 1.500/2.000/480 IU Vitamin D₃, 45/60/50,4 mg Vitamin E,

2,6/3,5/2,4 mg Vitamin K₃, 1,5/2/2,4 mg Thiamin, 4,5/6/3 mg Riboflavin, 3/4/4,8 mg Vitamin B₆, 28,5/38/36 µg Vitamin B₁₂, 18,8/25/42 mg Nikotinsäure, 112,5/150/240 µg Biotin, 7,5/10/18 mg Pantothersäure, 0,9/1,2/1,2 mg Folsäure, 300/400/960 mg Cholinchlorid, 75/100/60 mg Zn als ZnSO₄, 150/200/24 mg Fe als FeSO₄, 60/80/60 mg Mn als MnO, 23,3/31/14,4 mg Cu als CuSO₄, 0,6/0,8/480 mg Co als CoSO₄, 0,3/0,4/420 mg Se als NaSeO₃, 1,5/2/0,6 mg I als NaI, 1,5/2/1,5 g Na als NaCl, 825/1,1/0 mg Ca als CaCO₃, 0/0/0,6 g Mg.

8.5 Berechnungen für die Kinetik

8.5.1 Startwerte der Kinetik

Die SPSS-Syntax zur Berechnung von K_m und I_{scmax} für PGE₂ und Glucose sind nachfolgend auszugsweise dargestellt.

```
* NonLinear Regression.
MODEL PROGRAM VMAX=80 KM=0.1 .
COMPUTE PRED_ = (Vmax*KonzPGE2)/(Km+KonzPGE2).
NLR PGEdlsc
  /OUTFILE='TEMP'
  /PRED PRED_
  /CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8 .
```

Abb. 43: SPSS-Syntax zur Berechnung von K_m und I_{scmax} nach PGE₂-Zugabe mittels nichtlinearer Regression (KonzPGE2 = serosale PGE₂-Konzentration; PGEdlsc = ΔI_{sc} nach PGE₂-Zugabe)

Startwerte der Nichtlinearen Regression für PGE₂:

$$K_m = 0,1 \mu\text{mol/l}$$

$$I_{scmax} = 80 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$$

```
* NonLinear Regression.
MODEL PROGRAM VMAX=55 KM=1.8 .
COMPUTE PRED_ = (Vmax*KonzGluc)/(Km+KonzGluc).
NLR Gluc5dlsc
  /OUTFILE='TEMP'
  /PRED PRED_
  /CRITERIA SCONVERGENCE 1E-8 PCON 1E-8 .
```

Abb. 44: SPSS-Syntax zur Berechnung von K_m und V_{max} nach Glucose-Zugabe mittels nichtlinearer Regression (KonzGluc = mukosale Glucose-Konzentration; Gluc5dlsc = ΔI_{sc} fünf Minuten nach Glucose-Zugabe)

Startwerte der Nichtlinearen Regression für Glucose:

$$K_m = 1,8 \text{ mmol/l}$$

$$I_{scmax} = 55 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$$

8.5.2 Umrechnung des Kurzschlussstromes I_{scmax} in die Transportgeschwindigkeit V_{max}

Zur Umrechnung des maximalen Kurzschlussstromes I_{scmax} in die maximale Transportgeschwindigkeit V_{max} ist die Herleitung der Gleichung 3.5.2 aus Kapitel 3.5.2 aus der Gleichung nach dem 1. Faradayschen Gesetz notwendig:

$$Q = n \cdot z \cdot F \quad (8.5.2a)$$

Q = Ladung

F = Faradaykonstante

z = Ladungszahl des verwendeten Ions

n = Stoffmenge

Da bei konstanter Stromstärke I die Ladung Q der Zeit t proportional ist, kann auch geschrieben werden:

$$Q = I \cdot t \quad (8.5.2b)$$

In Gleichung 8.5.2c eingesetzt ergibt sich:

$$I \cdot t = n \cdot z \cdot F \quad (8.5.2c)$$

I = hier als Kurzschlussstrom I_{sc} [$\mu A \cdot cm^{-2}$]

t = Zeit [s], in der vorliegenden Arbeit entspricht t = 3600, da die Berechnung über eine Stunde erfolgte

F = Faradaykonstante = 96485 [$\mu A \cdot s \cdot \mu mol^{-1}$]

n = transportierte Stoffmenge [$\mu mol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$]

z = Ladungszahl des verwendeten Ions; für Na^+ als Austauschion für Glucose = 2,
für die Sekretion von Cl^- als Reaktion auf PGE_2 = 1)

Nach Einsetzen in Gleichung 8.5.2c ergibt sich:

$$I_{sc} [\mu A/cm^2] \cdot 3600 [s] = 96485 [\mu A \cdot s/\mu mol] \cdot n [\mu mol/(cm^2 \cdot h)] \cdot 1 \quad (8.5.2d)$$

Umgeformt nach n ergibt sich:

$$n [\mu mol/(cm^2 \cdot h)] = \frac{I_{scmax} [\mu A/cm^2] \cdot 3600 [s]}{96485 [\mu A \cdot s/\mu mol]} \quad (8.5.2e)$$

Daraus ergibt sich dann:

$$n = V_{max} [\mu mol/(cm^2 \cdot h)] = \frac{I_{scmax}}{26,8013 [\mu A \cdot h/\mu mol]} \quad (3.5.2)$$

8.6 ΔI_{sc} bei Zugabe von 10 ng/ml IL-1 α serosal und 500 μ mol/l Phlorizin mukosal

Nachfolgend werden die Kurzschlussstromverläufe über die Zeit für die Versuche mit 10 ng/ml IL-1 α serosal und 500 μ mol/l Phlorizin mukosal für eine alters- und fütterungsunabhängige Betrachtung der in Kapitel 4.3.2 genannten Vergleichsgruppen dargestellt. Die Anzahl der eingesetzten Epithelien sowie die Anzahl der Versuchstiere können den Tabelle 15 und 16 entnommen werden.

Zur grafischen Darstellung wurden innerhalb der ersten zehn Minuten nach Zugabe der jeweiligen Substanz alle sechs Sekunden die Werte für I_{sc} , R_t und dP_0 bestimmt, in den nachfolgenden 35 Minuten erfolgte die Darstellung im Abstand von drei Minuten. Zur Bestätigung der Lebensfähigkeit der Epithelien am Ende des Versuches wurden die Reaktionen auf Theophyllin ebenfalls mit dargestellt. Der Zeitpunkt Null kennzeichnet die erste Zugabe der jeweiligen Substanz. Die einzelnen Zugabezeitpunkte der jeweiligen Substanzen sind in den Grafiken mit Pfeilen markiert. Zwischen Messende nach 45 Minuten und der Zugabe von Theophyllin wurde die komprimierte Zeitachse durch eine Unterbrechung der Abszisse gekennzeichnet.

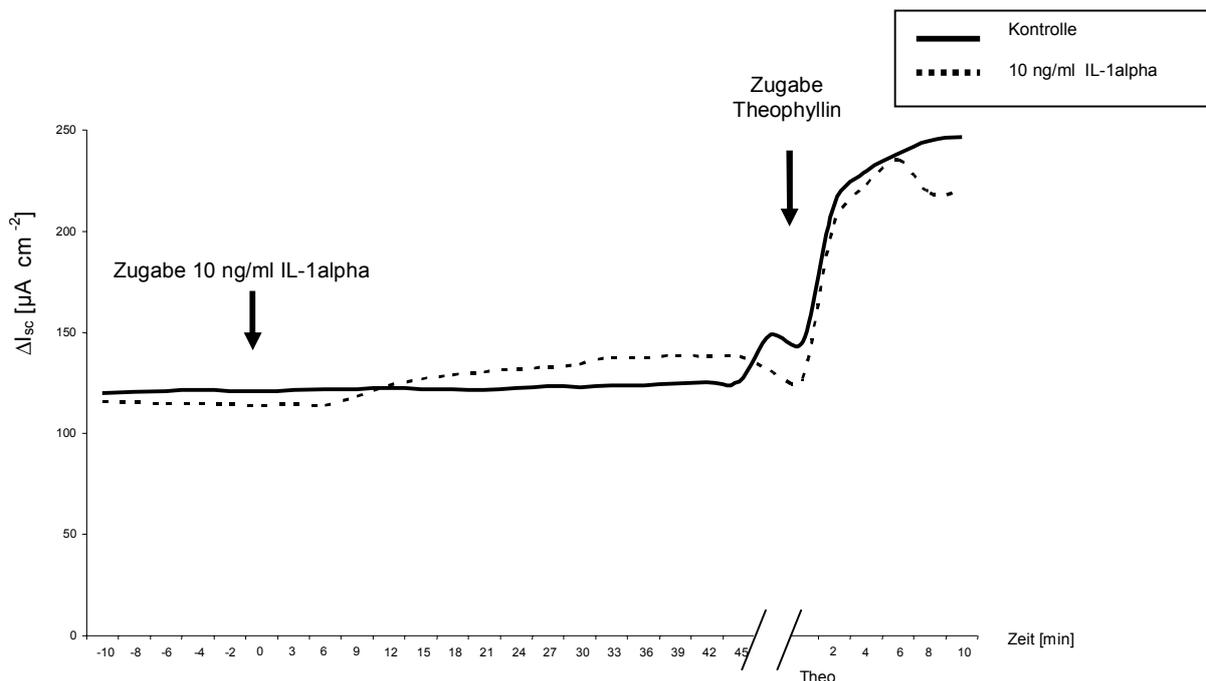


Abb. 48: I_{sc} -Verlauf über die Zeit; alters- und fütterungsunabhängige Darstellung der Mittelwerte der jeweiligen Versuche [Vergleich Kontrolle mit 10 ng/ml IL-1 α serosal]

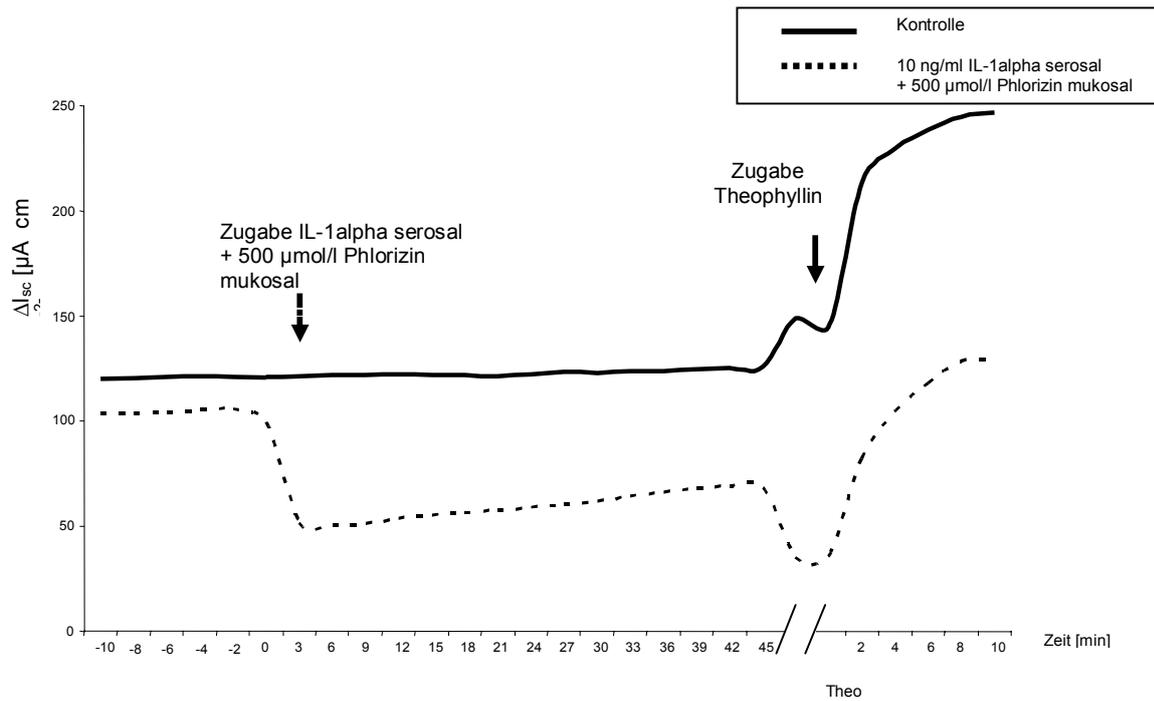


Abb. 49: I_{sc} -Verlauf über die Zeit; alters- und fütterungsunabhängige Darstellung der Mittelwerte der jeweiligen Versuche [Vergleich Kontrolle mit 10 ng/ml IL-1 α serosal + 500 μ mol/l Phlorizin mukosal]

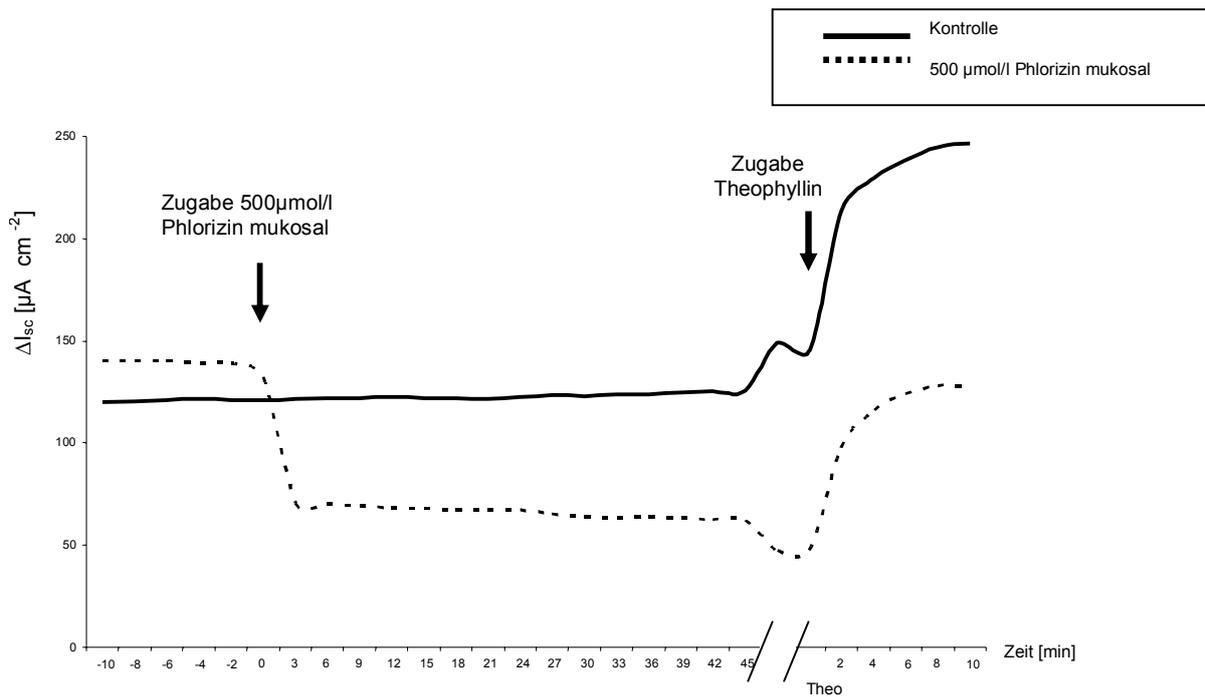


Abb. 50: I_{sc} -Verlauf über die Zeit; alters- und fütterungsunabhängige Darstellung der Mittelwerte der jeweiligen Versuche [Vergleich Kontrolle mit 500 μ mol/l Phlorizin mukosal]

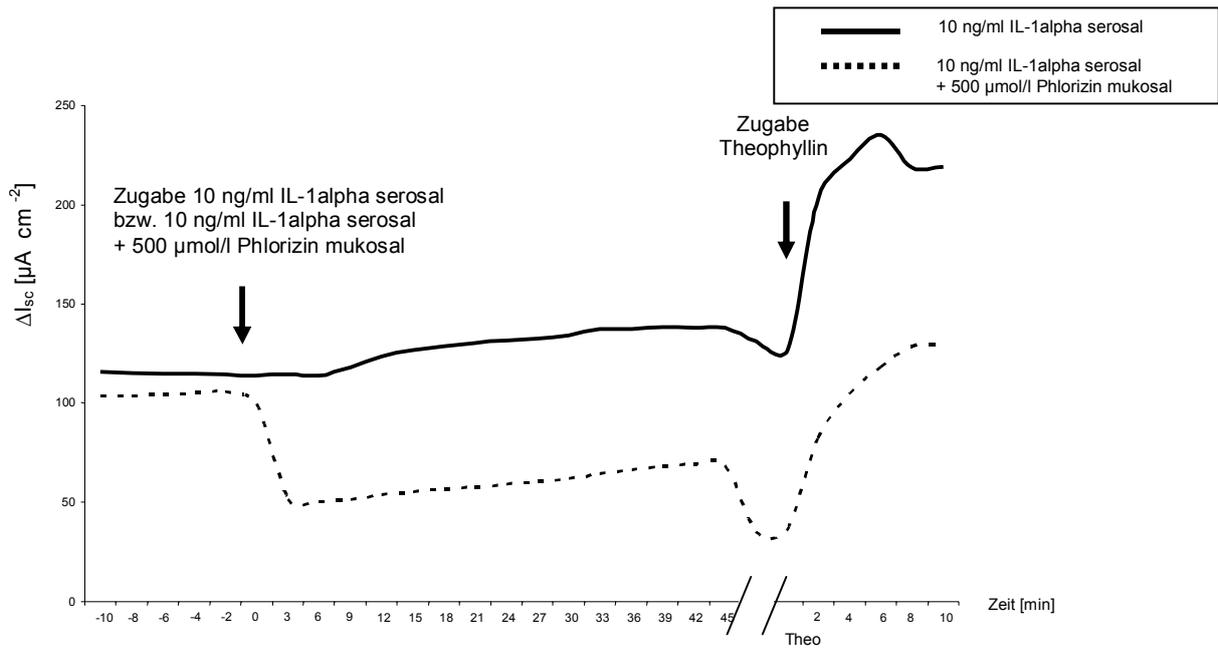


Abb. 51: I_{sc} -Verlauf über die Zeit; alters- und fütterungsunabhängige Darstellung der Mittelwerte der jeweiligen Versuche [Vergleich 10 ng/ml IL-1 α serosal mit 10 ng/ml IL-1 α serosal + 500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal]

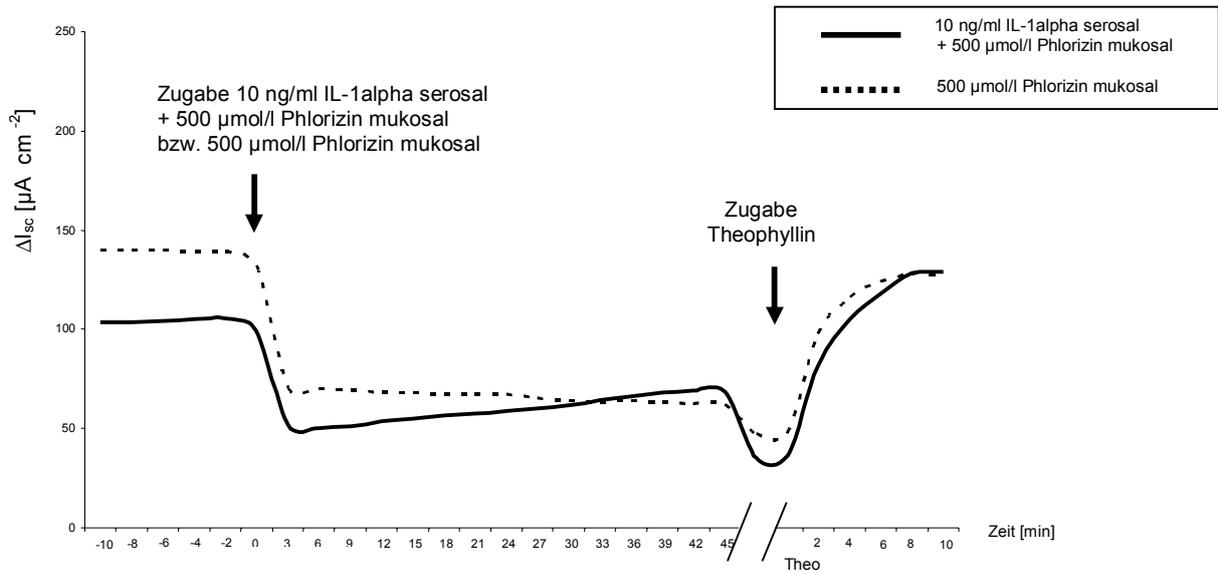


Abb. 52: I_{sc} -Verlauf über die Zeit; alters- und fütterungsunabhängige Darstellung der Mittelwerte der jeweiligen Versuche [Vergleich 10 ng/ml IL-1 α serosal + 500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal mit 500 $\mu\text{mol/l}$ Phlorizin mukosal]

9. Literaturverzeichnis

- Akabas, M.H. (2000):** Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Structure and function of an epithelial chloride channel. *J Biol Chem* 275: 3729-3732.
- Alexopoulos, C., Georgoulakis, I.E., Tzivara, A., Kritas, S.K., Siochu, A., Kyriakis, S.C. (2004):** Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 88: 381-392.
- Alvarez-Olmos, M.I., Oberhelman, R.A. (2001):** Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis* 32: 1567-1576.
- Andre, R., Pinteaux, E., Kimber, I., Rothwell, N.J. (2005):** Differential actions of IL-1 alpha and IL-1 beta in glial cells share common IL-1 signalling pathways. *Neuroreport* 16: 153-157.
- Atuma, C., Strugala, V., Allen, A., Holm, L. (2001):** The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G922-929.
- Austic, R.E. (1985):** Development and adaptation of protein digestion. *J Nutr* 115: 686-697.
- Bailey, M., Plunkett, F.J., Rothkotter, H.J., Vega-Lopez, M.A., Haverson, K., Stokes, C.R. (2001):** Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proc Nutr Soc* 60: 427-435.
- Barbosa, T.M., Serra, C.R., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Henriques, A.O. (2005):** Screening for bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 71: 968-978.
- Barksby, H.E., Lea, S.R., Preshaw, P.M., Taylor, J.J. (2007):** The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin Exp Immunol* 149: 217-225.
- Barman, N.N., Bianchi, A.T., Zwart, R.J., Pabst, R., Rothkotter, H.J. (1997):** Jejunal and ileal Peyer's patches in pigs differ in their postnatal development. *Anat Embryol (Berl)* 195: 41-50.
- Barrett, K.E., Keely, S.J. (2000):** Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62: 535-572.
- Batt, E.R., Schachter, D. (1969):** Developmental pattern of some intestinal transport mechanisms in newborn rats and mice. *Am J Physiol* 216: 1064-1068.
- Baum, B., Liebler-Tenorio, E.M., Enss, M.L., Pohlenz, J.F., Breves, G. (2002):** *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *Toyo* influence the morphology and the mucins of the intestine of pigs. *Z Gastroenterol* 40: 277-284.
- Baumgart, D.C., Dignass, A.U. (2002):** Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 5: 685-694.
- Bell, G.I., Kayano, T., Buse, J.B., Burant, C.F., Takeda, J., Lin, D., Fukumoto, H., Seino, S. (1990):** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13: 198-208.
- Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R.E., Schiffrin, E.J., von der Weid, T. (2003):** Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J Nutr* 133: 1158-1162.

- Benyacoub, J., Perez, P.F., Rochat, F., Saudan, K.Y., Reuteler, G., Antille, N., Humen, M., De Antoni, G.L., Cavadini, C., Blum, S., Schiffrin, E.J. (2005):** Enterococcus faecium SF68 enhances the immune response to Giardia intestinalis in mice. *J Nutr* 135: 1171-1176.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003):** Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg.
- Bertrand, C.A., Frizzell, R.A. (2003):** The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 285: C1-18.
- Blikslager, A.T., Roberts, M.C., Argenzio, R.A. (1999):** Prostaglandin-induced recovery of barrier function in porcine ileum is triggered by chloride secretion. *Am J Physiol* 276: G28-36.
- Bode, B.P. (2001):** Recent molecular advances in mammalian glutamine transport. *J Nutr* 131: 2475S-2485S; discussion 2486S-2477S.
- Borchert, D., Sheridan, L., Papatsoris, A., Faruqz, Z., Barua, J.M., Junaid, I., Pati, Y., Chinegwundoh, F., Buchholz, N. (2008):** Prevention and treatment of urinary tract infection with probiotics: Review and research perspective. *Indian J Urol* 24: 139-144.
- Boudry, G., Lalles, J.P., Malbert, C.H., Bobillier, E., Seve, B. (2002):** Diet-related adaptation of the small intestine at weaning in pigs is functional rather than structural. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 34: 180-187.
- Boudry, G., Peron, V., Le Huerou-Luron, I., Lalles, J.P., Seve, B. (2004):** Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J Nutr* 134: 2256-2262.
- Breves, G., Walter, C., Burmester, M., Schröder, B. (2000):** In vitro studies on the effects of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on nutrient transport in pig jejunum. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 84: 9 - 20.
- Brosius, F. (2004):** *Explorative Datenanalyse*. In: Brosius, F. (ed.), SPSS 12. mitp-Verlag, Bonn, p. 387 - 412.
- Buddington, R.K., Diamond, J. (1992):** Ontogenetic development of nutrient transporters in cat intestine. *Am J Physiol* 263: G605-616.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (2012):** Liste der als Futterzusatzstoffe zugelassene Mikroorganismen. <http://www.bvl.de>
- Buts, J.P., Bernasconi, P., Van Craynest, M.P., Maldague, P., De Meyer, R. (1986):** Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. *Pediatr Res* 20: 192-196.
- Buts, J.P., De Keyser, N., Marandi, S., Hermans, D., Sokal, E.M., Chae, Y.H., Lambotte, L., Chanteux, H., Tulkens, P.M. (1999):** *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut* 45: 89-96.
- Buydens, P., Debeuckelaere, S. (1996):** Efficacy of SF 68 in the treatment of acute diarrhea. A placebo-controlled trial. *Scand J Gastroenterol* 31: 887-91.
- Cartwright, C.A., McRoberts, J.A., Mandel, K.G., Dharmasathaphorn, K. (1985):** Synergistic action of cyclic adenosine monophosphate- and calcium-mediated chloride secretion in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* 76: 1837-1842.
- Chiossone, D.C., Simon, P.L., Smith, P.L. (1990):** Interleukin-1: Effects On Rabbit Ileal Mucosal Ion Transport In Vitro. *European Journal of Pharmacology* 180: 217-228.
- Collado, M.C., Surono, I., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007):** Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *J Food Sci* 72: M89-93.

- David, J.C., Grongnet, J.F., Lalles, J.P. (2002):** Weaning affects the expression of heat shock proteins in different regions of the gastrointestinal tract of piglets. *J Nutr* 132: 2551-2561.
- Davidson, J.N., Hirsh, D.C. (1976):** Bacterial competition as a means of preventing neonatal diarrhea in pigs. *Infect Immun* 13: 1773-1774.
- de Moreno de LeBlanc, A., Chaves S., Carmuega E., Weill, R. Antóine J., Perdigon, G. (2008) :** Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunology* 213: 97-108.
- den Dekker, W.K., Cheng, C., Pasterkamp, G., Duckers, H.J. (2009):** Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization. *Atherosclerosis*.
- Dendukuri, N., Costa, V., McGregor, M., Brophy, J.M. (2005):** Probiotic therapy for the prevention and treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review. *Cmaj* 173: 167-170.
- Diamond, J.M., Karasov, W.H., Cary, C., Enders, D., Yung, R. (1984):** Effect of dietary carbohydrate on monosaccharide uptake by mouse small intestine in vitro. *J Physiol* 349: 419-440.
- Dinarello, C.A. (1996):** Biologic Basis For Interleukin-1 In Disease. *The Journal of The American Society of Hematology* 87: 2095 - 2147.
- Dinarello, C.A. (2009):** Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27: 519-550.
- Dinarello, C.A. (1991):** Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* 77: 1627-1652.
- Dinarello, C.A. (2000):** Proinflammatory cytokines. *Chest* 118: 503-508.
- Drozdzowski, L.A., Clandinin, T., Thomson, A.B. (2010):** Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World J Gastroenterol* 16: 787-799.
- Du Toit, M., Franz, C.M.A.P., Dicks, L.M.T., Holzapfel, W.H. (2000):** Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology* 88: 482 - 494.
- Ehrenkranz, J.R., Lewis, N.G., Kahn, C.R., Roth, J. (2005):** Phlorizin: a review. *Diabetes Metab Res Rev* 21: 31-38.
- El Asmar, R., Panigrahi, P., Bamford, P., Berti, I., Not, T., Coppa, G.V., Catassi, C., Fasano, A. (2002):** Host-dependent zonulin secretion causes the impairment of the small intestine barrier function after bacterial exposure. *Gastroenterology* 123: 1607-1615.
- Erlwanger, K.H., Unmack, M.A., Grondahl, M.L., Skadhauge, E., Thorboll, J.E. (1999):** Effect of age on vasoactive intestinal polypeptide-induced short-circuit current in porcine jejunum. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 124: 29-33.
- Famularo, G., Moretti, S., Marcellini, S., De Simone, C. (1997):** *Stimulation of Immunity by Probiotics*. In: Fuller, R. (ed.), *Probiotics 2 - Applications and Practical Aspects*. Chapman & Hall, London, p. 133 - 161.
- Fan, M.Z. (2003):** *Growth And Ontogeny Of The Gastrointestinal Tract*. In: Xu, R.-J., Cranwell, P. (eds.), *The Neonatal Pig - Gastrointestinal Physiology And Nutrition*, Nottingham, p. 31 - 60.
- Fan, M.Z., Stoll, B., Jiang, R., Burrin, D.G. (2001):** Enterocyte digestive enzyme activity along the crypt-villus and longitudinal axes in the neonatal pig small intestine. *J Anim Sci* 79: 371-381.

- Feller, A.C. (1997):** *Lymphatisches System*. In: W. Böcker, H.D.u.P.U.H. (ed.), Pathologie. Urban und Schwarzenber, München, Wien, Baltimore, p. 489-524.
- Ferraris, R.P., Diamond, J. (1992):** Crypt-villus site of glucose transporter induction by dietary carbohydrate in mouse intestine. *Am J Physiol* 262: G1069-1073.
- Ferraris, R.P., Diamond, J. (1997):** Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol Rev* 77: 257-302.
- Field, M. (2003):** Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest* 111: 931-943.
- Field, M., Semrad, C.E. (1993):** Toxigenic diarrheas, congenital diarrheas, and cystic fibrosis: disorders of intestinal ion transport. *Annu Rev Physiol* 55: 631-655.
- Foulque Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006):** The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 106: 1-24.
- Fuchs, G., Schlegel, H.-G. (2006):** Die Rolle von Mikroorganismen im Stoffkreislauf und in der Natur. In: Allgemeine Mikrobiologie. Thieme Verlag, Stuttgart. p. 525-570.
- Fuller, M.F., Reeds, P.J. (1998):** Nitrogen cycling in the gut. *Annu Rev Nutr* 18: 385-411.
- Fuller, R. (1992):** *History and Development of Probiotics*. In: Fuller, R. (ed.), Probiotics - The Scientific Basis. Chapman & Hall, London, London, p. 1-8.
- Fuller, R. (1997):** *Introduction*. In: Fuller, R. (ed.), Probiotics 2 - Applications and Practical Aspects. Chapman & Hall, London, London, p. 1 - 9.
- Fuller, R. (2004):** What Is A Probiotic? *Biologist* 51: 232.
- Gaskins, H.R. (2001):** *Intestinal Bacteria And Their Influence On Swine Growth*. In: Lewis, A.J., Southern, L.L. (eds.), Swine Nutrition. CRC Press, Boca Raton; London; New York; Washington, D.C., p. 585 - 608.
- Gaskins, H.R., Kelley, K.W. (1995):** *Immunology And Neonatal Mortality*. In: Varley, M.A. (ed.), The Neonatal Pig - Development And Survival. CAB International, Oxon, p. 39 - 55.
- Ghosh, S., Karin, M. (2002):** Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl: S81-96.
- Gibson, G.R., Saavedra, J.M., Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. (1997):** *Probiotics and Intestinal Infections*. In: Fuller, R. (ed.), Probiotics 2 - Applications and Practical Aspects. Chapman & Hall, London, p. 10 - 39.
- Gill, M., Bartolo, R.C., Demmers, K., Harfoot, N., Fan, S., Butt, G. (2011):** The distribution and expression of CFTR restricts electrogenic anion secretion to the ileum of the brushtail possum, *Trichosurus vulpecula*. *J Exp Biol* 214: 1943-1954.
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A. (2008):** The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl Microbiol Biotechnol* 81: 591-606.
- Gionchetti, P., Lammers, K.M., Rizzello, F., Campieri, M. (2005):** Probiotics and barrier function in colitis. *Gut* 54: 898-900.
- Görke, B., Liebler-Tenorio, E. (2001):** Probiotika: Gibt es wissenschaftliche Grundlagen für ihre Wirkung? *Dtsch tierärztl Wschr* 108: 249 - 251.
- Grondahl, M.L., Hansen, M.B., Larsen, I.E., Skadhauge, E. (1996):** Age and segmental differences in 5-hydroxytryptamine-induced hypersecretion in the pig small intestine. *J Comp Physiol [B]* 166: 21-29.
- Guth, J. (2006):** Untersuchungen zum Einfluss der probiotischen Futterzusätze *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 und *Bacillus cereus* var. Toyoi NCIMB 40112 auf den Immunstatus von Sauen und Ferkeln. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.

- Hardin, J., Kroeker, K., Chung, B., Gall, D.G. (2000):** Effect of proinflammatory interleukins on jejunal nutrient transport. *Gut* 47: 184-191.
- Havenaar, R., Ten Brink, B., Huis in't Veld, J.H.J. (1992):** *Selection Of Strains For Probiotic Use*. In: Fuller, R. (ed.), *Probiotics - The Scientific Basis*. Chapman & Hall, London, London, p. 209 - 224.
- Hawrelak, J.A., Whitten, D.L., Myers, S.P. (2005):** Is *Lactobacillus rhamnosus* GG effective in preventing the onset of antibiotic-associated diarrhoea: a systematic review. *Digestion* 72: 51-56.
- Hediger, M.A., Rhoads, D.B. (1994):** Molecular physiology of sodium-glucose cotransporters. *Physiol Rev* 74: 993-1026.
- Hentges, D.J. (1992):** *Gut Flora And Disease Resistance*. In: Fuller, R. (ed.), *Probiotics - The Scientific Basis*. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, London, p. 87-110.
- Herich, R., Levkut, M. (2002):** Lact Acid Bacteria, Probiotics And Immune System. *Vet Med - Czech* 47: 169 - 180.
- Hessle, C., Hanson, L.A., Wold, A.E. (1999):** Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 116: 276-282.
- Heumann, D., Barras, C., Severin, A., Glauser, M.P., Tomasz, A. (1994):** Gram-positive cell walls stimulate synthesis of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 by human monocytes. *Infect Immun* 62: 2715-2721.
- Heyman, M. (2000):** Effect of lactic acid bacteria on diarrheal diseases. *J Am Coll Nutr* 19: 137S-146S.
- Hill, J.R., Kwon, G., Marshall, C.A., McDaniel, M.L. (1998):** Hyperglycemic levels of glucose inhibit interleukin 1 release from RAW 264.7 murine macrophages by activation of protein kinase C. *J Biol Chem* 273: 3308-3313.
- Hoffmann, W. (2009):** Trefoil factor family (TFF) peptides and chemokine receptors: a promising relationship. *J Med Chem* 52: 6505-6510.
- Hu, X., Nestic-Taylor, O., Qiu, J., Rea, H.C., Fabian, R., Rassin, D.K., Perez-Polo, R. (2005):** Activation Of Nuclear Factor Kappa B Signaling Pathway By Interleukin-1 After Hypoxia/Ischemia In Neonatal Rat Hippocampus And Cortex. *Journal of Neurochemistry* 93: 26 - 37.
- Huo, Y.J., Wang, T., Xu, R.J. (2003):** *Nutrition And Metabolism Of Neonatal Pigs*. In: Xu, R.-J., Cranwell, P. (eds.), *The Neonatal Pig - Gastrointestinal Physiology and Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, p. 185-212.
- Ikari, A., Nakano, M., Kawano, K., Suketa, Y. (2002):** Up-regulation of sodium-dependent glucose transporter by interaction with heat shock protein 70. *J Biol Chem* 277: 33338-33343.
- Ikumi, Y., Kida, T., Sakuma, S., Yamashita, S., Akashi, M. (2008):** Polymer-phloridzin conjugates as an anti-diabetic drug that inhibits glucose absorption through the Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) in the small intestine. *J Control Release* 125: 42-49.
- Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpaa, P., Arvilommi, H., Salminen, S. (2001):** Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 73: 444S-450S.
- Jahn, H.U., Ullrich, R., Schneider, T., Liehr, R.M., Schieferdecker, H.L., Holst, H., Zeitz, M. (1996):** Immunological and trophical effects of *Saccharomyces boulardii* on the small intestine in healthy human volunteers. *Digestion* 57: 95-104.
- Jain, A.K. (2007):** Solubilization of indomethacin using hydrotropes for aqueous injection. *Eur J Pharm Biopharm*.

- Jansen, N. (2004):** Wirkungen von *Enterococcus faecium* auf transportphysiologische Parameter des Jejunums vom Schwein. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.
- Jin, L.Z., Marquardt, R.R., Zhao, X. (2000):** A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl Environ Microbiol* 66: 4200-4204.
- Jonsson, E., Conway, P. (1992):** *Probiotics for Pigs*. In: Fuller, R. (ed.), *Probiotics - The Scientific Basis*. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, London, p. 260-316.
- Kellett, G.L. (2001):** The facilitated component of intestinal glucose absorption. *J Physiol* 531: 585-595.
- Kellett, G.L., Helliwell, P.A. (2000):** The diffusive component of intestinal glucose absorption is mediated by the glucose-induced recruitment of GLUT2 to the brush-border membrane. *Biochem J* 350 Pt 1: 155-162.
- Kenny, M., Smidt, H., Mengheri, E., Miller, B. (2010):** Probiotics - do they have a role in the pig industry? *Animal* 5: 462-470.
- Khan, J.M., Wingertzahn, M.A., Teichberg, S., Vancurova, I., Harper, R.G., Wapnir, R.A. (2000):** Development of the intestinal SGLT1 transporter in rats. *Mol Genet Metab* 69: 233-239.
- Kirchgessner, M., Roth, F.X., Eidelsburger, U., Gedek, B. (1993):** Zur nutritiven Wirksamkeit von *Bacillus cereus* als Probiotikum in der Ferkelaufzucht. *Arch Anim Nutr* 44: 111 - 121.
- Klär, I. (2008):** Einfluss der Verfütterung des Probiotikums *E. faecium* NCIMB 10415 im frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.
- Krammer, M., Karbach, U. (1993):** Antidiarrheal action of the yeast *saccharomyces boulardii* in the rat small and large intestine by stimulating chloride absorption. *Gastroenterol (Suppl 4) Suppl. 4*: 73 - 77.
- Krüger, M., Seidler, T. (2006):** *Allgemeine Bakteriologie*. In: Rolle, M., Mayr, A. (eds.), *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*. Enke Verlag, Stuttgart, p. 344-391.
- Kyriakis, S.C., Tsiloyiannis, V.K., Vlemmas, J., Sarris, K., Tsinas, A.C., Alexopoulos, C., Jansegers, L. (1999):** The Effect of Probiotic LSP 122 on the Control of post-weaning Diarrhoea Syndrome of Piglets. *Research in Veterinary Science* 67: 223 - 228.
- Laukova, A., Stropfova, V., Ouwehand, A. (2004):** Adhesion properties of enterococci to intestinal mucus of different hosts. *Vet Res Commun* 28: 647-655.
- Lee, Y.-K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S.L. (1999):** *Probiotic Microorganisms*. In: Lee, Y.-K., Nomoto, K., Salminen, S., Gorbach, S.L. (eds.), *Handbook Of Probiotics*. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, p. 4-6.
- Leonhard-Marek, S., Hempe, J., Schroeder, B., Breves, G. (2009):** Electrophysiological characterization of chloride secretion across the jejunum and colon of pigs as affected by age and weaning. *J Comp Physiol B* 179: 883-896.
- Li, C.Y., Jiang, L.Y., Chen, W.Y., Li, K., Sheng, H.Q., Ni, Y., Lu, J.X., Xu, W.X., Zhang, S.Y., Shi, Q.X. (2009):** CFTR is essential for sperm fertilizing capacity and is correlated with sperm quality in humans. *Hum Reprod*.

- Liebich, H.-G. (1999a):** *Verdauungsapparat (Apparatus digestorius)*. In: Liebich, H.-G. (ed.), Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. F.K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, New York, p. 176-231.
- Liebich, H.-G. (1999b):** *Zytologie, die Lehre von der Zelle*. In: Liebich, H.-G. (ed.), Funktionelle Histologie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. F. K. Schattauer Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, New York, p. 31-32.
- Lodemann, U., Dahms, S., Martens, H., Arndt, G. (2004):** Diskussion eines biometrischen Modells zur Bewertung von Fütterungs-, Alters- und Tiereffekten auf transportphysiologische Eigenschaften der Dünndarmschleimhaut. Dtsch Tierarztl Wochenschr 111: 209 - 212.
- Lodemann, U., Hubener, K., Jansen, N., Martens, H. (2006):** Effects of *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 as probiotic supplement on intestinal transport and barrier function of piglets. Arch Anim Nutr 60: 35-48.
- Lodemann, U., Hübener, K., Jansen, N., Martens, H. (2003a):** Age-dependent changes of glucose transport in the small intestine of piglets with and without supplementation of *Enterococcus faecium*. Int. J. Med. Microbiol. 293: Suppl. 36:314.
- Lodemann, U., Hübener, K., Jansen, N., Martens, H. (2003):** Effects of a probiotic preparation of *Enterococcus faecium* (SF 68) on epithelial transport properties of pig jejunum. Proc Soc Nutr Physiol 12: 66.
- Lolis, N., Veldekis, D., Moraitou, H., Kanavaki, S., Velegraki, A., Triandafyllidis, C., Tasioudis, C., Pefanis, A., Pneumatikos, I. (2008):** *Saccharomyces boulardii* fungaemia in an intensive care unit patient treated with caspofungin. Crit Care 12: 414.
- Lorenz, B.M. (2006):** Wirkungen von *Bacillus cereus* var. *toyoi* auf transportphysiologische Parameter des mittleren Jejunums von Ferkeln im Alter von 2 bis 8 Wochen. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.
- Luyer, M.D., Buurman, W.A., Hadfoune, M., Speelmans, G., Knol, J., Jacobs, J.A., Dejong, C.H., Vriesema, A.J., Greve, J.W. (2005):** Strain-specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. Infect Immun 73: 3686-3692.
- Lye, H.S., Kuan, C.Y., Ewe, J.A., Fung, W.Y., Liong, M.T. (2009):** The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, Renin, and phytoestrogens. Int J Mol Sci 10: 3755-3775.
- Maassen, C., Laman, J.D., Boersma, W.J.A., Claassen, E. (2000):** *Modulation Of Cytokine Expression By Lactobacilli And Its Possible Therapeutic Use*. In: Fuller, R., Perdigon, G. (eds.), Probiotics 3 - Immunomodulation By The Gut Microflora And Probiotics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, p. 176 - 192.
- Macha, M. (2004):** Auswirkungen eines *Enterococcus faecium*-Probiotikums auf Leistungsdaten und ausgewählte Parameter der intestinalen Mikrobiota beim Schwein. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.
- Mackenzie, B., Loo, D.D., Wright, E.M. (1998):** Relationships between Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1) currents and fluxes. J Membr Biol 162: 101-106.
- Mackie, R.I., Sghir, A., Gaskins, H.R. (1999):** Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am J Clin Nutr 69: 1035S-1045S.
- Macpherson, A.J., Gatto, D., Sainsbury, E., Harriman, G.R., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M. (2000):** A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. Science 288: 2222-2226.
- Madara, J.L. (1997):** The chameleon within: improving antigen delivery. Science 277: 910-911.

- Madej, M., Lundh, T., Lindberg, J.E. (1999):** Activities of enzymes involved in glutamine metabolism in connection with energy production in the gastrointestinal tract epithelium of newborn, suckling and weaned piglets. *Biol Neonate* 75: 250-258.
- Madsen, K., Cornish, A., Soper, P., McKaigney, C., Jijon, H., Yachimec, C., Doyle, J., Jewell, L., De Simone, C. (2001):** Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 121: 580-591.
- Mafamane, H. (2008):** Untersuchungen zu den immunmodulatorischen Eigenschaften des Probiotikums *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF 68) auf die zelluläre Immunität beim Schwein während eines Experiments mit *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* DT104. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.
- Marteau, P.R., de Vrese, M., Cellier, C.J., Schrezenmeir, J. (2001):** Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 73: 430S-436S.
- Mayer, E.A. (2000):** The neurobiology of stress and gastrointestinal disease. *Gut* 47: 861-869.
- Mayer, L. (2003):** Mucosal immunity. *Pediatrics* 111: 1595-1600.
- McCracken, B.A., Spurlock, M.E., Roos, M.A., Zuckermann, F.A., Gaskins, H.R. (1999):** Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *J Nutr* 129: 613-619.
- McEwan, G.T., Schousboe, B., Nielsen, C.G., Skadhauge, E. (1990):** Effect of age on the secretory capacity of pig small intestine in vivo and in vitro. *Am J Physiol* 259: G474-480.
- Merz, H., Kleist, S.v., Feller, A.C. (1997):** *Immunreaktionen*. In: Böcker, W., Denk, H., Heitz, U. (eds.), *Pathologie*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, p. 98-139.
- Mest, H.-J. (1994):** *Eicosanoide*. In: Döcke, F. (ed.), *Veterinärmedizinische Endokrinologie*. Gustav Fischer Verlag Jena, Stuttgart, p. 672 - 690.
- Miettinen, M., Vuopio-Varkila, J., Varkila, K. (1996):** Production of human tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interleukin-10 is induced by lactic acid bacteria. *Infect Immun* 64: 5403-5.
- Mitsuoka, T. (1992):** Intestinal flora and aging. *Nutr Rev* 50: 438-446.
- Motulsky, H., Christopoulos, A. (2003):** *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression - A practical guide to curve fitting*. In: Prism, G. (ed.). GraphPad Software Inc., San Diego, CA.
- Müller-Esterl, W., Brandt, U., Anderka, O., Kieß, S., Ridinger, K., M., P. (2004):** *Regulation der Enzymaktivität*. In: Müller-Esterl, W. (ed.), *Biochemie Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Elsevier GmbH, München, p. 172 - 186.
- Mulder, R.W.A.W., Havenaar, R., Huis in 't Veld, J.H.J. (1997):** *Intervention strategies: the use of probiotics and competitive exclusion microfloras against contamination with pathogens in pigs and poultry*. In: Fuller, R. (ed.), *Probiotics 2 - Applications and practical aspects*. Chapman & Hall, 2 - 6 Boundary Row, London SE1 8HN, London, p. 187 - 207.
- Murray, L.J., Tully, O., Rudolph, D.S., Whitby, M., Valenzano, M.C., Mercogliano, G., Thornton, J.J., Mullin, J.M. (2008):** Absence of Na⁺/sugar cotransport activity in Barrett's metaplasia. *World J Gastroenterol* 14: 1365-1369.
- Mußler, K.:** Voltag/Current Clamp für 6 Messkammern. Einrichtung für Windows, Clamp Version 2.02. Aachen. <http://www.kmsci.de>
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. (1996):** Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 70: 113-128.

- Neu, J., Shenoy, V., Chakrabarti, R. (1996):** Glutamine nutrition and metabolism: where do we go from here ? *Faseb J* 10: 829-837.
- Neurath, M.F., Becker, C., Barbulescu, K. (1998):** Role of NF-kappaB in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut* 43: 856-860.
- Nusrat, A., Turner, J.R., Madara, J.L. (2000):** Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. IV. Regulation of tight junctions by extracellular stimuli: nutrients, cytokines, and immune cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279: G851-857.
- O'Neill, L.A.J. (2005):** Das immunologische Frühwarnsystem. *Spektrum der Wissenschaft Verlag GmbH* 68 - 75.
- Ohashi, Y., Umesaki, Y., Ushida, K. (2004):** Transition of the probiotic bacteria, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract of a pig. *Int J Food Microbiol* 96: 61-6.
- Ospelt, C., Gay, S. (2009):** TLRs and chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002):** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 279-289.
- Pacha, J. (2000):** Development of intestinal transport function in mammals. *Physiol Rev* 80: 1633-1667.
- Panayotova-Heiermann, M., Loo, D.D., Wright, E.M. (1995):** Kinetics of steady-state currents and charge movements associated with the rat Na⁺/glucose cotransporter. *J Biol Chem* 270: 27099-27105.
- Parente, E., Ricciardi, A. (1999):** Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 628-638.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Pesce de Ruiz Holgado, A. (1991):** Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*: influence of dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *J Dairy Res* 58: 485-496.
- Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G., Gobbato, N. (1995):** Immune system stimulation by probiotics. *J Dairy Sci* 78: 1597-1606.
- Perdigon, G., de Macias, M.E., Alvarez, S., Oliver, G., de Ruiz Holgado, A.A. (1986):** Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. *Infect Immun* 53: 404-410.
- Pineiro, M., Stanton, C. (2007):** Probiotic bacteria: legislative framework-- requirements to evidence basis. *J Nutr* 137: 850S-853S.
- Pollmann, M. (2005):** Einfluss eines probiotischen *Enterococcus faecium* auf die natürliche Infektionsrate von Chlamydien beim Schwein. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.
- Powell, D.W. (1981):** Barrier Function Of Epithelia. *Am J Physiol* 241: G275-G288.
- Pschyrembel (1998):** Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. de Gruyter, Berlin.
- Puchal, A.A., Buddington, R.K. (1992):** Postnatal development of monosaccharide transport in pig intestine. *Am J Physiol* 262: G895-902.
- Pultz, N.J., Vesterlund, S., Ouwehand, A.C., Donskey, C.J. (2006):** Adhesion of vancomycin-resistant enterococcus to human intestinal mucus. *Curr Microbiol* 52: 221-224.
- Raibaud, P. (1992):** *Bacterial Interactions In The Gut*. In: Fuller, R. (ed.), *Probiotics - The Scientific Basis*. Chapman & Hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, London, p. 9-28.

- Reiter, K. (2005):** Einfluss des Probiotikums *Enterococcus faecium* SF 68 (NCIMB 10415) auf die Morphologie der Darmschleimhaut des Schweines. Dissertation, Berlin, Freie Universität Berlin.
- Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P., Ricciardi-Castagnoli, P. (2001):** Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2: 361-367.
- Resta-Lenert, S., Barrett, K.E. (2003):** Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut* 52: 988-997.
- Rinkinen, M., Mättö, J., Salminen, S., Westermarck, E., Ouwehand, A.C. (2000):** In vitro adhesion of lactic acid bacteria to canine small intestinal mucus. *J Anim Physiol a Anim Nutr* 84: 43 - 47.
- Rowland, I.R. (1992):** *Metabolic Interactions in the Gut*. In: Fuller, R. (ed.), *Probiotics - A Scientific Basis*. Chapman & Hall, London, London, p. 29 - 53.
- Ruckstuhl, A. (2006):** *Nichtlineare Regression*.
- Sakata, T., Kojima, T., Fujieda, M., Takahashi, M., Michibata, T. (2003):** Influences of probiotic bacteria on organic acid production by pig caecal bacteria in vitro. *Proc Nutr Soc* 62: 73-80.
- Sato, K., Saito, H., Tomioka, H., Yokokura, T. (1988):** Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: efficacy of cell wall preparation of *Lactobacillus casei*. *Microbiol Immunol* 32: 1189-1200.
- Scharek-Tedin, L. (2009):** Influence of an *Enterococcus faecium* probiotic on the development of Peyer's patches B cells in piglets. *Arch Anim Nutr* 63: 343-355.
- Scharek, L., Guth, J., Filter, M., Schmidt, M.F. (2007):** Impact of the probiotic bacteria *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 (SF68) and *Bacillus cereus* var. *toyoi* NCIMB 40112 on the development of serum IgG and faecal IgA of sows and their piglets. *Arch Anim Nutr* 61: 223-234.
- Scharek, L., Guth, J., Reiter, K., Weyrauch, K.D., Taras, D., Schwerk, P., Schierack, P., Schmidt, M.F., Wieler, L.H., Tedin, K. (2005):** Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet Immunol Immunopathol* 105: 151-161.
- Scharrer, E., Wolfram, S. (2000):** *Funktionen des Dünndarmes und seiner Anhangsdrüsen*. In: Engelhardt, W.v., Breves, G. (eds.), *Physiologie der Haustiere*. Enke im Hippocrates Verlag GmbH, Stuttgart, p. 369-394.
- Scheffler, A. (1984):** Charakterisierung des Wirkung von Pharmaka auf die elektrophysiologischen Parameter gastrointestinaler Epithelgewebe mit einer mikrocomputer-gesteuerten Strom- und Spannungsklemmeinrichtung. Dissertation, Aachen, Medizinische Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen.
- Schierack, P., Walk, N., Reiter, K., Weyrauch, K.D., Wieler, L.H. (2007):** Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs. *Microbiology* 153: 3830-3837.
- Schliesser, T. (1990):** *Immunologie*. In: Stünzi, H.u.W., Eugen (ed.), *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg, p. 397.
- Schroeder, B., Duncker, S., Barth, S., Bauerfeind, R., Gruber, A.D., Deppenmeier, S., Breves, G. (2006):** Preventive effects of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute secretory diarrhea in a pig model of intestinal infection. *Dig Dis Sci* 51: 724-731.

- Schroeder, B., Winckler, C., Failing, K., Breves, G. (2004):** Studies on the time course of the effects of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* on electrolyte transport in pig jejunum. *Dig Dis Sci* 49: 1311-1317.
- Shanahan, F. (1994):** *The Intestinal Immune System*. In: Johnson, L.R. (ed.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York, p. 643 - 684.
- Sharbati, J. (2010):** Mukosale Genexpression während der porcinen postnatalen Darmentwicklung und Einfluss einer Probiotikagabe. Berlin, Freie Universität Berlin.
- Shen, W.H., Liechty, E.A. (2003):** *Digestion and Absorption*. In: Xu, R.-J., Cranwell, P. (eds.), *The Neonatal Pig - Gastroenterology Physiology and Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom, Nottingham, p. 157-184.
- Shen, Y.H., Nahas, R. (2009):** Complementary and alternative medicine for treatment of irritable bowel syndrome. *Can Fam Physician* 55: 143-148.
- Siggers, R.H., Siggers, J., Boye, M., Thymann, T., Molbak, L., Leser, T., Jensen, B.B., Sangild, P.T. (2008):** Early administration of probiotics alters bacterial colonization and limits diet-induced gut dysfunction and severity of necrotizing enterocolitis in preterm pigs. *J Nutr* 138: 1437-1444.
- Simon, O. (2012):** An interdisciplinary study on the mode of action of probiotics in pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences* 19: 230-243.
- Simon, O., Vahjen, W., Scharek, L.** Micro-Organisms as Feed Additives - Probiotics. 2003, 1 - 20.
- Solis-Pereyra, B., Aattouri, N., Lemonnier, D. (1997):** Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 66: 521S-525S.
- Spreeuwenberg, M.A., Verdonk, J.M., Gaskins, H.R., Verstegen, M.W. (2001):** Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J Nutr* 131: 1520-1527.
- Spulber, S., Schultzberg, M. (2009):** Connection between inflammatory processes and transmitter function-Modulatory effects of interleukin-1. *Prog Neurobiol*.
- Stavric, S., Kornegay, E.T. (1995):** *Microbial Probiotics For Pigs And Poultry*. In: Wallace, R.J., Chesson, A. (eds.), *Biotechnology In Animal Feeds And Animal Feeding*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Germany), p. 205 - 231.
- Stokes, C.R., Bailey, M., Haverson, K. (2001):** *Development and Function of the Pig Gastrointestinal Immune System*. In: Lindberg, J.E., Ogle, B. (eds.), *Digestive Physiology of Pigs - Proceedings of the 8th International Symposium*. CAB International, Oxon, p. 59 - 66.
- Taras, D., Vahjen, W., Macha, M., Simon, O. (2006):** Performance, diarrhea incidence, and occurrence of *Escherichia coli* virulence genes during long-term administration of a probiotic *Enterococcus faecium* strain to sows and piglets. *J Anim Sci* 84: 608-617.
- Taras, D., Vahjen, W., Macha, M., Simon, O. (2005):** Response of performance characteristics and fecal consistency to long-lasting dietary supplementation with the probiotic strain *Bacillus cereus* var. *toyoi* to sows and piglets. *Arch Anim Nutr* 59: 405-417.
- Taylor, D.J., Faragher, E.B., Evanson, J.M. (1992):** Inflammatory cytokines stimulate glucose uptake and glycolysis but reduce glucose oxidation in human dermal fibroblasts in vitro. *Circ Shock* 37: 105-110.
- Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen, S. (2001):** Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am J Clin Nutr* 73: 393S-398S.
- Ukena, S.N., Singh, A., Dringenberg, U., Engelhardt, R., Seidler, U., Hansen, W., Bleich, A., Bruder, D., Franzke, A., Rogler, G., Suerbaum, S., Buer, J., Gunzer, F.,**

- Westendorf, A. M. (2007):** Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS One* 2: e1308.
- Unmack, M.A., Rangachari, P.K., Skadhauge, E. (2001):** Effects of isoprostanes and prostanoids on porcine small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 434-441.
- Ussing, H.H., Zerahn, K. (1951):** Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23: 110-127.
- Vahjen, W., Taras, D., Simon, O. (2007):** Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* NCIMB10415 on cell numbers of total *Enterococcus* spp., *E. faecium* and *E. faecalis* in the intestine of piglets. *Curr Issues Intest Microbiol* 8: 1-7.
- van der Merwe, P.A., Barclay, A.N., Mason, D.W., Davies, E.A., Morgan, B.P., Tone, M., Krishnam, A.K., Ianelli, C., Davis, S.J. (1994):** Human cell-adhesion molecule CD2 binds CD58 (LFA-3) with a very low affinity and an extremely fast dissociation rate but does not bind CD48 or CD59. *Biochemistry* 33: 10149-10160.
- Vanderhoof, J.A., Whitney, D.B., Antonson, D.L., Hanner, T.L., Lupo, J.V., Young, R.J. (1999):** *Lactobacillus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. *J Pediatr* 135: 564-568.
- Vega, C., Pellerin, L., Dantzer, R., Magistretti, P.J. (2002):** Long-term modulation of glucose utilization by IL-1 alpha and TNF-alpha in astrocytes: Na⁺ pump activity as a potential target via distinct signaling mechanisms. *Glia* 39: 10-18.
- Vega, Y.M., Puchal, A.A., Buddington, R.K. (1992):** Intestinal amino acid and monosaccharide transport in suckling pigs fed milk replacers with different sources of carbohydrate. *J Nutr* 122: 2430-2439.
- Verordnung (EG) Nr. 1831/2003** des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2003 über Zusatzstoffe zur Verwendung in der Tierernährung.
- Weiss, M. (2003):** Wirkung von *Enterococcus faecium* auf den Organismus neonataler Hundewelpen. Dissertation, LMU München: Tierärztliche Fakultät.
- Wenk, C. (2002):** Growth promoter alternatives after the ban of antibiotics. Institute of Animal Sciences, Nutrition Biology, ETH Zurich, Switzerland.
http://chicucthuyhcm.org.vn/Download/Antibiotics_2.pdf
- Wiesner, E., Ribbeck, R. (2000):** Lexikon der Veterinärmedizin. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart, Stuttgart, Germany.
- Willard, M.D., Simpson, R.B., Cohen, N.D., Clancy, J.S. (2000):** Effects of dietary fructooligosaccharide on selected bacterial populations in feces of dogs. *Am J Vet Res* 61: 820-825.
- Winckler, C., Schröder, B., Breves, G. (1998):** Effects of *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus cereus* var. *caron* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on epithelial transport functions in pig jejunum. *Gastroenterol (Suppl 1) Suppl.* 1: 30 - 37.
- Wood, I.S., Trayhurn, P. (2003):** Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr* 89: 3-9.
- Wright, E.M., Hirsch, J.R., Loo, D.D., Zampighi, G.A. (1997):** Regulation of Na⁺/glucose cotransporters. *J Exp Biol* 200: 287-293.
- Younoszai, M.K., Lynch, A. (1975):** In vivo D-glucose absorption in the developing rat small intestine. *Pediatr Res* 9: 130-133.
- Yu, L.C., Flynn, A.N., Turner, J.R., Buret, A.G. (2005):** SGLT-1-mediated glucose uptake protects intestinal epithelial cells against LPS-induced apoptosis and barrier defects: a novel cellular rescue mechanism? *Faseb J* 19: 1822-1835.

- Yu, N., Maciejewski-Lenoir, D., Bloom, F.E., Magistretti, P.J. (1995):** Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 alpha enhance glucose utilization by astrocytes: involvement of phospholipase A2. *Mol Pharmacol* 48: 550-558.
- Zareie, M., Johnson-Henry, K., Jury, J., Yang, P.C., Ngan, B.Y., McKay, D.M., Soderholm, J.D., Perdue, M.H., Sherman, P.M. (2006):** Probiotics prevent bacterial translocation and improve intestinal barrier function in rats following chronic psychological stress. *Gut* 55: 1553-1560.
- Zhang, H., Malo, C., Boyle, C.R., Buddington, R.K. (1998):** Diet influences development of the pig (*Sus scrofa*) intestine during the first 6 hours after birth. *J Nutr* 128: 1302-1310.
- Zhang, H., Malo, C., Buddington, R.K. (1997):** Suckling induces rapid intestinal growth and changes in brush border digestive functions of newborn pigs. *J Nutr* 127: 418-426.
- Zhang, Y.Q., Xu, R.-J. (2003):** *Anatomy And Histology Of The Gastrointestinal Tract*. In: Xu, R.-J., Cranwell, P. (eds.), *The Neonatal Pig - Gastrointestinal Physiology And Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, p. 1 - 30.

10. Publikationsverzeichnis

- Lodemann, U., Lorenz, B., Finnah, A., Huebener, K., Jansen, N., Dillenseger, A., Martens, H. (2007). The effects of probiotic preparations of *Enterococcus faecium* and *Bacillus cereus* var. *toyoi* on transport and barrier properties of pig jejunum epithelium. 21st Meeting of the European intestinal transport group Proceedings E.I.T.G.: 51
- Lodemann, U., Dillenseger, A., Martens, H. (2008). Effects of the probiotic *Enterococcus faecium* via defined application on epithelial transport properties in piglet small intestine (Effekt eines definiert applizierten Probiotikums (*Enterococcus faecium*) auf die epithelialen (Transport-) Eigenschaften im Dünndarm vom Schwein). Proc. Soc. Nutr. Physiol. 17:62
- Lodemann, U., Dillenseger, A., Aschenbach, J.R., Martens, H. (2013). Effects of age and controlled oral dosing of *Enterococcus faecium* on epithelial properties in the piglet small intestine. Beneficial Microbes, 2013 online

11. Danksagung

Danken möchte ich abschließend

Prof. Dr. H. Martens für die Überlassung des Themas,

Frau Dr. U. Lodemann für die Betreuung bei der Dissertation,

Frau Dr. G. Arndt für Ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung,

Frau K. Wolf, die mich tatkräftig fachlich und moralisch unterstützt hat sowie

Herrn U. Tietjen für die Hilfe bei den Versuchsdurchführungen.

12. Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Chemnitz, den 20.12.2012

Anja Dillenseger