

Aus dem Institut für Tierernährung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Einsatz von mittelkettigen  
Fettsäuren in der Fütterung von Absetzferkeln**

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

vorgelegt von  
Susanne Buchheit  
Tierärztin aus Gelsenkirchen

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3300

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Lahrmann  
Dritter Gutachter: PD Dr. Helmut Schafft

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

pigs, piglets, piglet feeding, weaning, feed additives, medium chain fatty acids,  
antibacterial properties, digestibility, flow cytometry

Tag der Promotion: 08.05.2009

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: 978-3-86664-631-5

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009**

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 2009

choriner str. 85 - 10119 berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

*Meinen Eltern und Kostja gewidmet*



## Inhalt

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literatur .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Absetzferkel .....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Probleme zur Zeit des Absetzens .....	3
2.1.2 Häufige gastrointestinale Erkrankungen zur Zeit des Absetzens.....	4
<b>2.2 Einsatz von antibiotischen Leistungsförderern .....</b>	<b>6</b>
<b>2.3 Mittelkettige Fettsäuren .....</b>	<b>8</b>
2.3.1 Chemische Struktur und Vorkommen .....	8
2.3.2 Absorption und Metabolisierung.....	9
2.3.3 Antibakterielle Effekte .....	9
2.3.4 Wirkung auf die Darmmorphologie und -physiologie .....	17
2.3.5 Wirkung auf Leistungsparameter .....	18
2.3.6 Möglichkeiten verschiedener Präparationen .....	19
<b>2.4 Immunologische Parameter beim Ferkel.....</b>	<b>21</b>
2.4.1 Angeborene und adaptive Immunabwehr .....	21
2.4.2 Differenzierungsantigene der Lymphozyten beim Schwein .....	23
2.4.3 Besonderheiten des porcinen Immunsystems .....	24
2.4.4 Immunsystem des Darms beim Schwein .....	25
2.4.5 Immunologische Prozesse beim Absetzen von Ferkeln .....	26
2.4.6 Einfluss der mittelkettigen Fettsäuren auf immunologische Parameter.....	27
<b>2.5 Fragestellung dieser Arbeit .....</b>	<b>29</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Versuchstiere .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Haltung.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Versuchsfutter und Fütterung .....</b>	<b>30</b>
<b>3.4 Versuchsdurchführung.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5 Sektionsgang und Probengewinnung .....</b>	<b>34</b>
<b>3.6 Futtermitteluntersuchung .....</b>	<b>35</b>
3.6.1 Rohnährstoffe (Weender-Analyse) .....	35
3.6.2 Mineralstoffe und Spurenelemente .....	35
3.6.3 Säurebindungskapazität.....	36
3.6.4 Fettsäuren .....	36
<b>3.7 Leistungsparameter .....</b>	<b>37</b>
3.7.1 Beurteilung des Gesundheitszustandes .....	37
3.7.2 Lebendmasseentwicklung und Lebendmassezunahme .....	37
3.7.3 Futteraufnahme und Futteraufwand .....	37
<b>3.8 pH-Wert, Trockensubstanz und scheinbare praecaecale Verdaulichkeit .....</b>	<b>38</b>
3.8.1 pH-Wert der Digesta .....	38
3.8.2 Trockensubstanzgehalt der Digesta.....	38
3.8.3 Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit.....	38
<b>3.9 Mikro- und molekularbiologische Parameter .....</b>	<b>39</b>
3.9.1 Quantitative Lebendkeimzahlbestimmung in der Digesta des distalen Jejunums und des Caecums.....	39
3.9.2 Bakterielle Metaboliten .....	40
3.9.3 Quantifizierung der Eubakterien, Laktobazillen und <i>Escherichia ssp.</i> der Magendigesta mittels der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion .....	42
<b>3.10 Gaschromatographische Analysen .....</b>	<b>46</b>
3.10.1 Prinzip der Gaschromatographie.....	46

3.10.2	Kurzkettige Fettsäuren in der Digesta .....	47
3.10.3	Mittelkettige und langkettige Fettsäuren in der Digesta .....	48
<b>3.11</b>	<b>Immunologische Parameter .....</b>	<b>49</b>
3.11.1	Differentialblutbild und hämatologische Untersuchungen .....	49
3.11.2	Durchflusszytometrische Analytik .....	49
3.11.3	Messung der mRNA der Zytokine MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und MCP1 im Ileumgewebe .....	60
<b>3.12</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Leistungsparameter .....</b>	<b>62</b>
4.1.1	Gesundheitsbeurteilung .....	62
4.1.2	Lebendmasse und Lebendmassezunahme .....	62
4.1.3	Futteraufnahme und Futteraufwand .....	63
<b>4.2</b>	<b>pH-Wert, Trockensubstanz und scheinbare praecaecale Verdaulichkeit .....</b>	<b>64</b>
4.2.1	pH-Wert der Digesta .....	64
4.2.2	Trockensubstanzgehalt der Digesta.....	65
4.2.3	Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Rohasche, des Rohproteins und der Mineralstoffe Kalzium und Phosphor .....	65
<b>4.3</b>	<b>Mikro- und molekularbiologische Parameter .....</b>	<b>66</b>
4.3.1	Quantitative Lebendkeimzahlbestimmung im distalen Jejunum und im Caecum ..	66
4.3.2	Bakterielle Metaboliten .....	68
4.3.3	Quantifizierung der Eubakterien, Laktobazillen und <i>Escherichia ssp.</i> in der Magendigesta mittels qPCR .....	71
<b>4.4</b>	<b>Gaschromatographische Analysen der mittel- und langkettigen Fettsäuren.....</b>	<b>72</b>
4.4.1	Capryl- und Caprinsäure in der Digesta.....	72
4.4.2	Langkettige Fettsäuren in der Digesta.....	74
<b>4.5</b>	<b>Immunologische Parameter .....</b>	<b>76</b>
4.5.1	Differentialblutbild und hämatologische Untersuchungen .....	76
4.5.2	Phänotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC).....	78
4.5.3	Phänotypisierung der mononukleären Zellen der Mesenteriallymphknoten.....	79
4.5.4	Lymphozytenproliferation.....	80
4.5.5	Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten des peripheren Bluts .....	81
4.5.6	Messung der mRNA-Expression der Zytokine MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und MCP1 im Ileumgewebe.....	83
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
<b>5.1</b>	<b>Hintergrund und Ziel der Arbeit.....</b>	<b>84</b>
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Versuchsbedingungen und des Studiendesigns .....</b>	<b>84</b>
<b>5.3</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>85</b>
5.3.1	Effekte der mittelkettigen Fettsäuren auf verdauungsphysiologische Faktoren .....	85
5.3.2	Antibakterielle Wirkung der mittelkettigen Fettsäuren und Effekte des Coatings ..	88
5.3.3	Effekte der mittelkettigen Fettsäuren auf immunologische Parameter .....	96
<b>5.4</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>104</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>105</b>	
<b>Summary .....</b>	<b>107</b>	
<b>Zitierte Literatur .....</b>	<b>109</b>	
<b>Anhang .....</b>	<b>127</b>	
<b>Danksagung.....</b>	<b>131</b>	
<b>Selbständigkeitserklärung.....</b>	<b>132</b>	

## Tabellen

<b>Tabelle 1:</b> Chemische Eigenschaften von Capryl- und Caprinsäure .....	8
<b>Tabelle 2</b> Zusammenstellung der Wirksamkeit von Capryl- und Caprinsäure auf ausgewählte grampositive Bakterien in verschiedenen <i>in vitro</i> -Versuchen .....	11
<b>Tabelle 3</b> Zusammenstellung der Wirksamkeit von Capryl- und Caprinsäure auf ausgewählte gramnegative Bakterien in verschiedenen <i>in vitro</i> -Versuchen .....	12
<b>Tabelle 4:</b> Zusammenstellung der Wirksamkeit von Capryl- und Caprinsäure auf Viren, <i>Candida albicans</i> und <i>Giardia lamblia</i> in verschiedenen <i>in vitro</i> -Versuchen .....	13
<b>Tabelle 5:</b> In dieser Arbeit eingesetzte Differenzierungsantigene.....	24
<b>Tabelle 6:</b> Futterzusammensetzung der drei Fütterungsgruppen.....	31
<b>Tabelle 7:</b> Roh Nährstoff-, Mineralstoff- und Spurenelementgehalte und Säurebindungskapazität der eingesetzten Futtermittel .....	32
<b>Tabelle 8:</b> Inhaltsstoffe der zugesetzten Produkte .....	32
<b>Tabelle 9:</b> Analysierter Gehalt (% der Gesamtfettsäuren) mittel- und langkettiger Fettsäuren der drei Futtermischungen.....	33
<b>Tabelle 10:</b> Capryl- und Caprinsäure-Konzentrationen (g/kg Futter (uS)) in den Futtermischungen der drei Fütterungsgruppen .....	33
<b>Tabelle 11:</b> Für die Futteruntersuchungen eingesetzte Geräte und Chemikalien.....	37
<b>Tabelle 12:</b> Für die Messung des pH-Werts, der Trockensubstanz und der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit genutzte Geräte und Chemikalien.....	39
<b>Tabelle 13:</b> Verwendete Selektivnährböden, Inkubationszeiten und untersuchte Verdünnungsstufen.....	40
<b>Tabelle 14:</b> Für die Bestimmung von Laktat und Ammonium genutzte Geräte und Chemikalien .....	41
<b>Tabelle 15:</b> Für die DNA-Aufbereitung genutzte Geräte und Chemikalien.....	43
<b>Tabelle 16:</b> Für die qPCR genutzte Primer.....	44
<b>Tabelle 17:</b> Reaktionskomponenten der qPCR-Ansätze .....	44
<b>Tabelle 18:</b> Reaktionsbedingungen und PCR-Parameter .....	45
<b>Tabelle 19:</b> Für die Durchführung der qPCR genutzte Geräte und Chemikalien.....	46
<b>Tabelle 20:</b> Für die gaschromatographischen Analysen genutzte Geräte und Chemikalien ..	47
<b>Tabelle 21:</b> Für die durchflusszytometrischen Analysen benötigte Geräte und Materialien ..	50
<b>Tabelle 22:</b> Verwendete primäre Antikörper.....	53
<b>Tabelle 23:</b> Verwendete sekundäre Antikörper .....	53
<b>Tabelle 24:</b> Für die Lymphozytenproliferation verwendete Antikörper .....	57
<b>Tabelle 25:</b> Primersequenzen zur Bestimmung der mRNA der Zytokine MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und MCP1 .....	61
<b>Tabelle 26:</b> Mittlere Lebendmasse (kg) der Ferkel der drei Fütterungsgruppen während der 25tägigen Fütterungszeit .....	63
<b>Tabelle 27:</b> Mittlere wöchentliche Lebendmassezunahme (kg) der Ferkel der drei Fütterungsgruppen.....	63
<b>Tabelle 28:</b> Rechnerisch ermittelte mittlere tägliche Einzeltierfutteraufnahme (g) der drei Fütterungsgruppen für die einzelnen Wochen und für die gesamte Fütterungsphase.....	64
<b>Tabelle 29:</b> Futteraufwand der Fütterungsgruppen in den einzelnen Versuchswochen und im Gesamtversuchszeitraum.....	64
<b>Tabelle 30:</b> pH-Wert der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts.....	65
<b>Tabelle 31:</b> Trockensubstanzgehalt (% der ursprünglichen Substanz) der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts .....	65
<b>Tabelle 32:</b> Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Rohasche, des Rohproteins, des Kalziums und des Phosphors (% der Digesta (TS)) im distalen Jejunum (D3) .....	66

<b>Tabelle 33:</b> Lebendkeimzahl der coliformen Bakterien ( $\log_{10}$ koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des Caecums, angezüchtet auf MacConkey-Agar .....	66
<b>Tabelle 34:</b> Aerobe Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$ koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des distalen Jejunumdrittels, angezüchtet auf Plate-Count-Agar .....	67
<b>Tabelle 35:</b> Aerobe Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$ koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des Caecums, angezüchtet auf Plate-Count-Agar.....	67
<b>Tabelle 36:</b> Anaerobe Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$ koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des distalen Jejunumdrittels, angezüchtet auf Columbia-Blutagar .....	67
<b>Tabelle 37:</b> Anaerobe Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$ koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des Caecums, angezüchtet auf Columbia-Blutagar.....	67
<b>Tabelle 38:</b> Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren (mmol/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts .....	68
<b>Tabelle 39:</b> Prozentualer Anteil der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren in Bezug auf die Gesamtmenge in der Digesta (uS) der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts.....	69
<b>Tabelle 40:</b> Anteil des D- und L-Laktats (mmol/kg Digesta (uS)) der Digesta-Proben der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts .....	70
<b>Tabelle 41:</b> Langkettige Fettsäuren (g/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts .....	75
<b>Tabelle 42:</b> Differentialblutbild und hämatologische Untersuchung .....	77
<b>Tabelle 43:</b> Relativer Anteil der CD4- und CD8-positiven-Lymphozyten (%) des peripheren Bluts der Ferkel am Tötungstag .....	78
<b>Tabelle 44:</b> Relativer Anteil der CD21- und MHC II-positiven Zellpopulationen (%) des peripheren Bluts der Ferkel am Tötungstag .....	78
<b>Tabelle 45:</b> Relativer Anteil der CD4- und CD8-Lymphozyten (%) der Mesenteriallymphknoten der Ferkel am Tötungstag.....	79
<b>Tabelle 46:</b> Relativer Anteil der CD21- und MHC II-positiven Zellpopulationen (%) der Mesenteriallymphknoten der Ferkel am Tötungstag.....	79
<b>Tabelle 47:</b> Verhältnis des Anteils der proliferierten Zellen nach Stimulation mit Con A bzw. LPS zu den proliferierten Zellen ohne Stimulierung (SI) .....	80
<b>Tabelle 48:</b> Bewertungsschema des Gesundheitszustands .....	127

## Abbildungen

<b>Abbildung 1:</b> Einflüsse auf Ferkel und ihre möglichen Reaktionen nach dem Absetzen.....	4
<b>Abbildung 2:</b> Netzwerk der Resistenzen: Ökologische Beziehungen zwischen antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen: selektiver Druck, Hauptreservoirs und Übertragungswege, nach Witte (1998).....	7
<b>Abbildung 3:</b> Strukturformel der Caprylsäure (C8:0) (a) und der Caprinsäure (C10:0) (b).....	8
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der postulierten Wirkungsmechanismen der mittelkettigen Fettsäuren .....	17
<b>Abbildung 5:</b> Allgemeine schematische Darstellung der Aktivierung von T-Lymphozyten .	22
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der immunologischen Strukturen der Darmwand ..	26
<b>Abbildung 7:</b> Versuchs- und Fütterungsdesign des vorliegenden Versuchs.....	31
<b>Abbildung 8:</b> Einteilung der Darmabschnitte zur Probenentnahme .....	34
<b>Abbildung 9:</b> Darstellungsformen, der in dieser Arbeit genutzten FACS-Datenauswertung .	50
<b>Abbildung 10:</b> Phasentrennung nach der Gradientenzentrifugation mit Ficoll .....	51
<b>Abbildung 11:</b> Zweiparameterdarstellung der gewonnenen weißen Blutzellen im Density Plot am Beispiel von CD4- und CD8-markierten T-Lymphozyten und NK-Zellen .....	54
<b>Abbildung 12:</b> Zweiparameterdarstellung im Density Plot nach Festlegung einer Region um die Lymphozyten am Beispiel von CD4- und CD8-markierten T-Lymphozyten und NK-Zellen.....	55
<b>Abbildung 13:</b> Verlaufsschema des Lymphozytenproliferationstests.....	56
<b>Abbildung 14:</b> Zweiparameterdarstellung im Density Plot der mit Con A-stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen .....	58
<b>Abbildung 15:</b> Zweiparameterdarstellung im Density Plot (a) und im Histogramm (b, c) zur Beurteilung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten .....	60
<b>Abbildung 16:</b> Lebendkeimzahl der coliformen Bakterien als $\log_{10}$ koloniebildende Einheiten in 1 g Digesta (uS) des hinteren Jejunums (D3), angezüchtet auf MacConkey-Agar .....	66
<b>Abbildung 17:</b> Ammoniumgehalt (mmol/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts .....	71
<b>Abbildung 18:</b> Eubakterien, Laktobazillen und <i>Escherichia ssp.</i> ( $\log_{10}$ /g Digesta (uS)) in der Digesta des Magens, gemessen mittels qPCR.....	72
<b>Abbildung 19:</b> Caprylsäure (C8:0) (g/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts .....	73
<b>Abbildung 20:</b> Caprinsäure (C10:0) (g/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts .....	73
<b>Abbildung 21:</b> Con A-Stimulationsindex der Blutlymphozyten am letzten Versuchstag der beiden Versuchsreihen .....	81
<b>Abbildung 22:</b> LPS-Stimulationsindex der Blutlymphozyten am letzten Versuchstag der beiden Versuchsreihen .....	81
<b>Abbildung 23:</b> Prozentualer Anteil der phagozytierenden Granulozyten (a) und Monozyten (b) im Blut am letzten Versuchstag.....	82
<b>Abbildung 24:</b> Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten (a) und Monozyten (b) im Blut am letzten Versuchstag.....	82
<b>Abbildung 25:</b> Änderung der mRNA-Konzentration von MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und MCP1 im Ileumgewebe der Versuchsgruppen relativ zur Kontrollgruppe.....	83

## Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektrometrie	MHK	Minimale Hemmkonzentration
APZ	antigenpräsentierende Zellen	MIP	engl. macrophage inflammatory protein
ATP	Adenosintriphosphat	mkFs	mittelkettige Fettsäuren
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung	mkTg	mittelkettige Triglyceride
bp	Basenpaare	ml	Milliliter
BrdU	Bromdesoxyuridin	mRNA	engl. messenger ribonucleic acid
bzw.	beziehungsweise	mV	Millivolt
CD	Cluster of differentiation	NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
CoA	Coenzym A	NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
Con A	Concanavalin A	Nm	Nanometer
C <sub>T</sub> -Wert	engl. cycle threshold	PBMC	engl. peripheral blood mononuclear cells
D1	proximales Jejunum	PBS	engl. phosphate buffered saline
D2	mittleres Jejunum	PE	Phycoerythrin
D3	distales Jejunum	pH	negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der H <sup>+</sup> -Aktivität
DNA	engl. deoxyribonucleic acid	PIA	porcine intestinale Adenomatosis
dsDNA	engl. double stranded deoxyribonucleic acid	pKs	negativer dekadischer Logarithmus des Zahlenwerts der Säurekonstanten (Ks)
EDTA	engl. ethylenediaminetetraacetic acid	PP	Peyersche Platten
EDV	Epizootische Virusdiarrhoe	Ppm	engl. parts per million
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting	qPCR	engl. quantitative polymerase chain reaction
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat	REST	engl. relative expression software tool
FSC	engl. forward scatter	SI	Stimulationsindex
g	Gramm	SSC	engl. sideward scatter
GC	Gaschromatographie	TCR	engl. T cell receptor
GTC	Guanidinthiocyanat	TGE	transmissible Gastroenteritis
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt	TGF	engl. transforming growth factor
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten	TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
Ig	Immunglobulin	TNE	Tris-NaCl-EDTA
IL	Interleukin	TNF	Tumornekrosefaktor
IFN	Interferon	TS	Trockensubstanz
iPP	ileale Peyersche Platten	uS	ursprüngliche Substanz
jPP	jejunale Peyersche Platten	v.a.	vor allem
KbE	Koloniebildende Einheiten	Xg	Erdbeschleunigung
kg	Kilogramm		
kkFs	kurzkettige Fettsäuren		
mEq	Milliequivalente		
MHC	engl. major histocompatibility complex		

## 1. Einleitung

Die Zeit nach dem Absetzen stellt für Ferkel eine kritische Phase dar. Bedingt durch die Trennung von der Mutter, Transporte und die Auseinandersetzung mit einer neuen räumlichen, sozialen und mikrobiellen Umwelt sind Ferkel zahlreichen Stressfaktoren ausgesetzt. Darüber hinaus kommt es mitunter zu einem abrupten Wechsel von Muttermilch zu Ferkelaufzuchtfutter auf Getreide- und Leguminosenbasis. Als Folge dieser Umstellungen wird oft eine reduzierte Futteraufnahme in der ersten Absetzwoche beobachtet, die sich in zahlreichen Veränderungen der Darmmorphologie, immunologischen Reaktionen und der Zusammensetzung der Darmflora niederschlägt (Stokes et al., 1994; Pluske et al., 1997; McCracken et al., 1999). Die fehlenden Immunglobuline der Muttermilch, das in diesem Alter noch nicht vollständig ausgereifte Immunsystem der Ferkel und die Auseinandersetzung mit neuen Umgebungskeimen stellen ein hohes Risiko für gastrointestinale Erkrankungen dar, die mit großen Ferkelverlusten einhergehen können (Lallès et al., 2007).

Durch die EG-Verordnung 1831/2003 besteht seit Anfang 2006 ein Einsatzverbot für antibiotische Leistungsförderer, die vormals den Problemen der Ferkelverluste aufgrund von Durchfallerkrankungen vorbeugten und zusätzlich eine Verbesserung der Leistungsparameter bewirken sollten (Thomke und Elwinger, 1998). Durch das Verbot der antibiotischen Leistungsförderer stellt sich die Frage, mit welchen anderen Maßnahmen die Probleme der Absetzphase abgemildert werden können.

Eine Vielzahl von Substanzen wurde in diesem Zusammenhang untersucht, wie z.B. Enzyme, Probiotika, Prebiotika, fermentiertes Flüssigfutter, Blutplasmae, Zinkoxid, Kräuter und Pflanzenextrakte, antimikrobielle Peptide und lytische Phagen (Decuypere und Dierick, 2003). In dem Einsatz von mittelkettigen Fettsäuren (mkFs) wird eine weitere Möglichkeit gesehen, den Problemen der Absetzphase zu begegnen. Dabei handelt es sich um gesättigte Fettsäuren mit 6 bis 12 Kohlenstoffatomen, die einen antibakteriellen Effekt aufweisen, welcher in vielen *in vitro*-Untersuchungen nachgewiesen wurde (Canas-Rodriguez und Smith, 1966; Kabara et al., 1972; Hsiao und Siebert, 1999; Sprong et al., 2001). Die Wirkungsweise selbst ist nicht vollständig geklärt. Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, wobei sowohl eine durch die Einlagerung der mkFs hervorgerufene Lysis der bakteriellen Zellwand und Zellmembran als auch eine Ansäuerung des bakteriellen Zytosols durch die Dissoziation der eingedrungenen mkFs als die wahrscheinlichsten gelten. Eindeutig belegt ist, dass die antibakterielle Wirkung nur durch die freien mkFs und ihre Monoglyceride hervorgerufen wird und nicht durch die Triglyceridform (Isaacs et al., 1995). Zusätzlich wiesen die mkFs in einigen *in vivo*-Untersuchungen beim Ferkel eine darmprotektive Wirkung auf, die sich in einer Verminderung der Villusatrophie und Kryptenzellhyperplasie äußerte (Dierick et al., 2002b). Auch immunologische Effekte durch mkFs werden unterstellt (Kono et al., 2004), die jedoch bisher beim Ferkel nicht untersucht wurden.

Eine Besonderheit der mkFs liegt in deren raschen Absorption. Sie werden, anders als langkettigen Fettsäuren, schon im Magen und proximalen Jejunum absorbiert und ohne Chylomikronenbildung über das Portalvenenblut in die Leber transportiert, wo sie weiter metabolisiert werden (Marten et al., 2006). Somit ist nur eine relativ kurze Verweilzeit im Lumen des GI-Trakts gegeben, in der die mkFs ihre antibakterielle Wirkung entfalten können.

Dies und die Tatsache, dass mkFs in ihrer freien Form einen sehr starken ziegenartigen Geruch und Geschmack haben, erschwert den Einsatz in der Ferkelfütterung. Letzterem Problem wurde in Untersuchungen auf unterschiedliche Weise begegnet, wie z.B. durch Einsatz in Form von Triglyceriden unter Zusatz einer exogen zugeführten Lipase, in verseiften Form oder durch aromatische Zusätze. Eine längere Verweilzeit im GI-Trakt konnte durch diese Präparationen nicht erreicht werden.

Ziel der Arbeit war es, die mkFs Capryl- und Caprinsäure in Kombination mit einem Aromastoff auf mögliche antibakterielle und immunologische Effekte in einem Fütterungsversuch unter besonderer Berücksichtigung verdauungsphysiologischer Aspekte zu prüfen. Ergänzend sollte untersucht werden, inwieweit ein Coating die Absorption der eingesetzten mkFs verändert und ob dies eine Beeinflussung der untersuchten Parameter bewirkt.

## 2. Literatur

### 2.1 Absetzferkel

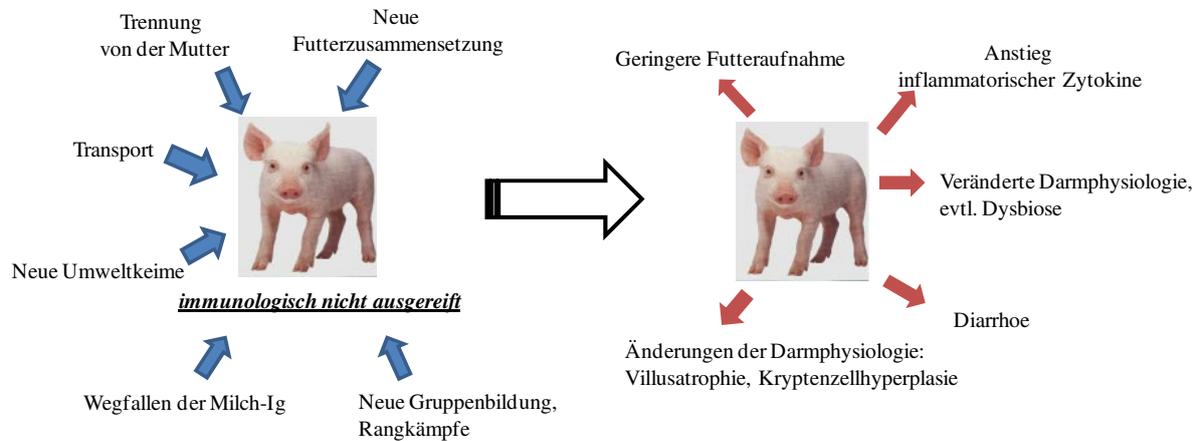
#### 2.1.1 Probleme zur Zeit des Absetzens

Nach der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung (vom 22. August 2006, Abschnitt 4, §22(1)) dürfen Saugferkel erst im Alter von über vier Wochen abgesetzt werden. Es besteht ferner die Möglichkeit, Saugferkel im Alter über drei Wochen abzusetzen, wenn das unverzügliche Verbringen der Ferkel in gereinigte und desinfizierte Ställe, in denen keine Sauen gehalten werden, gegeben ist. Im Hinblick auf diese Vorgaben ist in der Schweineproduktion das Absetzen mit 21 bis 35 Tagen üblich. Die Zeit nach dem Absetzen ist von einem merklichen Rückgang der Futtermittelaufnahme, geringem Wachstum und einem erhöhten Risiko für gastrointestinale Erkrankungen vor allem durch *Escherichia coli* und *Salmonella ssp.* geprägt (Pluske et al., 1997), die zu großen ökonomischen Ausfällen führen können (Lallès et al., 2007). Erklären lässt sich dieser Umstand durch die zahlreichen Veränderungen, denen das Ferkel zur Absetzzeit ausgesetzt ist. Es wird von der Mutter getrennt und zum Teil über weite Strecken in Aufzuchtbetriebe transportiert. Das Zusammenführen von Ferkeln verschiedener Würfe in einer neuen Umgebung wird von Rangkämpfen und Bildung neuer Sozialstrukturen begleitet, sodass die Ferkel erheblichem Stress ausgesetzt sind (Le Dividich und Sève, 2000). Außerdem wird in dieser Phase die Fütterung von hochverdaulicher, flüssiger Milch zu weniger verdaulichem, komplexerem Festfutter umgestellt (Pluske et al., 1997), was sich in einer verringerten Wasser- und Futtermittelaufnahme in den ersten Tagen nach dem Absetzen äußert. Zwar nehmen 50 % der Tiere ihre erste Mahlzeit in den ersten 24 Stunden zu sich, jedoch zeigen 10 % der Tiere bis zu 48 Stunden keine Futtermittelaufnahme (Brooks et al., 2001). Es kann 8 bis 14 Tage dauern, bis Ferkel das Niveau der Energieaufnahme, das sie vor dem Absetzen hatten, wieder erreicht haben (Le Dividich und Sève, 2000). Die Anorexie und damit einhergehende Unterernährung der Ferkel in den ersten Tagen nach dem Absetzen bedingt häufig eine Wachstumsreduktion und Diarrhoe (Lallès et al., 2007). Gekennzeichnet ist diese Phase durch deutliche Veränderungen in der Darmphysiologie und -immunologie sowie in der Zusammensetzung der Darmflora. Ferkel weisen nach dem Absetzen häufig eine veränderte Dünndarmarchitektur auf, die durch Villusatrophie, Kryptenzellhyperplasie und eine geringere Aktivität der im Bürstensaum hergestellten Verdauungsenzyme gekennzeichnet ist. Daraus resultiert eine Abnahme der digestiven und absorptiven Kapazität des Darms (Stokes et al., 1994; Pluske et al., 1997).

Außerdem gehen diese Darmveränderungen funktionell mit einer gesteigerten Mukosapermeabilität, einer gestörten absorptiv-sekretorischen Elektrolytbalance und einer Veränderung der Zytokinmuster einher (Pie et al., 2004; Lallès et al., 2007). Aufgrund der in diesem Alter vorliegenden immunologischen Situation, die durch den Wegfall der über die Milch zugeführten Antikörper und ein noch im Aufbau befindliches Immunsystem gekennzeichnet ist, besteht eine starke Anfälligkeit für Infektionen (Lallès et al., 2007). Das Risiko einer gastrointestinalen Erkrankung wird zusätzlich durch die Kolonisation des Darms mit neuen Bakterienarten beeinflusst, die durch den Futterwechsel und den fremden

Lebensraum bedingt ist. Dies kann zu einem Ungleichgewicht zwischen der gesunden kommensalen Darmflora und pathogenen Keimen führen (Lallès et al., 2007).

Die Einflüsse, die auf Ferkel in der Absetzphase wirken, und die daraus resultierenden Problematiken sind schematisch in Abbildung 1 zusammengefasst.



**Abbildung 1:** Einflüsse auf Ferkel und ihre möglichen Reaktionen nach dem Absetzen

### 2.1.2 Häufige gastrointestinale Erkrankungen zur Zeit des Absetzens

Die häufigsten gastrointestinalen Erkrankungen zur Zeit des Absetzens ähneln sich im klinischen Erscheinungsbild, da sie alle mit Durchfällen und daraus resultierenden Flüssigkeits- und Elektrolytverlusten einhergehen. Bei dem Pathomechanismus der Diarrhoe handelt es sich allgemein um Störungen im Wasserhaushalt des Darmes (Waldmann und Wendt, 2004). Diese können entweder durch eine mangelnde Resorption von Wasser aufgrund atrophischer Darmzotten nach Virusinfektionen auftreten (Transmissible Gastroenteritis (TGE) und Epizootische Virusdiarrhoe (EDV), beide durch Coronaviren hervorgerufen) oder durch eine gesteigerte Sekretion (Hypersekretion) von Flüssigkeiten in das Darmlumen hervorgerufen werden, wie sie bei der durch *E.coli* hervorgerufenen Diarrhoe zu finden ist. Der durch Virusinfektionen verursachte Darmzottenschwund führt zusätzlich zu einer mangelnden Nährstoffaufnahme, sodass es durch eine negative Energiebilanz schnell zu Hypoglykämie und Azidose kommt. Durch gesteigerte Sekretion verursachte Durchfälle bedingen lediglich milde Energiedefizite, da durch die intakten Darmzotten eine Resorption von Nährstoffen weiterhin möglich ist.

Die durch *Escherichia coli* hervorgerufene Diarrhoe als Prototyp der sekretorischen Diarrhoe wird durch enterotoxische *E. coli*-Stämme (ETEC) ausgelöst und häufig zur Absetzzeit beobachtet. Durch abrupte Futterwechsel und Fehler in der Futterzusammensetzung wird die Vermehrung der *E. coli* beim Absetzferkel begünstigt. Zudem unterbleibt in dieser Zeit einerseits die Antikörpersversorgung durch die Milch, andererseits besteht noch keine aktive Immunität gegen *E. coli* (Heinritzi et al., 2006). Durch Adhäsion in Mikrokolonien und starker Vermehrung von *E. coli* auf der Dünndarmschleimhaut kommt es infolge der Toxinbildung zu geringerer Darmmotilität, sodass die Bakterien nicht weitergeschwemmt werden (Bertschinger et al., 1990). Im Dünndarm lösen sie eine Hypersekretion durch die Bindung der Enterotoxine an die Enterozyten aus, die mit einer verstärkten

sekretionsstimulierenden Bildung von zyklischem ATP einhergeht (Waldmann und Wendt, 2004). Durch bestimmte Fütterungsmaßnahmen kann prophylaktisch versucht werden, dieser Diarrhoeform entgegenzuwirken. Maldigestionen können durch einen Futterentzug und gleichzeitigem reichlichen Wasserangebot zum Zeitpunkt des Absetzens vermindert werden. Mit einer anschließenden restriktiven und qualitativ hochwertigen Fütterung, die einen Rohfasergehalt über 6 % und eine möglichst geringe Säurebindungskapazität (<700 mEq/kg) haben sollte, kann eine übermäßige Vermehrung und Anhaftung von *E. coli* verhindert werden (Heinritzi et al., 2006).

Bei einer Infektion mit den sogenannten Shiga-like-Toxin-bildenden *E. coli* (enterotoxämische *E. coli*, ETEEC) kommt es zum Krankheitsbild der Ödemkrankheit. Das von ihnen sezernierte Shiga-like-toxin wirkt als Neuro- und Vasotoxin. So zeigen sich klinisch einerseits zentralnervöse Störungen wie Kopfschiefhaltung, Krämpfe, Übererregbarkeit, Lähmungen und Festliegen und andererseits vasale Störungen, die durch Ödeme am Nasenrücken, an den Augenlidern, der Magen- und Dickdarmwand und der Lunge gekennzeichnet sind. Bei diesem Krankheitsbild wird nur selten Durchfall beobachtet (Moxley, 2000).

Auch bei der Salmonelleninfektion handelt es sich eher um eine systemische Infektionserkrankung, die bei septikämischem Verlauf (Salmonellose, hervorgerufen durch *Salmonella cholerae suis* oder *Salmonella typhisuis*) zu plötzlichen Todesfällen führt. Symptomatisch hierfür sind blaurote Verfärbungen der Ohrmuscheln, des Unterbauchs, der Rüsselscheibe und der Gliedmaßen. In weniger schwerwiegenden Fällen, die meist durch *Salmonella typhimurium* bedingt sind, geht die Salmonelleninfektion mit Fieber, wässrig-gelbgrauen, sekretorischen Durchfällen, die durch Nekrosen und Ulzera im Dickdarmbereich ausgelöst werden, und selten auch mit Pneumonien einher (Waldmann und Wendt, 2004).

Weitere Erkrankungen, die Diarrhoe beim Absetzferkel auslösen können, sind die Porcine intestinale Adenomatose (PIA) und die Dysenterie.

Die PIA, die sowohl bei Absetzferkeln als auch bei Läufern auftritt, wird durch den Erreger *Lawsonia intracellularis* verursacht. Der Erreger führt zu einer vorübergehenden Proliferation unreifer Epithelzellen des Ileums. Durch die weitere Infektion mit Sekundärerregern kann sich eine nekrotisierende Enteritis entwickeln, die sich klinisch zum Teil in blutigen Durchfällen, Kümern und plötzlichen Todesfällen äußert (Heinritzi et al., 2006).

Die Schweinedysenterie wird durch den Erreger *Brachyspira hyodysenteriae* hervorgerufen. Häufig werden die Ferkel über die Sau mit dem Keim infiziert, jedoch wird die Erkrankung meist erst infolge einer Belastungssituation, z.B. Absetzstress, klinisch manifest und kann somit bei allen Altersklassen vorkommen. Nach Anlagerung und Vermehrung in den Krypten der Dickdarmschleimhaut kommt es infolge von Hämolysin- und Endotoxinsekretion zu einer variierend stark ausgeprägten mukofibrinösen, diphteroiden und nekrotisierenden Typhlocolitis (Heinritzi et al., 2006). Die Schwere der Erkrankung ist dabei stark abhängig von Umwelt- und Haltungsbedingungen sowie der Fütterungsart. Hierbei wird vermutet, dass eine verringerte Futteraufnahme, die häufig in der Absetzphase beobachtet wird, die Schwere der Krankheitsausprägung verstärkt. Zusätzlich wird angenommen, dass ein erhöhter Rohfasergehalt die Anheftung und Vermehrung der Brachyspiren fördert (Pluske et al., 1996).

Neben den infektiös bedingten spielen auch die nutritiv bedingten Diarrhoen eine Rolle in der Zeit nach dem Absetzen. Diese können sowohl durch Fehler in der Futterzusammensetzung, durch Mängel der hygienischen Qualität des Futters bzw. der Tränke als auch durch fehlerhafte Fütterungstechnik verursacht sein (Kamphues, 1984). Durch eine unsachgemäße Überfütterung der Absetzferkel mit stärkehaltigen Futtermitteln kommt es zur unvollständigen Resorption von Kohlenhydraten im Darm. Dies tritt besonders ausgeprägt bei Ferkeln auf, die vor dem Absetzen nicht an Beifutter gewöhnt wurden, da die Enzymproduktion (Amylase) nicht an die neue Fütterung angepasst werden kann. Die Kohlenhydrate werden im Dickdarm bakteriell abgebaut, was einerseits zur Folge hat, dass es aufgrund des Substratangebots zur starken Vermehrung von Bakterien im Dickdarm kommt. Andererseits bewirken sie, dass die Abbauprodukte selbst als osmotisch wirksame Substanzen im Darm vorhanden sind, die Wasser im Darmlumen zurückhalten und zusätzlich Entzündungsreaktionen im Darm bewirken können (Waldmann und Wendt, 2004). Durch eine restriktive Fütterung eines der Verdauungskapazität angepassten und qualitativ hochwertigen Futters kann das Risiko nutritiv bedingter Diarrhoen gemindert werden (Kamphues, 1984).

## **2.2 Einsatz von antibiotischen Leistungsförderern**

Seit den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts spielten antibiotische Leistungsförderer eine bedeutende Rolle in der Schweinehaltung. Es handelte sich dabei um Futterzusatzstoffe mit antibakteriell wirksamen Substanzen, die in subtherapeutischer Dosierung verfüttert wurden und somit nicht als Arzneimittel galten (Richter et al., 1996).

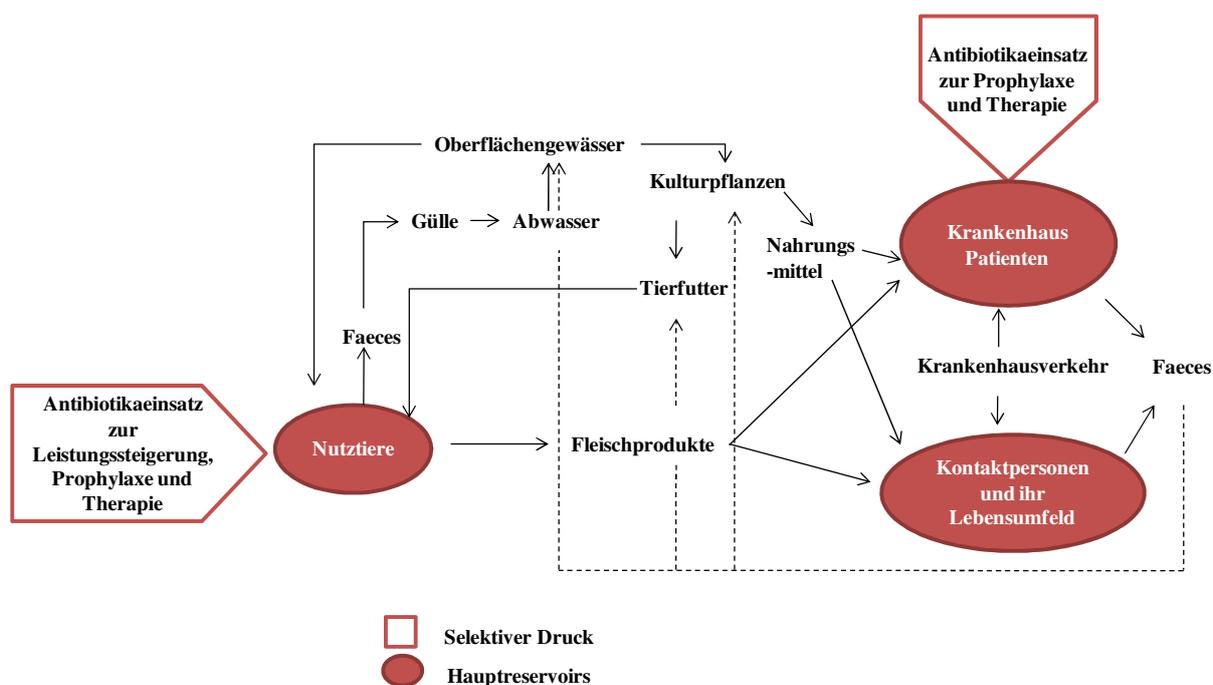
### Vorteile der antibiotischen Leistungsförderer

Durch den Einsatz von antibiotischen Leistungsförderern in Futtermischungen konnte eine Verbesserung der Tiergesundheit und eine Leistungssteigerung erzielt werden, was wiederum zu einer Senkung der Produktionskosten führte (Thomke und Elwinger, 1998). Besonders bei Absetzferkeln konnten neben der allgemeinen Senkung der Mortalität auch die ökonomisch wichtigen Gesichtspunkte Lebendmassezunahme und Futteraufwand durch den Einsatz antibiotischer Leistungsförderer positiv beeinflusst werden. Ein geringerer Futteraufwand führte auch zu einem reduzierten Restnährstoffgehalt der Gülle, was eine geringere Umweltbelastung mit sich brachte (Freitag, 1999).

Antibiotischen Leistungsförderern wurde ein regulierender Einfluss auf die intestinale mikrobielle Flora zugesprochen. Durch eine geringere Bakterienbesiedlung sollte eine Prophylaxe gegen Verdauungsstörungen erreicht werden. Ebenfalls wurde eine Abnahme proteolytischer Prozesse im Darm beobachtet, was eine bessere Absorption von Aminosäuren und eine Senkung der Produktion von Ammoniak und Aminen mit sich brachte (Dierick et al., 1986b). Zusätzlich wurde die verringerte mikrobielle Besiedlung mit einer möglicherweise veränderten Reaktivität des Immunsystems in Zusammenhang gebracht (Thomke und Elwinger, 1998). Die positive Wirkung antibiotischer Leistungsförderer war dabei abhängig von der äußeren Umwelt. Je schlechter die Umgebungsbedingungen, desto effektiver schien deren Wirkung (Thomke und Elwinger, 1998).

Nachteile der antibiotischen Leistungsförderer

Der Einsatz antimikrobieller Stoffe als Leistungsförderer bewirkt eine Verminderung der Bakterienkonzentration im Gastrointestinaltrakt, gleichzeitig kann er einen Selektionsdruck in Richtung resistenter Mikroorganismen erzeugen (Mateu und Martin, 2001). Es wird vermutet, dass die regelmäßige Anwendung antimikrobieller Substanzen ein vermehrtes Auftreten von Resistenzen der Bakterien gegenüber diesen Stoffen bewirkt (Witte, 1998). Resistenzen beschreiben Mechanismen, die es den Bakterien ermöglichen, vormals wirksame antimikrobielle Substanzen abzuschwächen oder zu neutralisieren. Diese Mechanismen entstehen in Bakterien entweder über Mutationen oder durch Aneignung von DNA anderer Bakterien durch Plasmide oder Transposons (Mateu und Martin, 2001). Solche Resistenzen stellen einerseits ein Problem in der Krankheitsbekämpfung mit antimikrobiellen Substanzen in der Veterinärmedizin dar (Mateu und Martin, 2000), andererseits wird eine mögliche Übertragung dieser Resistenzen auf humanpathogene Keime diskutiert (Molbak, 2004). Mögliche Übertragungswege resistenzgenetragender Bakterien wurden von Witte (1998) in einer Abbildung zusammengefasst (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Netzwerk der Resistenzen: Ökologische Beziehungen zwischen antibiotikaresistenten Bakterien und Resistenzgenen: selektiver Druck, Hauptreservoirs und Übertragungswege, nach Witte (1998)

Inwieweit der Einsatz der antimikrobiellen Leistungsförderer tatsächlich die Resistenzentwicklung von Bakterien beeinflusst und welchen Einfluss der therapeutische Einsatz antimikrobieller Substanzen sowohl in der Veterinär- als auch in der Humanmedizin in diesem Zusammenhang spielt, wird ebenso kontrovers diskutiert, wie die Frage nach der Übertragbarkeit dieser Resistenzen vom Tier auf den Menschen (Collignon, 2004; Molbak, 2004; Phillips, 2007; Phillips, 2008). Aufgrund der erwähnten Vorbehalte besteht seit Januar 2006 ein Einsatzverbot antibiotischer Leistungsförderer, das in der EG-Verordnung

1831/2003 gesetzlich verankert wurde. Damit ergibt sich die Notwendigkeit, andere Lösungen zu entwickeln, um die tiergesundheitliche und ökonomische Situation in der Ferkelproduktion zu verbessern.

## 2.3 Mittelkettige Fettsäuren

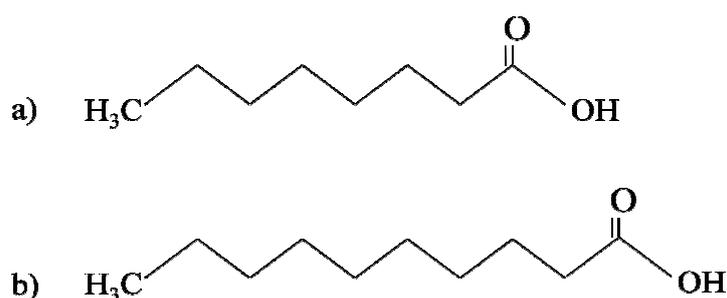
### 2.3.1 Chemische Struktur und Vorkommen

Mittelkettige Fettsäuren (mkFs) sind gesättigte Fettsäuren mit einer unverzweigten Kohlenwasserstoffkette, bestehend aus 6 bis 10 Kohlenstoffatomen (Marten et al., 2006). Im Einzelnen handelt es sich dabei um die Capronsäure (C6:0, Hexansäure), Caprylsäure (C8:0, Octansäure) und Caprinsäure (C10:0, Decansäure). Manche Autoren zählen auch die Laurinsäure mit 12 Kohlenstoffatomen (Dodecansäure) zur Gruppe der mkFs (Bach und Babayan, 1982). Im Vergleich zu langkettigen Fettsäuren (lkFs) weisen die mkFs einen geringeren Schmelzpunkt, eine kleinere Molekülmasse und eine geringere Energiedichte auf (Hsiao und Siebert, 1999). Die chemischen Eigenschaften der beiden in dieser Arbeit angewandten mkFs, Capryl- und Caprinsäure, und ihre Strukturformeln sind in der Tabelle 1 und Abbildung 3 zusammengefasst.

**Tabelle 1:** Chemische Eigenschaften von Capryl- und Caprinsäure

Fettsäure	Molekulargewicht	Schmelzpunkt	pKs
Caprylsäure (C8:0)	144,2 g/mol	16,7 °C	4,89
Caprinsäure (C10:0)	172,3 g/mol	31,9 °C	4,89

pKs = negative dekadische Logarithmus des Zahlenwerts der Säurekonstanten Ks



**Abbildung 3:** Strukturformel der Caprylsäure (C8:0) (a) und der Caprinsäure (C10:0) (b)

Natürlicherweise kommen mkFs in Form von Triglyceriden vermehrt in Kokos- und Palmkernöl vor. Da ihre Gewinnung aus diesen Ölen sehr kostspielig ist, wird nach anderen Rohstoffen gesucht, die mkFs enthalten. Als eine mögliche Alternative gilt die Cuphea-Saat, die jedoch nur Caprinsäure in größeren Mengen und kaum Caprylsäure enthält (Dierick et al., 2003). Je nach Spezies sind auch in der Milch mkFs zu finden. Hohe Konzentrationen liegen in der Milch der Maus, der Ratte, des Kaninchens, der Ziege, des Pferdes und des Elefanten

vor, wogegen sie nur in geringem Maße in der Kuh-, Schaf- und menschlichen Milch und in kaum messbaren Mengen in der Milch der Sau, des Kamels und des Meerschweinchens zu finden sind (Decuypere und Dierick, 2003). Der Grund für die unterschiedlichen Konzentrationen ist bisher noch nicht geklärt, vermutet wird ein Zusammenhang zwischen der mkFs-Konzentration und der Reife des Neugeborenen zum Zeitpunkt der Geburt (Smith, 1980). Dies spiegelt sich jedoch nicht konsequent bei Betrachtung der Konzentration an mittelkettigen Triglyceriden (mkTg) in der Milch dieser Spezies wider.

### **2.3.2 Absorption und Metabolisierung**

MkTg werden nach der Aufnahme durch die linguale bzw. gastrische Lipase partiell hydrolysiert, sodass sie teilweise als Monoglyceride oder freie Fettsäuren vorliegen. Die vollständige Hydrolyse findet durch die Pankreaslipase im Duodenum statt. Freie mkFs unterliegen einem besonderen Absorptionsmechanismus. Sie werden nicht, wie die langkettigen Fettsäuren, in Chylomikronen eingebaut und über das Lymphsystem transportiert, sondern direkt aus der Digesta im Magen (Aw und Grigor, 1980; Hamosh et al., 1989) und im proximalen Jejunum absorbiert und via Portalblut zur Leber transportiert (Traul et al., 2000). Nur ein geringer Anteil der mkFs umgeht den portalen Kreislauf und gelangt über die Zirkulation in periphere Gewebe (Bach und Babayan, 1982; Traul et al., 2000). In der Leber ist es den mkFs möglich, unabhängig von der *Carnitin-Palmitoyl-Transferase*, die mitochondriale Membran zu passieren. Intramitochondrial werden sie durch die *mittelkettige-Acyl-CoA-Synthetase* aktiviert und rasch oxidiert (Ikeda et al., 1985). Der größte Teil wird über Acetyl-CoA weiter zu Acetat, Kohlendioxid und Ketonkörpern metabolisiert. Ein geringerer Teil wird für die Elongation endogen synthetisierter Fettsäuren genutzt (Bach und Babayan, 1982). Dieses Absorptionsverhalten der mkFs ist auch beim Schwein nachweisbar (Guillot et al., 1993), wobei ein geringer Anteil der absorbierten mkFs schon in der intestinalen Mukosa metabolisiert wird (Greenberger et al., 1965).

Dieses besondere Absorptions- und Metabolisierungsverhalten der mkFs wird hauptsächlich in der Humanmedizin genutzt, sowohl bei Erkrankungen wie Pankreasinsuffizienz, Fettmalabsorption, Beeinträchtigungen im lymphatischen Chylomikronentransport und schwerer Hyperchylomikronämie sowie auch im Rahmen der Intensivernährung (Traul et al., 2000).

### **2.3.3 Antibakterielle Effekte**

#### **Entdeckung der antibakteriellen Wirksamkeit von mittelkettigen Fettsäuren**

In den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts beschrieben Canas-Rodriguez und Smith (1966), dass der Darm von gesäugten Kaninchen nicht direkt nach der Geburt mit Bakterien besiedelt wurde, sondern dass während der Säugephase der Magen und der Dünndarm nur wenige Bakterien enthielten. Verursacht wird dieses Phänomen durch die Anwesenheit antimikrobieller Substanzen in der Kaninchenmilch, die jedoch erst durch lipolytische Abbauprozesse ihre Wirkung zeigen. Sowohl die reine Kaninchenmilch als auch die in ihr enthaltenen Tri- und Diglyceride weisen keine antibakterielle Wirkung auf (Isaacs, 2001).

Auch weitere Untersuchungen mit Milchfetten zeigten, dass erst nach ihrer Spaltung im Magen eine antibakterielle Wirkung auftrat. Da schon Kabara *et al.* (1972) nachgewiesen hatten, dass kurzkettige und mittelkettige Fettsäuren antibakterielle Effekte aufweisen, wurde angenommen, dass diese auch die wirksamen Substanzen in der Kaninchenmilch sein könnten. Die meisten Untersuchungen ergaben dabei eine ausgeprägte Wirkung auf grampositive Bakterien, wogegen die Hemmwirkung gegenüber gramnegativen Bakterien nur gering war (Canas-Rodriguez und Smith, 1966; Sprong et al., 2001).

Die Spaltung der über die Nahrung bzw. Muttermilch aufgenommenen mkTg erfolgt durch Lipasen. Eine besondere Stellung nehmen hierbei die präduodenalen Lipasen ein (linguale bzw. pharyngeale und gastrische Lipase), da sie eine besondere Präferenz für mkTg der Milch haben und durch sie die freien Fettsäuren schon im Magen wirksam vorliegen. Die Aktivität dieser Lipasen ist zwischen den Spezies sehr unterschiedlich. Eine hohe Aktivität ist bei Menschen, präruminierenden Kälbern, jungen Kaninchen und bei Hunden festzustellen, wogegen bei Ferkeln und fleischfressenden Vögeln nur eine geringe Aktivität nachzuweisen ist. Im Geflügel und anderen Vögeln fehlt sie sogar vollständig (Decuypere und Dierick, 2003).

#### Wirkungsspektrum der Capryl- und Caprinsäure bei *in vitro*-Untersuchungen

Viele *in vitro*-Untersuchungen belegen, dass mkFs und ihre Monoglyceride pathogene Bakterien, Viren und Parasiten inaktivieren. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 2, 3 und 4 für Capryl- und Caprinsäure zusammengefasst.

**Tabelle 2** Zusammenstellung der Wirksamkeit von Capryl- und Caprinsäure auf ausgewählte grampositive Bakterien in verschiedenen *in vitro*-Versuchen

Testkeim	Capryl- säure	Konz.	Caprin- säure	Konz.	Literatur
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	6,93 mM	+	2,9 mM (MHK)	Kabara <i>et al.</i> (1972)
	+	k. A.	+	k. A.	Canas-Rodriguez und Smith (1966)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	6,93 mM	+	2,9 mM (MHK)	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<b>β-hämolytische Streptokokken</b>	-	6,93 mM	+	2,9 mM (MHK)	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<b>Gruppe-D-Streptokokken</b>	-	6,93 mM	+	5,8 mM (MHK)	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Streptococcus faecalis</i>	+/-	k. A.	+/-	k. A.	Canas-Rodriguez und Smith (1966)
<i>Bacillus subtilis</i>	+	1,12 mM (MHK)	&		Hsiao und Siebert (1999)
	+	2mM	+	2 mM	Sheu und Freese (1973)
<i>Bacillus cereus</i>	+	0,47 mM (MHK)	&		Hsiao und Siebert (1999)
<i>Micrococcus ssp.</i>	-	6,93 mM	+	2,9 mM (MHK)	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Nocardia asteroides</i>	-	6,93 mM	+	1,45 mM (MHK)	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Corynebacterium ssp.</i>	-	6,93 mM	+	1,45 mM (MHK)	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Pneumococcus ssp.</i>	-	6,93 mM	+	1,45 mM (MHK)	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Listeria monocytogenes</i>	-	0,5 mM	+	0,5 mM	Sprong <i>et al.</i> (2001)
	+	5 mM	+	0,5 mM	Sprong <i>et al.</i> (1999)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	k. A.	+	k. A.	Canas-Rodriguez und Smith (1966)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	11,0 mM (MHK)	&		Hsiao und Siebert (1999)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	18,2 mM (MHK)	&		Hsiao und Siebert (1999)
<i>Clostridium perfringens</i>	+	k. A.	+	k. A.	Canas-Rodriguez und Smith (1966)
<i>Enterococcus faecium</i>	+	< 2 mM (MHK)	&		Sun <i>et al.</i> (2002)
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	< 2 mM (MHK)	&		Sun <i>et al.</i> (2002)
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	+	< 2 mM (MHK)	&		Sun <i>et al.</i> (2002)

+ = Hemmung; - = keine Hemmung; +/- = geringe Hemmung; & = nicht untersucht; k. A. = keine Angaben; MHK = minimale Hemmkonzentration; mM = millimolar

**Tabelle 3** Zusammenstellung der Wirksamkeit von Capryl- und Caprinsäure auf ausgewählte gramnegative Bakterien in verschiedenen *in vitro*-Versuchen

Testkeim	Capryl- säure	Konz.	Caprin- säure	Konz.	Literatur
<i>Escherichia coli</i>	-	0,5 mM	+	0,5 mM	Sprong <i>et al.</i> (2001)
	-	k. A.	-	k. A.	Petschow <i>et al.</i> (1998)
	-	6,93 mM	-	6,93 mM	Kabara <i>et al.</i> (1972)
	+/-	k. A.	+/-	k. A.	Canas-Rodriguez und Smith (1966)
	+	2,1 mM (MHK)	&	2 mM	Hsiao und Siebert (1999)
	-	2 mM	-		Sheu und Freese (1973)
	-	< 2 mM (MHK)	&		Sun <i>et al.</i> (2002)
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	0,5 mM	+	0,5 mM	Sprong <i>et al.</i> (2001)
	-	5 mM	-	5 mM	Sprong <i>et al.</i> (1999)
	+	10 mM	+	5 mM	Van Immerseel <i>et al.</i> (2004)
<i>Campylobacter jejuni</i>	-	0,5 mM	+	0,5 mM	Sprong <i>et al.</i> (2001)
<i>Vibrio cholerae</i>	-	k. A.	-	k. A.	Petschow <i>et al.</i> (1998)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	-	10 mM	+	10 mM	Bergsson <i>et al.</i> (1998)
<i>Helicobacter pylori</i>	+	10 mM	+	2,5 mM	Bergsson <i>et al.</i> (2002)
	-	5 mM	-	5 mM	Petschow <i>et al.</i> (1998)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	-	2,5 mM	+/-	2,5 mM	Bergsson <i>et al.</i> (1999)
<i>Proteus vulgaris</i>	-	6,93 mM	-	6,93 mM	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Proteus mirabilis</i>	-	6,93 mM	-	6,93 mM	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Proteus rettgeri</i>	-	6,93 mM	-	6,93 mM	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Serratia marcescens</i>	-	6,93 mM	-	6,93 mM	Kabara <i>et al.</i> (1972)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	< 2 mM	&		Sun <i>et al.</i> (2002)

+ = Hemmung; - = keine Hemmung; +/- = geringe Hemmung; & = nicht untersucht; k. A. = keine Angaben; MHK = minimale Hemmkonzentration; mM = millimolar

**Tabelle 4:** Zusammenstellung der Wirksamkeit von Capryl- und Caprinsäure auf Viren, *Candida albicans* und *Giardia lamblia* in verschiedenen *in vitro*-Versuchen

Testkeim	Capryl- säure	Konz.	Caprin- säure	Konz.	Literatur
<i>Resp. Syncytial Virus</i>	+/-	15 mM	+	30 mM	Isaac <i>et al.</i> (1995)
<i>Herpes simplex Virus</i>	+/-	15 mM	+	30 mM	Isaac <i>et al.</i> (1995)
	&		+	22 mM	Thormar <i>et al.</i> (1987)
<i>Vesikuläres Stomatitis Virus</i>	+	69 mM	+	22 mM	Thormar <i>et al.</i> (1987)
<i>Visna Virus</i>	+	69 mM	+	22 mM	Thormar <i>et al.</i> (1987)
<i>Candida albicans</i>	-	6,93 mM	+	2,9 mM	Kabara <i>et al.</i> (1972)
	+	k. A.	+	k. A.	Canas-Rodriguez und Smith (1966)
<i>Giardia lamblia</i>	+/-	> 4,00 $\mu$ M LD <sub>50</sub>	+	500- 2000 $\mu$ M LD <sub>50</sub>	Reiner <i>et al.</i> (1986)

+ = Hemmung; - = keine Hemmung; +/- = geringe Hemmung; & = nicht untersucht; k. A. = keine Angaben; MHK = minimale Hemmkonzentration; LD<sub>50</sub> = Letale Dosis (50 % der Giardienpopulation werden bei dieser Konzentration abgetötet); mM = millimolar

Die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen sind zum Teil widersprüchlich. Die Caprylsäure wies in den meisten Untersuchungen keine Wirkung gegenüber gramnegativen Bakterien auf. Auf grampositive Bakterien konnte eine Wirkung festgestellt werden, die aber erst mit relativ hohen Konzentrationen erreicht wurde (Kabara *et al.*, 1972; Petschow *et al.*, 1996; Bergsson *et al.*, 1998; Bergsson *et al.*, 1999; Sprong *et al.*, 1999; Bergsson *et al.*, 2002). Dem gegenüber steht jedoch die Untersuchung von Sun *et al.* (2002), die der Caprylsäure besondere Wirksamkeit gegenüber gramnegativen Bakterien zusprechen.

Die Caprinsäure zeigte in vielen Untersuchungen sowohl auf gramnegative (Petschow *et al.*, 1996; Bergsson *et al.*, 1998; Bergsson *et al.*, 1999; Bergsson *et al.*, 2002) als auch grampositive Bakterien (Sprong *et al.*, 1999) eine effektive antibakterielle Wirkung. Andere Studien beobachteten diese nur gegenüber grampositiven Bakterien (Kabara *et al.*, 1972).

Zusätzlich konnte in vielen Studien eine ausgeprägte antibakterielle Wirksamkeit der Laurinsäure (C12:0) nachgewiesen werden, die zum Teil die Wirkung der anderen freien Fettsäuren übertraf (Canas-Rodriguez und Smith, 1966; Kabara *et al.*, 1972; Petschow *et al.*, 1996; Bergsson *et al.*, 1998; Sprong *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2002). Die Laurinsäure wirkt besonders effektiv auf grampositive Bakterien. Monoglyceride der Caprinsäure und der Laurinsäure zeigten in vielen Untersuchungen eine deutlich effektivere Beeinflussung des Bakterienwachstums als ihre freien Fettsäuren (Kabara *et al.*, 1972; Petschow *et al.*, 1996; Bergsson *et al.*, 1998; Petschow *et al.*, 1998; Bergsson *et al.*, 1999; Sprong *et al.*, 1999; Bergsson *et al.*, 2002).

Bei der Betrachtung der für das Absetzferkel relevanten pathogenen Bakterien *E. coli* und *Salmonella enteritidis* sind die Ergebnisse sehr uneinheitlich, was vermutlich durch die unterschiedlich eingesetzten Konzentrationen, Nährmedien und pH-Werte begründet ist. Zum Teil konnte mit beiden Fettsäuren bei einer Konzentration von 6,93 mM keine Wirkung auf gramnegative Bakterien festgestellt werden (Kabara et al., 1972). Sprong *et al.* (2001) erzielten jedoch mit der Caprinsäure in einer Konzentration von 0,5 mM eine signifikante Reduktion von *E. coli* und *Salmonella enteritidis*. Dagegen liegt die minimale Hemmkonzentration der Caprylsäure für *E. coli* bei 1,73 g/l (12 mM) (Hsiao und Siebert, 1999). Dass eine Wirksamkeit der Caprylsäure erst in höheren Konzentrationen besteht, zeigten auch Untersuchungen an *Salmonella enteritidis*, die erst durch eine Konzentration von 10 mM inhibiert wurden (Van Immerseel et al., 2004).

In Kombination weisen die Capryl- und Caprinsäure anscheinend synergistische Effekte auf. Eine Gesamtkonzentration von 0,35 g mkFs (C8:0+C10:0) pro 100 g Medium bei einem pH-Wert von 5 bewirkte eine Senkung der Keimflora um mindestens eine Zehnerpotenz, wobei die Mengenverhältnisse der einzelnen Fettsäuren nicht entscheidend für die Wirkung waren (Dierick et al., 2002a; 2002b).

#### Wirkungsspektrum der Capryl- und Caprinsäure bei *in vivo*-Untersuchungen

Die Wirkung der beiden Fettsäuren wurde bisher nur in wenigen *in vivo*-Versuchen experimentell nachvollzogen. Fütterungsversuche bei Ratten, denen Milch mit unterschiedlich hohem Fettgehalt verabreicht wurde, zeigten, dass ein hoher Milchfettgehalt eine Ansiedlung von oral verabreichten *Listeria monocytogenes* verhindern konnte. Die Ansiedlung von *Salmonella enteritidis* konnte dagegen unter gleichen Versuchsbedingungen nicht verhindert werden. Auffällig war, dass dieser Effekt nur im Magen und nicht im Dünndarm zu erkennen war (Sprong et al., 1999).

Zusätzlich spielt der Zeitraum zwischen Aufnahme der mkFs und der Keimexposition eine Rolle. Mit dem Einsatz der Monoglyceridform der Caprinsäure (Monocaprin) konnten Petschow *et al.* (1998) bei Mäusen, denen gleichzeitig Monocaprin und *Vibrio cholerae* oral zugeführt wurde, eine Ansiedlung der Vibrionen verhindern. Dies gelang jedoch nicht, wenn Monocaprin später dem täglichen Futter zugesetzt war, was eine verminderte Wirksamkeit des Monocaprins nach einer stattgefundenen Infektion aufzeigt.

Die antibakterielle Wirkung der mkFs wurde am Absetzferkel bisher lediglich durch die Fütterung von mittelkettigen Triglyceriden in Kombinationen mit exogen zugeführter Lipase untersucht (Dierick et al., 2002a; 2004). Die freigesetzten Fettsäuren zeigten bei Konzentrationen von 0,6 g mkFs pro 100 g frischem Mageninhalt, der fistulierten Ferkeln 30 bzw. 90 Minuten nach Futteraufnahme entnommen wurde, eine signifikant reduzierende Wirkung auf die aerobe Gesamtkeimzahl, Laktobazillen sowie Streptokokken und eine etwas geringer ausgeprägte, jedoch signifikante Reduktion der *E. coli*-Konzentration. In einem groß angelegten Fütterungsversuch (244 Absetzferkel) konnte durch eine Konzentration von 0,45 g mkFs/100 g frischer Digesta eine Reduktion der aeroben Gesamtkeimzahl und der Laktobazillen im Magen und im Duodenum gezeigt werden. Zusätzlich wurde bei diesem Versuch eine signifikante Reduktion von *E. coli* mit gleichzeitiger Erhöhung der Streptokokkenzahl im Magen nachgewiesen (Dierick et al., 2002b). Auch der Einsatz der

Cuphea-Saat als mkFs-Lieferant (hauptsächlich Caprinsäure) in Kombination mit einer exogenen Lipase bewirkte eine Reduktion der Bakterien. Die Anzahl der coliformen Keime war im Vergleich zur Kontrollgruppe im Magen und im distalen Dünndarm höher, dagegen im proximalen Dünndarm niedriger. Für Streptokokken konnte nur im proximalen Dünndarm eine signifikante Reduktion nachgewiesen werden. Die Anzahl der Laktobazillen war dagegen im Magen und proximalen Dünndarm tendenziell und im distalen Dünndarm signifikant geringer. Ein Einfluss der Cuphea-Saat auf die anaerobe Gesamtkeimzahl konnte nicht festgestellt werden, was eventuell durch den geringen Anteil an Caprylsäure in der Cuphea-Saat bedingt war (Dierick et al., 2003).

#### Antibakterielle Wirkungsmechanismen der mittelkettigen Fettsäuren

In den frühen 70er Jahren des letzten Jahrhunderts betrachtete man Fettsäuren als anionische Oberflächenwirkstoffe, die analog zu Seifen antibakterielle Effekte durch ihren Detergenzien-Charakter erzielen (Kabara et al., 1972). Die Hypothese, dass mittelkettige Fettsäuren ihre Wirkung über eine Membrandestabilisierung durch Einlagerung in die Zellwand und Zytoplasmamembran der Bakterien entfalten, wird als sehr wahrscheinlich diskutiert (Isaacs et al., 1986; Bergsson et al., 1998; Bergsson et al., 1999; Isaacs, 2001; Bergsson et al., 2002). Bei der Behandlung von *Chlamydia trachomatis* mit Monocaprin konnten mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen Veränderungen der Elementarkörperchen nachgewiesen werden, was die Autoren zu der Hypothese veranlasste, dass die Fettsäuren die bakteriellen Außenmembranen angreifen und zerstören, was zum Tod der Bakterienzelle führt (Bergsson et al., 1998). Diese membranassoziierten Effekte der mkFs werden zusätzlich in der differierenden Wirkung auf Bakterien mit unterschiedlichen Zellwandstrukturen deutlich. *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori* und *Neisseria gonorrhoeae* sind Beispiele gramnegativer Keime mit unterschiedlicher Zellwandstruktur. Auf *Helicobacter pylori* und *Neisseria gonorrhoeae* wirken die mkFs schon in geringen Konzentrationen hemmend, wogegen bei gleicher Konzentration keine Effekte auf *E. coli*, *Salmonella enteritidis* und *Salmonella typhimurium* erzielt werden (Bergsson et al., 1999; Bergsson et al., 2002). Morphologisch unterscheiden sich diese gramnegativen Bakterien in ihrer LPS-Struktur. *E. coli* und Salmonellen haben aufgrund der O-Seitenkette des LPS eine hydrophile Oberfläche, was das Angreifen von hydrophoben Substanzen (wie den Fettsäuren) erschwert. Neisserien, aber auch andere Bakterien wie z.B. *Campylobacter ssp.*, tragen auf ihrer Zellwand Lipooligosaccharide, die ausschließlich die Lipid A-Struktur aufweisen. Dadurch haben sie eine relativ hydrophobe Oberfläche, die leichter von Fettsäuren durchdringbar ist (Preston et al., 1996). Schon Untersuchungen aus den 70er Jahren zeigten sowohl bei einer Mutante von *E. coli* (die keine Heptose in das LPS einbauen konnte und der somit oberhalb der 2-Keto-3-deoxyoctonate die Polysaccharidkette (O-Antigen) fehlte) als auch bei *E. coli* und *Salmonella typhimurium*, deren LPS durch EDTA kurzfristig zerstört worden war, eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verbesserte Hemmung durch Caprinsäure. Langkettige Fettsäuren hatten im Vergleich dazu bei den Mutanten keine Wirkung, sodass von einer spezifischen Hemmwirkung der mkFs ausgegangen werden kann, die jedoch durch die LPS-Struktur beeinflusst wird. Eventuell handelt es sich um eine evolutionäre Anpassung bestimmter gramnegativer Bakterien an das intestinale Milieu, in

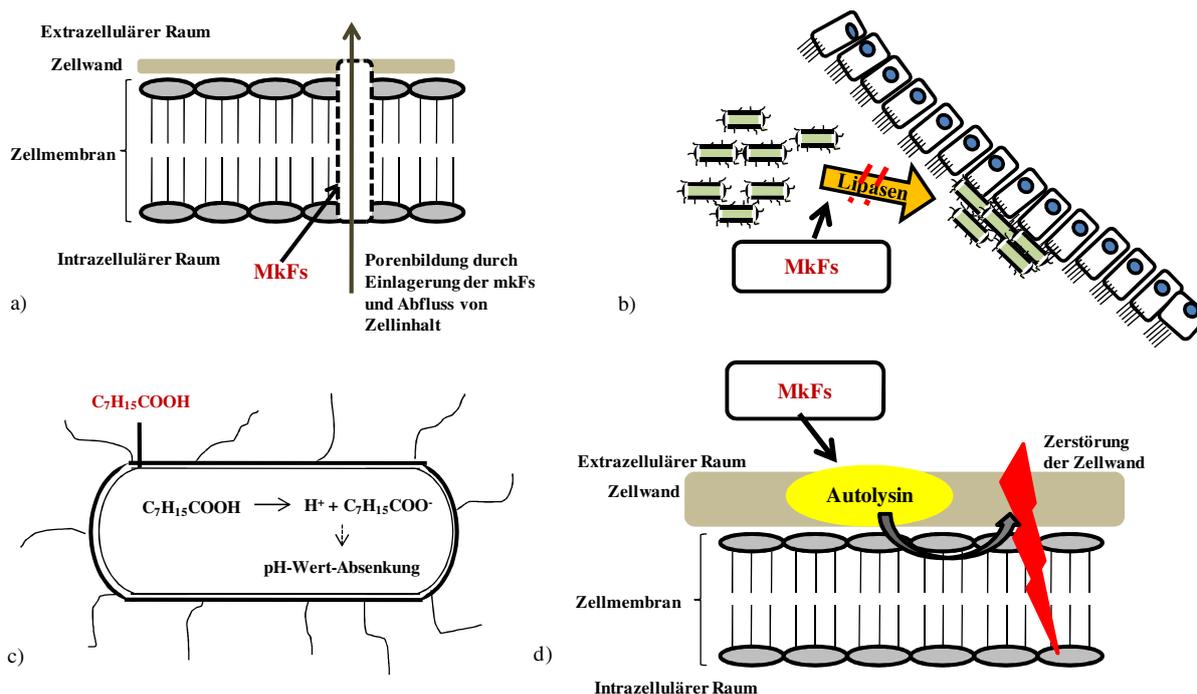
dem sie durch die Aufspaltung der Nahrung häufig mk- und lkFs exponiert sind (Sheu und Freese, 1973). Auch an behüllten Viren konnte durch Anfärbeversuche gezeigt werden, dass nach der Inkubation mit mkFs keine Anfärbung der Virushülle mehr möglich war, sodass von einer Zerstörung der Hülle ausgegangen werden kann (Thormar et al., 1987).

Einen anderen möglichen Wirkmechanismus stellt das Eindringen der Fettsäuren im undissoziierten Zustand in das Innere des Bakteriums dar. Im alkalischen Zytoplasma dissoziieren die mkFs in Protonen und Anionen und bewirken eine Absenkung des pH-Werts. Aus dieser resultieren Funktionsstörungen zytoplasmatischer Enzyme, der Transportsysteme für Nährstoffe und der ATP-abhängigen Ionenpumpen, die zum Tod der Bakterienzelle führen (Freese et al., 1973; Hsiao und Siebert, 1999). Ein stärkerer inhibitorischer Effekt der undissoziierten im Vergleich zur dissoziierten Form konnte schon für die kurzkettigen Fettsäuren festgestellt werden (Eklund, 1983). Durch diese Abhängigkeit vom Dissoziationsgrad erlangt der pH-Wert des umgebenden Milieus eine herausragende Bedeutung. In mehreren *in vitro*-Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen steigendem pH-Wert des Nährmediums und sinkender Wirksamkeit der mkFs nachgewiesen werden (Hsiao und Siebert, 1999; Sun et al., 2002).

Andere postulierte Wirkmechanismen sind sowohl die Beeinflussung autolytischer Enzyme der bakteriellen Zellwand (Autolysin), die am Prozess des bakteriellen Todes und der Zelllyse beteiligt sind und durch mkFs induziert werden (Tsuchido et al., 1985), als auch die Hemmung mikrobieller Lipasen, die zur Kolonisation von Haut und Mukosa benötigt werden (Grippa et al., 1999). Zusätzlich konnte in Zellkulturversuchen nach der Inkubation mit mkFs eine Verminderung der Invasion von Salmonellen in Epithelzellen nachgewiesen werden, die auf einer Absenkung der *hilA*-Expression beruhte. Dabei handelt es sich um ein Gen, das einen Schlüsselregulator für die Invasionskapazität der Salmonellen darstellt (Van Immerseel et al., 2004).

Obwohl sich sehr viele Studien der pathogenen Wachstums- und Kolonisationshemmung mittels mkFs angenommen haben, sind die genauen Wirkmechanismen nicht eindeutig geklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen. Auch die mögliche Metabolisierung der mkFs via  $\beta$ -Oxidation durch gramnegative Bakterien (Fay und Farias, 1975; Cherrington et al., 1991), die eventuell ein Grund für ihre geringere Sensitivität gegenüber den mkFs sein könnte, muss eingehender untersucht werden.

Die in der Literatur am häufigsten erwähnten Wirkmechanismen der mkFs sind in der Abbildung 4 schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung der postulierten Wirkungsmechanismen der mittelkettigen Fettsäuren

a) Zerstörung der Integrität der bakteriellen Zellwand und Zytoplasmamembran b) Verhinderung der bakteriellen Kolonisierung an der Darmwand durch Hemmung bakterieller Lipasen c) Intrazelluläre pH-Wert-Absenkung durch Dissoziation der mkFs d) Zerstörung der bakteriellen Zellwand durch Aktivierung bakterieller Autolysine

### 2.3.4 Wirkung auf die Darmmorphologie und -physiologie

Nach jahrelangem Einsatz der mkFs in der Humanmedizin wurden neben der antimikrobiellen Wirkung auch einige positive Effekte auf die Darmphysiologie festgestellt. Sie fördern die reaktive Villus-Hyperplasie (Galluser et al., 1993; Jenkins und Thompson, 1993; Czernichow et al., 1996; Iba et al., 1998) und haben positive Effekte auf membrangebundene Enzyme der Epithelien (Takase und Goda, 1990). Zudem begünstigen sie die Absorption hydrophiler Medikamente (Lindmark et al., 1995; Lindmark et al., 1998) und sind schnelle und leicht verfügbare Energielieferanten für Enterozyten (Greenberger et al., 1965; Guillot et al., 1993). Beim Einsatz der mkFs in der Schweinefütterung konnte auch eine Steigerung der Villushöhe und eine Senkung der Kryptentiefe nachgewiesen werden (Dierick et al., 2003). Dierick *et al.* (2003) fanden zusätzlich in den untersuchten Dünndarmabschnitten eine geringere Anzahl von intraepithelialen Lymphozyten (IEL). Da IEL eine Rolle bei der Abwehr gegen invasive Pathogene und der Apoptoseinduktion spielen, nehmen die Autoren an, dass durch die verringerte Anzahl der IEL die Apoptoserate der Enterozyten gesenkt wird. Dies spiegelt sich in der Steigerung der Villushöhe wider und bedingt eine verringerte Mitoserate im Kryptenbereich, die sich in einer geringeren Tiefe ausdrückt. Dies verspricht einen Vorteil für die Absetzzeit, in deren Verlauf häufig Villusatrophie und Kryptenzellhyperplasie auftreten, wodurch die digestive und absorptive Kapazität des Darmes vermindert wird (Pluske et al., 1997). Ob diese morphologischen Veränderungen durch die direkte Wirkung der mkFs auf die IEL oder die Enterozyten oder indirekt durch die Absenkung der Pathogenkonzentration

im Darmlumen erreicht wurden, ist jedoch nicht vollständig geklärt (Decuypere und Dierick, 2003; Dierick et al., 2003).

Säugerzellkulturen (HeLa, humane Fibroblasten und murine Neuroblastomazellen) wiesen nach einer Behandlung mit millimolaren Konzentrationen von C6:0 bis C10:0 Fettsäuren Wachstumsdepressionen und morphologische Veränderungen auf, die vermutlich durch Änderungen in der Bindungsstruktur der Zellen bedingt waren (Sheu et al., 1975). Auch andere Autoren warnen vor Schäden an Epithelzellen und möglichen Funktionsstörungen der Phospholipidmembran durch den Einsatz von mkFs (Wargovich et al., 1984; Bergner und Sommer, 1994). Kanai *et al.* (1979) merken dagegen an, dass mkFs und ihre Acylglycerole als anionische oberflächenaktive Verbindungen zwar in *in vitro*-Modellen einen zytotoxischen, membranwirksamen Effekt haben, dass dieser aber nicht in lebenden Organismen zum Tragen kommt, da neutralisierende Agentien wie Serum, Chymus und Muzine derartige Zelleffekte kompensieren können. Solch unterschiedliche Auswirkungen auf *in vitro*-Zellkulturen und *in vivo*-Zellgewebe wurden auch bei kurzkettigen Fettsäuren festgestellt (Wächtershäuser und Stein, 2000).

Auch wenn die mkTg und mkFs von der U.S. Food and Drugs Administration mit der Kategorie „GRAS“ (generally recognized as safe) als sicher für Ernährungszwecke angesehen werden, bedarf es weiterer *in vivo*-Versuche, die sich mit den Einflüssen dieser Substanzen auf die Mukosa beschäftigen. Im Besonderen gilt dies, wenn mkFs in hohen Dosen oder ohne vorherige Gewöhnung der Ration zugefügt werden sollen (Marten et al., 2006).

### **2.3.5 Wirkung auf Leistungsparameter**

Der mögliche Nutzen der mkFs als schnell verfügbare und leicht metabolisierbare Energielieferanten wurde in der Schweinefütterung in mehreren Studien untersucht, wobei die mkFs hauptsächlich in Form intakter mkTg dem Futter zugesetzt wurden.

Der Einsatz von mkTg in der Sauenfütterung (späte Gestationsphase) zeigte im Vergleich zu Triglyceriden, die langkettige Fettsäuren (lkFs) enthielten, zwar keine Unterschiede bei den Sauen selbst (Gatlin et al., 2002), jedoch konnte in einigen Studien ein Anstieg der Überlebensrate von neonatalen Ferkeln ermittelt werden (Newcomb et al., 1991; Azain, 1993; Jean-KuoBin und Chiang-ShuHsing, 1999). Dies wurde mit einem ansteigenden Blutglucosespiegel und einem gesteigertem Glycogenvorrat bei den neugeborenen Ferkeln in Zusammenhang gebracht. Die gefütterten mkTg bewirkten in diesen Studien nur geringe Veränderungen der Milchfettkomposition, sodass kein Zusammenhang zwischen mkFs-Gehalt in der Sauenmilch und der verbesserten Überlebensrate der Ferkel festgestellt werden konnte (Azain, 1993). Die direkte Gabe von mkTg an Saugferkel bewirkte eine Verbesserung der Energiebilanz bei neonatalen Tieren, sodass die Überlebensrate erhöht werden konnte (Odle, 1997; Odle, 1999). Bei zu hohen Dosierungen (> 6 ml mkTg-Öl als Bolus) zeigten sich jedoch narkotische Effekte, sodass die Vitalität der Ferkel herabgesetzt wurde und vor allem bei Ferkeln mit einem Geburtsgewicht unter 1 kg ein Anstieg der Mortalität zu verzeichnen war (Wieland et al., 1993; Odle, 1999).

Bei Absetzferkeln waren die Ergebnisse bisheriger Studien eher uneinheitlich. Allee *et al.* (1972) konnten keine Unterschiede in Bezug auf Futteraufnahme, Futteraufwand und Lebendmassezunahme feststellen, als sie eine Ration mit 10 % mkTg mit Rationen

verglichen, denen Talg, Schweinefett, Kokosnussöl oder Maisöl zugefügt worden war. Auch in den Arbeiten von Newport *et al.* (1979) mit Rationen, die 15 % mkTg enthielten, und von Fakler *et al.* (1992), die eine Ration mit 8 % mkTg-Anteil mit einer Ration mit 10 % Sojaöl verglichen, konnten keine Leistungsunterschiede bei Absetzferkeln nachgewiesen werden. Dagegen fanden De Rodas und Maxwell (1990) bei Frühabsetzern einen signifikanten Anstieg der mittleren täglichen Lebendmassezunahme sowie der Futteraufnahme und einen geringeren Futteraufwand innerhalb der ersten Wochen nach dem Absetzen, wenn sie eine Ration mit 4 % Schweineschmalz und 6 % mkTg einsetzten. Rationen mit 10 % Schweineschmalz oder Butterfett ohne weiteren Zusatz konnten diese Effekte nicht erbringen. Dies bestätigte auch Dove (1993) durch vergleichende Fütterung von Rationen mit 5 % Sojaöl, mkTg oder tierischen Fetten. In dieser Studie zeigte sich eine signifikant erhöhte Wachstumsrate vermittelt durch die mkTg-Ration.

Anders als die zuvor erwähnten Studien sehen andere Autoren den Grund für die verbesserten Leistungsdaten nicht in der günstigen energetischen Verfügbarkeit der mkFs, sondern in ihrer antibakteriellen Wirkung im Darmlumen (Vervaeke *et al.*, 1979; Dierick *et al.*, 1986b; Anderson *et al.*, 1999; Gaskins *et al.*, 2002; Decuyper und Dierick, 2003). Dabei wird die Dämpfung der bakteriellen Besiedlung und der direkte und indirekte Einfluss auf die epitheliale Funktion (Villushöhe, Kryptentiefe) im vorderen Dünndarmbereich, der zur gesteigerten Aufnahme und effektiveren Nutzung von Nährstoffen führt, mit einer Verbesserung der Leistungsparameter in Zusammenhang gebracht. Dierick *et al.* (2002b) fanden in von ihnen durchgeführten Leistungsversuchen mit Absetzferkeln einen Anstieg der täglichen Lebendmassezunahme von mehr als 10 % in Verbindung mit einer Verringerung des Futteraufwands um 3 % in den Gruppen, die mit mkTg und Lipase gefüttert wurden.

Dem gegenüber steht jedoch die in vielen Untersuchungen feststellbare reduzierte Futteraufnahme bei der Verfütterung freier mkFs. Begründen lässt sich dies möglicherweise durch den Geruch bzw. Geschmack der unveresterten mkFs (Cera *et al.*, 1989). Zusätzlich können Nebenwirkungen bei der Verfütterung der mkFs und der mkTg auftreten, wenn ihre Gabe in hoher Konzentration und über eine kurze Zeit (z.B. als Bolus) stattfindet. Bei neonatalen Ferkeln können sie ketogene und sogar narkotische Wirkungen haben (Lin *et al.*, 1995). Beim Menschen führt die rasche orale Gabe von > 30 g mkTg zu Übelkeit und Magen-Darmbeschwerden (Jeukendrup und Aldred, 2004). Außerdem können mkFs die Sekretion von Cholecystokinin und möglicherweise auch anderer intestinaler Hormone bewirken, die wiederum Einfluss auf das Sättigungsgefühl und somit auf die Futteraufnahme haben (Mabayoy *et al.*, 1992; 1994). Neuere Studien belegen aber nur einen geringen Einfluss auf die Cholecystokininsekretion (Symersky *et al.*, 2002).

Trotz der Vielzahl von Studien kann somit keine abschließende Aussage zur Beeinflussung der Leistungsparameter von Saug- und Absetzferkeln durch die Fütterung von mkTg bzw. mkFs getroffen werden.

### **2.3.6 Möglichkeiten verschiedener Präparationen**

Die mkFs weisen einen starken Geruch und Geschmack auf. Eine daraus resultierende verringerte Akzeptanz des Futters und damit verbundene Verminderung der Futteraufnahme kann die Folge sein (Decuyper und Dierick, 2003). Dies spielt besonders bei den früh

abgesetzten Ferkeln eine Rolle, deren Futteraufnahme häufig nach dem Absetzen reduziert ist. Um diesem Problem zu begegnen, wird an verschiedenen Präparationen der mkFs gearbeitet. Eine Möglichkeit stellt der Einsatz von mkTg unter Zusatz einer exogen zugefügten Lipase dar, wodurch eine enzymatisch bedingte langsame Freisetzung der mkFs im Magen ermöglicht wird. Die Triglyceride weisen eine geringe Geruchs- bzw. Geschmacksintensität auf, sodass Akzeptanzprobleme vermieden werden. Darüber hinaus wird angenommen, dass durch die langsamere Freisetzung der mkFs eine längere Retentionszeit und gleichzeitig geringere Absorptionsrate im Magen ermöglicht wird, was mit einer Verbesserung der antibakteriellen Effekte einhergehen soll (Decuypere und Dierick, 2003). Diese verbesserte antibakterielle Wirkung bringen einige Autoren außerdem mit der Freisetzung von Monoglyceriden aus den mkTg in Zusammenhang, da diese sich in *in vitro*-Versuchen als besonders effizient erwiesen haben (Kabara et al., 1972; Isaacs et al., 1990; 1995).

Eine andere Möglichkeit, diesen Schwierigkeiten zu entgehen, stellt die Mikroverkapselung (Coating) der eingesetzten mkFs dar. Die Mikroverkapselung mit pflanzlichen Lipiden wurde schon erfolgreich beim Einsatz von organischen Säuren (Piva et al., 2007), von Tryptophan und Sulfonamiden (Piva et al., 1997) und von Butyrat (Claus et al., 2007) eingesetzt. In diesen Studien sollte neben eine Akzeptanzverbesserung auch ein Verbringen von Substanzen in distalere Bereiche des GI-Trakts erreicht werden, die in ungeschütztem Zustand sehr schnell absorbiert und metabolisiert werden. Zu diesem Zweck wurden hydrierte Pflanzenfette (Piva et al., 2007) oder nicht näher definierte langkettige Fettsäuren (Claus et al., 2007) genutzt. Diese Fette überstehen die Magenpassage und werden unter dem Einfluss der Pankreaslipase im Dünndarm verdaut, sodass die eingeschlossenen Substanzen einer langsamen Freisetzung im vorderen bis mittleren Dünndarm unterliegen (Claus et al., 2007). Piva *et al.* (2007) konnten durch eine Verkapselung mit Pflanzenfetten den abrupten Konzentrationsabfall der eingesetzten organischen Säuren im Lumen des Duodenums verhindern, der sich bei den ungecoateten Säuren zeigte. Sie wiesen beim Einsatz des verkapselten Produkts 15 % der im Magen gemessenen Säuremenge im Colon nach. Nach der Verfütterung des nicht verkapselten Produkts wurde keine Säure im Colon gemessen. Durch die höheren Konzentrationen der organischen Säuren im distalen Jejunum und Caecum konnte eine Reduktion der Coliformen in diesen Bereichen des GI-Trakts erreicht werden, welche sich nicht beim Einsatz der ungecoateten organischen Säuren bewirken ließ (Piva et al., 2007).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine Coating mit pflanzlichen Fetten eingesetzt, um den Geruch und Geschmack der mkFs zu maskieren und eine höhere Akzeptanz zu erreichen. Zudem sollte die Freisetzungskinetik der mkFs beeinflusst werden, um der schnellen Absorption im Magen und Duodenum zu entgehen und somit eine ausreichende Konzentration der mkFs, die eine Beeinflussung der mikrobiellen Darmflora ermöglicht, im mittleren und hinterem Dünndarm zu erreichen.

## **2.4 Immunologische Parameter beim Ferkel**

### **2.4.1 Angeborene und adaptive Immunabwehr**

Das Immunsystem schützt den Vertebraten vor Mikroorganismen wie Viren, Parasiten und Bakterien. Dabei ist die Hauptaufgabe, körpereigene von körperfremden Stoffen zu unterscheiden. Diese Aufgabe wird auf zwei voneinander abhängigen Ebenen realisiert:

1. der Ebene der angeborenen, unspezifischen Abwehr und
2. der Ebene der adaptiven, spezifischen Abwehr.

#### Angeborene Immunabwehr

Bei der angeborenen Immunabwehr handelt es sich um die erste Verteidigungslinie der Immunabwehr, die bei Kontakt mit Pathogenen sofort aktiviert wird und die Erreger direkt angreift. Die Reaktion auf Pathogene erfolgt auch bei wiederholtem Kontakt in gleicher Weise. Die adaptive Immunabwehr wird durch zelluläre Mechanismen der angeborenen Immunabwehr induziert. Die angeborene Immunabwehr setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen. Zuerst wirken Körperepithelien als Barriere gegen von außen herantretende Pathogene. Wenn diese Barriere durchbrochen wird, kommt es zur Aktivierung von Zellen und Molekülen, die den Krankheitserreger eindämmen (Janeway und Travers, 2002). Zu den zellulären Vermittlern der angeborenen Abwehr gehören Monozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und dendritische Zellen (Jungi, 2000), die die Pathogene nicht anhand spezifischer Epitope erkennen, sondern anhand pathogen-assoziiierter Moleküle z.B. durch die toll-like-Rezeptorfamilie (Saalmüller, 2006). Die humoralen Vermittler des angeborenen Immunsystems sind das Komplementsystem und verschiedene Zytokine und Chemokine, die von den zellulären Vermittlern abgesondert werden, um vielfältige Prozesse der Immunabwehr zu induzieren. Sie und die antigenpräsentierenden Zellen stellen zusätzlich die Verbindung zur adaptiven Immunabwehr dar (Janeway und Travers, 2002).

#### Adaptive Immunabwehr

Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich im Vergleich zur angeborenen Immunabwehr durch ihre Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen Erregern aus und ist somit in der Lage gezielter die Invasion von Krankheitserregern zu verhindern. Es werden hierbei die T-Zell-vermittelte und die humorale, durch B-Zellen bewerkstelligte Immunantwort unterschieden, wobei ihre Entwicklung und Wirkung stark ineinander verzahnt sind.

Bei der T-Zell-vermittelten Immunantwort treffen native T-Zellen des lokalen Lymphgewebes auf die dorthin wandernden antigenpräsentierenden Zellen, die den jeweiligen Krankheitserreger am Infektionsort aufgenommen haben und ihn in Verbindung mit eigenen Oberflächenmolekülen der T-Zelle präsentieren. Durch die Aktivierung der nativen T-Zellen synthetisieren und sezernieren diese Zytokine, welche die Proliferation und weitere Differenzierung von Zellen des Immunsystems anregen (Janeway und Travers, 2002). Zytokine bewirken die Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen, z.B. Makrophagen, und stellen somit die Verbindung zwischen der angeborenen und adaptiven Immunabwehr dar.

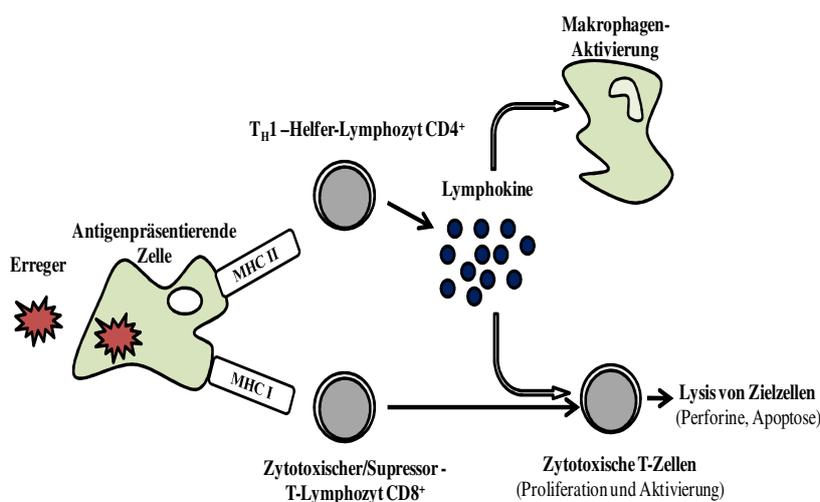
Die T-Zellen unterteilen sich in zwei Subpopulationen:

- a. zytotoxische T-Zellen
- b. T-Helferzellen

Falls Körperzellen von Viren oder intrazellulären Bakterien infiziert werden, ist es den Zellen möglich, endogene Proteine der Pathogene mittels MHC I-Oberflächenmolekülen auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Die zytotoxischen T-Zellen erkennen durch die Bindung ihres T-Zell-Rezeptors an ein Proteinantigen-präsentierendes MHC I-Molekül die infizierten Zellen (Saalmüller, 2006). Sie sind in der Lage, infizierte Zielzellen zu lysieren, indem sie membrangebundene Granula freisetzen, die Perforine, Serinesterasen und Proteoglykane enthalten. Die zytotoxische T-Zelle bleibt dabei unbeschädigt.

Die T-Helferzellen werden dagegen über antigenpräsentierende Zellen (APZ) aktiviert. Die Antigene werden von den APZ via Endozytose aufgenommen und endosomal in Peptide abgebaut. Die Peptidfragmente werden über MHC II-Moleküle auf der Oberfläche der Zelle präsentiert und mittels des T-Zell-Rezeptors der T-Helferzellen erkannt. Diese lassen sich weiter einteilen in die  $T_H1$ -Zellen und die  $T_H2$ -Zellen. Die aktivierten  $T_H1$ -Zellen sezernieren Interferon  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) und Interleukin 2 ( $IL2$ ), sie vermitteln Entzündungsreaktionen (Delayed Type Hypersensitivity) und unterstützen darüber hinaus die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen und die IgG2a-Antwort (Bianchi und van der Heijden, 1994). Die  $T_H2$ -Zellen beeinflussen die humorale Immunabwehr. Durch die Sekretion der Zytokine  $IL4$ ,  $IL5$ ,  $IL10$  und  $TGF\beta$  (engl. transforming growth factor  $\beta$ ) bewirken sie die Aktivierung der B-Zellen und die Antikörperherstellung, v.a. die von IgE und IgA (Bianchi und van der Heijden, 1994; Saalmüller, 2006).

Eine andere Gruppe der T-Zellen stellen die T-Suppressor-Zellen dar, welche die Immunantwort unterdrücken. Es ist noch nicht vollständig geklärt, ob sie einer der anderen T-Zellgruppen angehören und nur unter bestimmten Bedingungen ihre suppressive Wirkung entfalten oder ob sie eine eigenständige Zellpopulation darstellen.



**Abbildung 5:** Allgemeine schematische Darstellung der Aktivierung von T-Lymphozyten

(modifiziert nach Hof (2000))  
 Der von der antigenpräsentierenden Zelle aufgenommene Erreger wird über den MHC-Komplex auf der Oberfläche der Zelle präsentiert, wodurch es zu einer Aktivierung der CD4- bzw. CD8-positiven T-Lymphozyten kommt. Die Freisetzung von Lymphokinen bewirkt eine weitere Aktivierung der Makrophagen und der CD8-positiven zytotoxischen T-Lymphozyten.

Die humorale Immunabwehr wird von B-Zellen und den von ihnen abstammenden Plasmazellen, die Antikörper sezernieren, vermittelt. Diese Antikörper dienen der Neutralisierung extrazellulärer Pathogene und ihrer Antigene (Jungi, 2000). B-Zellen erkennen, im Gegensatz zu T-Zellen, Antigene in ungebundener Form mittels ihres membranständigen B-Zell-Rezeptors. Für die Entwicklung zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen benötigen sie zusätzlich den Stimulus von aktivierten  $T_H2$ -Zellen (Saalmüller, 2006). Dabei wird das Antigen, das am B-Zell-Rezeptor gebunden ist, in das Zellinnere der B-Zelle aufgenommen, verarbeitet und zusammen mit dem MHC II-Molekül auf der Oberfläche präsentiert. Dieser Antigen-MHC II-Komplex verbindet sich mit dem T-Zell-Rezeptor der  $T_H2$ -Zellen und bewirkt deren Zytokinausschüttung, die die klonale Expansion der B-Zellen und ihre Differenzierung zu Plasmazellen zur Folge hat. T-Zellen stimulieren durch sezernierte Zytokine zudem den Antikörper-Isotypenwechsel von IgM zu IgG, IgA und IgE, der durch die V(D)J-Rekombination zustande kommt. Diese neuen Immunglobuline zeichnen sich durch spezifische Effektorfunktionen aus (Janeway und Travers, 2002). Außerdem wird die Weiterdifferenzierung zu Gedächtnis-B-Zellen, die beim nächsten Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere B-Zellantwort ermöglichen, durch Zytokine der T-Zellen angeregt. Lediglich sich wiederholende Polysaccharide, die an Oberflächen von Bakterien zu finden sind, können eine B-Zellaktivierung ohne zusätzliche Stimulierung durch T-Zellen hervorrufen. Ein Klassenwechsel und auch die Bildung von Gedächtniszellen bleiben dabei jedoch aus (Janeway und Travers, 2002).

#### **2.4.2 Differenzierungsantigene der Lymphozyten beim Schwein**

Viele Körperzellen exprimieren immunphänotypische Oberflächenproteine, die mittels Antikörper identifiziert werden können. Es handelt sich dabei um membrangebundene Glykoproteine, die verschiedenste Funktionen übernehmen, wie beispielsweise Rezeptor- und Signalfunktionen sowie Funktionen bei der Zell-Zell-Interaktion/Adhäsion.

Mit Hilfe dieser Oberflächenmarker konnte eine CD-Nomenklatur (cluster of differentiation) erstellt werden, in der die Marker fortlaufend CD1, CD2 etc. genannt werden. Zuerst wurden nur Antikörper, die spezifisch an einem bestimmten Zellmolekül binden, als CD bezeichnet. Mittlerweile wird diese Bezeichnung auch für die Oberflächenmoleküle, die durch diese Antikörper erkannt werden, genutzt. Aufgrund ihrer Oberflächenstruktur können auch die Immunzellen genauer klassifiziert werden. Alle T-Zellen tragen CD3 als spezifischen Zellmarker. Zytotoxische T-Zellen tragen außerdem CD8- und die T-Helferzellen CD4-Moleküle. Das Schwein weist darüber hinaus speziesspezifisch auf aktivierten T-Helferzellen sowohl CD4- als auch CD8-Moleküle auf. Zwar verfügen diese Zellen über weitere Oberflächenmoleküle, trotzdem werden sie meist mit diesen klassifiziert.

In dieser Arbeit wurde anhand der Untersuchung von Differenzierungsantigenen die Verhältnisse verschiedener Immunzellen bestimmt. Die genutzten Differenzierungsantigene und die so markierten Immunzellen sind in der Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5:** In dieser Arbeit eingesetzte Differenzierungsantigene

Cluster of Differentiation	Detektion	Bekannte Funktion	Antikörper	Referenz
<b>CD4</b>	Porcine T-Helfer-Lymphozyten	Bindung an MHC II-Moleküle	74-12-4	Pescovitz <i>et al.</i> (1994)
<b>CD5</b>	Porcine T-Lymphozyten (geringer Anteil der B-Lymphozyten)	-	b53b7	Saalmüller <i>et al.</i> (1994)
<b>CD8</b>	Porcine zytotoxische T-Zellen, aktivierte T-Helferzellen, NK-Zellen	Bindung an MHC I-Moleküle	11/295/33	Saalmüller und Bryant (1994)
<b>CD21 Human</b>	Reife B-Zellen und folliculäre dendritische Zellen	Rezeptor für Komplementkomponente C3d (CR2), ein Corezeptor für B-Zellen	B-ly4	Bianchi und van der Heijden (1994), Denham <i>et al.</i> (1994; 1998)
<b>MHC II</b>	aktivierte Makrophagen und B-Zellen, NK-Zellen, zum Teil auf T-Zellen	Bindung an T-Helferzellen	MSA3	Lunney und Pescovitz (1987), Brodersen <i>et al.</i> (1998)

### 2.4.3 Besonderheiten des porcinen Immunsystems

Beim Schwein bestehen sowohl anatomische als auch zelluläre speziesspezifische Unterschiede zu anderen Tierarten.

Eine anatomische Besonderheit stellt der reverse Aufbau der Lymphknoten dar. Der Schweinelymphknoten zeichnet sich, im Gegensatz zu den Lymphknoten anderer Haussäugetiere, durch ein peripheres Markgewebe und ein zentrales kortikales Gewebe aus (König und Liebich, 2005). Aufgrund dieses Aufbaus erreichen Immunzellen über afferente Lymphbahnen den Hilus des Lymphknotens und werden über seine Peripherie direkt in das Blut transportiert (Pabst, 1987).

Auch auf zellulärer Ebene zeigen sich Unterschiede zwischen Schweinen und anderen Spezies. Die T-Zellen können allgemein anhand ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) in TCR $\gamma\delta$ -Zellen und TCR $\alpha\beta$ -Zellen unterteilt werden. Die TCR $\gamma\delta$ -Zellen nehmen, wie bei anderen Klautentieren, beim jungen Schwein den größten Anteil im peripheren Blut ein (Yang und Parkhouse, 1996), jedoch sinkt dieser deutlich mit zunehmendem Alter (Gerner *et al.*, 2008). Die TCR $\alpha\beta$ -Zellen unterteilen sich in 4 Untergruppen: CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (zytotoxische T-Zellen), CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> (T-Helferzellen), CD4<sup>+</sup>CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> (Gedächtnis-T-Helferzellen), und eine kleine Fraktion CD4<sup>-</sup>CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> (unklare Funktion beim Schwein, evtl. Suppressor-Zellen bzw. zytotoxische Zellen) (Gerner *et al.*, 2008). CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stellen eine Besonderheit des Schweines dar und wurden schon in den späten 80er Jahren beschrieben (Saalmüller *et al.*, 1987; Saalmüller *et al.*, 1989). Diese Zellen sind Gedächtnis-T-Zellen, die nach erneutem

Antigenkontakt IL2 sezernieren und damit die B-Zellreifung und Antikörperbildung fördern. Diese Zellen sind beim jungen Ferkel in geringer Zahl anzutreffen, welche mit dem Alter zunimmt (Pescovitz et al., 1994; Gerner et al., 2008). Sie entwickeln sich aus ruhenden  $CD4^+CD8^-$ -T-Helferzellen, die nach Aktivierung zu  $CD4^+CD8^+$ -Zellen reifen.

Auf der Oberfläche von B-Zellen, die eine hohe Antigen-Dichte besitzen, von Makrophagen, NK-Zellen und einem Teil der T-Zellen findet man MHC II-Moleküle (Lunney und Pescovitz, 1987). Beim Schwein sind MHC II-Moleküle, anders als beim Menschen, auch auf ruhenden Lymphozyten zu finden. Anscheinend gibt es beim Schwein, ähnlich wie beim Pferd, mit dem Alter eine Zunahme der MHC II<sup>+</sup>-Zellen. Das MHC II-Molekül ist auf  $CD4^+CD8\alpha^+$ -T-Zellen und auf einem Teil der  $CD4^-CD8\alpha^+$ -T-Zellen exprimiert,  $CD4^+CD8^-$ -T-Zellen sind dagegen immer MHC II-negativ. Die Ausprägung von MHC II hängt wahrscheinlich vom Aktivierungsgrad oder von der „Gedächtnisfunktion“ ab, sodass nach einer Stimulation auch die T-Helferzellen MHC II-positiv werden (Gerner et al., 2008). Bisher ist noch unklar, ob MHC II auf den T-Zellen zusätzlich der Antigenpräsentation dient (Gerner et al., 2008).

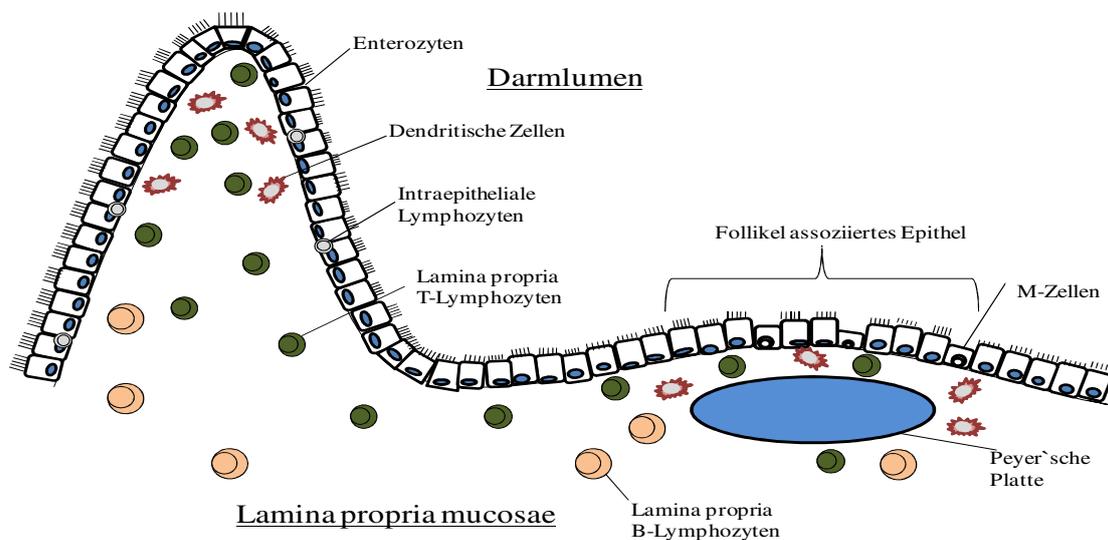
#### **2.4.4 Immunsystem des Darms beim Schwein**

Der Darm besitzt ein besonderes lokales Immunsystem, welches einerseits die Aufnahme von Nährstoffen ohne immunologische Reaktionen, andererseits die Abwehr pathogener Antigene gewährleisten muss. Hier finden sich verschiedene immunologische Strukturen (siehe Abbildung 6).

1. **Peyersche Platten (PP)**: Es handelt sich dabei um Aggregate von Lymphfollikeln, die von spezialisiertem Lymphepithel überlagert sind. Man unterscheidet zwei Typen, die jejunalen und die ilealen Peyerschen Platten. Die ilealen Peyerschen Platten (iPP) sind im Vergleich zu den jejunalen Peyerschen Platten (jPP) deutlich größer und länger. Beide Typen weisen ein sehr starkes Wachstum zur Zeit des Absetzens auf, wobei die Größenentwicklung stark vom Alter und vom Maß der Pathogen-Exposition abhängt (Stokes et al., 1994). Funktionell ist in den iPP weniger Lymphozytenmigration zu beobachten und es gibt weniger interfollikuläre Bereiche, sodass hier zehnmal mehr B-Zellen als T-Zellen zu finden sind. Die jPP weisen ungefähr zu gleichen Teilen B- und T-Zellen auf (Rothkötter et al., 1988).

2. **Follikel-assoziiertes Epithel**: Die PP sind vom Rest des Darmes durch eine Einzelschicht niedrigen, säulenartigen Epithels abgetrennt. Dieses ähnelt vom Aufbau den Villusenterozyten. Ca. 20 bis 30 % der Zellen weisen Mikrofalten auf der luminalen Oberfläche auf, was ihnen den Namen „M-Zellen“ einbrachte. Sie „sammeln“ die Antigene im Darm und leiten sie weiter zu den antigenpräsentierenden Zellen (v.a. dendritische Zellen). Diese prozessieren Proteine und präsentieren Peptide über Oberflächenmoleküle den T-Zellen der interfollikulären Region (Tsuzuki et al., 2006). Darüber hinaus befinden sich im Epithel **Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)**. Sie liegen zwischen den Enterozyten und sind auf der einen Seite durch Tight Junctions vom Darmlumen und auf der anderen Seite durch die Basalmembran von der Lamina propria abgetrennt. 90 % dieser IELs sind  $CD8^+$ -T-Zellen.

3. **Lamina propria:** Zum Zeitpunkt der Geburt liegen in der Lamina propria  $CD2^+$ -T-Zellen vor, die weder  $CD4^+$  noch  $CD8^+$  sind. Erst ab der ersten Lebenswoche nimmt die Anzahl der  $CD4^+$ -Zellen zu und leicht zeitverzögert steigt auch die Anzahl der  $CD8^+$ -Zellen. Dabei verteilen sich die  $CD4^+$ -Zellen mehr im Kern der Villi wohingegen die  $CD8^+$ -Zellen vorrangig der Basalmembran aufliegend unter den Epithelzellen zu finden sind. Zwischen  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -Zellen befinden sich dendritische Zellen. Nach der Induzierung der Lymphozyten rezirkuliert ein großer Teil von ihnen in der Lamina propria und durch die Aktivierung der T-Zellen und ihrer Zytokinfreisetzung kommt es zur Plasmazelldifferenzierung der B-Lymphozyten (Thielke et al., 1999). Nur ein gewisser Anteil wandert via intestinaler Lymphgefäße in die Mesenteriallymphknoten und direkt weiter in das periphere Blut (Bennell und Husband, 1981; Pabst, 1987).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der immunologischen Strukturen der Darmwand (modifiziert nach Altherr (2005))

### 2.4.5 Immunologische Prozesse beim Absetzen von Ferkeln

Die Entwicklung der Immunkompetenz ist unabdingbar für optimale Wachstums- und Leistungsbedingungen, jedoch ist das intestinale Immunsystem des neugeborenen Ferkels zur Zeit der Geburt nur wenig entwickelt und erreicht nicht den vollständigen Entwicklungszustand bis zum Absetzalter (Lallès et al., 2007). Die ersten beiden Tage nach dem Absetzen stellen aufgrund der Umstellung auf Festfutter und des Stresses nach dem Transport, neuer Gruppenbildung und damit einhergehender geringerer Futteraufnahme eine besonders kritische Phase dar, die einen deutlichen Einfluss auf das Immunsystem hat (McCracken et al., 1995). Insbesondere im Darm finden zahlreiche Veränderungen statt. Dies führt zu einer Adaptation des Darmes, die sich in einer Veränderung der T-Zellsubpopulationen äußert. Die IEL-Populationen entwickeln sich mit steigendem Alter der Ferkel (Vega-Lopez et al., 2001). Bei jungen Ferkeln nimmt mit dem Alter vor allem der Anteil an  $TCR\gamma\delta$ -Zellen zu. Erst später steigt auch die Anzahl der  $TCR\alpha\beta$ -Zellen an. Nach der Geburt befinden sich im Darm zunächst sehr viele  $CD2^+CD4^-CD8^-$ -Zellen, woraus sich zeitnah die  $CD4^+$ -Zellen entwickeln. Die Anzahl der  $CD8^+$ -Zellen nimmt nach der Geburt langsam zu, macht schließlich aber beim adulten Schwein den größten Anteil der dortigen T-

Lymphozyten aus. Ungefähr 2 Tage nach dem Absetzen fällt ein massiver Anstieg von CD4<sup>+</sup>- und von CD8<sup>+</sup>-Zellen auf (McCracken et al., 1999). Gleichzeitig findet nach dem Absetzen eine zweiphasige Zytokinausschüttung im Darm statt. In der ersten Phase (ca. 2 Tage nach dem Absetzen) kommt es zu einem Anstieg der mRNA-Expression von IL1 $\beta$ , IL6 und TNF $\alpha$ . In der zweiten Phase (2.-8.Tag) sinkt die mRNA-Expression von IL1 $\beta$  und IL6 wieder, jedoch bleibt TNF $\alpha$  weiterhin erhöht und stellt damit eine längerfristige Antwort auf das Absetzen dar. TNF $\alpha$  steht dabei im Verdacht, durch Stimulierung der Chloridsekretion an der Entstehung des Absetzdurchfalls beteiligt zu sein (Pie et al., 2004). Mit Ausnahme von IL1 $\beta$  wird die mRNA der Zytokine in verschiedenen Darmabschnitten unterschiedlich exprimiert, was durch spezifische, lokale Stimulation durch Mikroorganismen begründet ist. Die in den verschiedenen Darmabschnitten vergleichbare IL1 $\beta$ -mRNA-Expression wird dagegen auf Differenzierungs- bzw. Aktivierungsprozesse der Epithelzellen als Adaption auf Veränderungen infolge des Absetzens zurückgeführt und weniger durch eine spezifische bakterielle Stimulation begründet (Pie et al., 2004). Neben der Auseinandersetzung mit unbekanntem Keimen der neuen Umgebung werden zwei grundsätzliche Hypothesen diskutiert, welche die immunologischen Reaktionen im Kontext des Absetzens zu erklären versuchen. Die typischen immunologischen Effekte sind entweder Reaktionen auf neue Futterantigene (v.a. Sojabestandteile) (Dreau und Lallès, 1999) oder werden durch mangelnde Futteraufnahme und der daraus resultierenden geringeren intestinalen Stimulation verursacht (McCracken et al., 1999). Durch diese mangelnde luminale Stimulation kommt es zur Passage von Antigenen in die Lamina propria, die eine inflammatorische Immunantwort auslöst (McCracken et al., 1999). Unabhängig von der Art der Fütterung ist in den ersten beiden Tagen nach dem Absetzen ein Anstieg des Glukagons, eine Senkung der Glukose und ein Anstieg von IL1, Fibrinogen und Akut-Phase-Proteinen im Plasma nachweisbar (McCracken et al., 1995). Dabei hat die Sezernierung von IL1 und TNF $\alpha$  auch einen inhibierenden Effekt auf die Futteraufnahme. Zudem bewirkt eine allgemein stimulierte Immunantwort einen vermehrten Proteinkatabolismus, der zu einer Verringerung des Muskelaufbaus führen kann (Thomke und Elwinger, 1998), sodass sich aus der immunologischen Situation nach dem Absetzen zusätzlich Leistungseinbußen ergeben.

#### **2.4.6 Einfluss der mittelkettigen Fettsäuren auf immunologische Parameter**

Es liegen nur wenige Untersuchungen über einen direkten Einfluss von mittelkettigen Fettsäuren auf das Immunsystem vor. Bei Ratten, die via Sonde mkTg zugeführt bekamen, zeigte sich nach einer LPS-Injektion im Ileum auf mRNA-Ebene ein signifikanter Anstieg von IL6, das für die IgA-Sekretion mitverantwortlich ist. Eine erhöhte IgA-Sekretion konnte zusätzlich mit Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurden im Ileum proinflammatorische Zytokine, wie TNF $\alpha$ , IL18, MIP2 (engl. macrophage inflammatory protein 2) und MCP1 (engl. monocyte chemoattractant protein 1) durch die mkFs auf mRNA-Ebene herunterreguliert. Die Sekretion T<sub>H</sub>2-stimulierender Zytokine (IL10) wurde durch mkFs gefördert, wogegen die Sekretion T<sub>H</sub>1-IgA-hemmender Zytokine (IFN $\gamma$ ) durch sie gesenkt wurde (Kono et al., 2004). Durch die verbesserte IgA-Sekretion und die Modulation der Zytokinausschüttung nach LPS-Injektion kann den mkFs eine darmschützende Eigenschaft zugesprochen werden (Kono et al., 2004). Dagegen konnte in Zellkulturen von

Mäuse-IEL durch Behandlung mit mkFs keine Senkung der IFN $\gamma$ -Sekretion festgestellt werden, wie sie bei Behandlung mit langkettigen Fettsäuren (lkFs) zu sehen ist. Ebenso konnte mit mkFs keine Beeinflussung Mitogen-induzierter intestinaler Lymphozytentransformation erreicht werden, die sich beim Einsatz von lkFs finden lässt. Es besteht die Annahme, dass sich die lkFs, im Gegensatz zu den mkFs, in die Membran der Immunzellen einbauen und dadurch deren Funktion beeinflussen (Hara et al., 2003). Die mkFs zeigten bei Untersuchungen an isolierten humanen Monozyten eine Bindungsaffinität für den GPR84-Rezeptor, der in Monozyten nach LPS-Kontakt induziert wird (Wang et al., 2006). Durch diese Kopplung der mkFs und dem dadurch induzierten Pertussistoxin-sensitiven G $_{i/o}$ -Signalweg wird die LPS-stimulierte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (IL12) erhöht. Über das IL12 werden T $_{H1}$ -Zellen gefördert, wogegen T $_{H2}$ -Zellen inhibiert werden. Daraus folgt, dass mkFs durch Eingriffe in die Signaltransduktion eine Wirkung auf das T $_{H1}$ /T $_{H2}$ -Verhältnis ausüben könnten. Ob dieser Einfluss auch beim Schwein vorliegt, ist unklar, da der GPR84-Rezeptor bisher erst bei der Maus und dem Menschen nachgewiesen wurde (Wang et al., 2006). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Kono *et al.* (2004), die eine Förderung der T $_{H2}$ - und eine Hemmung der T $_{H1}$ -Zellen im Rattendarm feststellen konnten. Dies liegt eventuell an den verschiedenen Untersuchungsmodellen (Darm und isolierte Zellen) oder an der Spezies (Mensch gegenüber der Ratte), was möglicherweise dafür spricht, dass der GPR84-Rezeptor nicht in allen Spezies vorhanden ist oder mit anderen Wirkungen zu rechnen ist.

Weitere Einflüsse der mkFs auf das Immunsystem werden meist im Zusammenhang mit dem Einsatz in der parenteralen Ernährung untersucht, wobei der Vergleich zum Einsatz von lktg im Vordergrund steht. Grundsätzlich werden bei der parenteralen Ernährung die mkTg immer nur in Kombination mit lktg, meist als 50:50-Mischung, eingesetzt, sodass ihre individuelle Wirkung nur bedingt beurteilt werden kann. Die Nutzung dieser lktg-mkTg-Mischung bewirkt gegenüber der ausschließlichen Gabe von lktg eine signifikant höhere Blutlymphozytenzahl, eine höhere Ketogenese und eine höhere Fettnutzung, was zu einer geringeren Kohlenhydratoxidation führt. Darüber hinaus haben die mkFs eine geringere Tendenz, sich im Gewebe einzulagern (Lai und Chen, 2000). Allgemein hat die parenterale Ernährung, sowohl der lktg-mkTg-Mischung als auch der reinen lktg, eine Senkung von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$ , d.h. proinflammatorischer Zytokine zur Folge (Reimund et al., 2004). Die Konzentrationen der mkFs sind bei der parenteralen Ernährung im Blut um ein Vielfaches höher als dies durch die Absorption aus dem Futter zu erwarten ist. Aus diesem Grund und aufgrund der direkten Metabolisierung nach der Absorption aus dem Darm, wodurch nur geringe Konzentrationen der mkFs die periphere Zirkulation erreichen, ist mit solchen Effekten bei der Fütterung der mkFs nicht zu rechnen.

Möglicherweise sind immunologische Effekte jedoch eher sekundär durch die Beeinflussung der Bakterienkonzentration im Darm beim Einsatz von mkFs als Futterzusatz bedingt. Dieser Zusammenhang zwischen Bakterienkonzentration und Immunsystem des Darms wurde schon bei keimfrei gehaltenen Ferkeln an einer dünneren Lamina propria und einer konstant geringeren Anzahl an IEL deutlich (Coates, 1980).

## **2.5 Fragestellung dieser Arbeit**

Aufgrund des Verbotes antibakterieller Leistungsförderer wird nach neuen Möglichkeiten gesucht, die Probleme der Absetzphase bei Ferkeln zu vermindern. Die antibakterielle Wirkung der mkFs wurde in zahlreichen *in vitro*-Untersuchungen nachgewiesen. Aufgrund dessen wird ihr Einsatz in der Ferkelfütterung diskutiert. Über ihre *in vivo*-Wirkung ist jedoch bisher noch sehr wenig bekannt, sodass es weiterer Untersuchungen bedarf.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Effekte der mittelkettigen Fettsäuren Caprylsäure (C8:0) und Caprinsäure (C10:0) im Ferkelaufzuchtfutter auf verdauungsphysiologische Parameter, das mikrobielle Magen-Darmmilieu und einige immunologische Parameter der Ferkel genauer zu untersuchen. Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Untersuchung war, inwieweit ein Coating der mkFs mit einem veränderten Absorptionsverhalten verbunden ist und welchen Einfluss dieses auf Wirkungsart und Wirkungsort der mkFs hat.

Für die Untersuchung wurden Produkte genutzt, in denen mkFs entweder in freier oder in gecoateter Form vorlagen.

Folgende Fragestellungen dienten als Grundlage für die Untersuchungen:

Hat der Einsatz einer Mischung mkFs in der Ferkelfütterung einen Einfluss auf verdauungsphysiologische Faktoren?

In welcher Ausprägung äußert sich die antibakterielle Wirkung der eingesetzten mkFs?

Kann durch die verwendete Art des Coatings die schnelle Absorption der mkFs verhindert werden? Hat dies einen Einfluss auf ihre Wirksamkeit und ihren Wirkungsort?

Kann durch den Einsatz von mkFs in der Ferkelfütterung eine Beeinflussung immunologischer Parameter erreicht werden?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

Für die Untersuchung wurden insgesamt 36 abgesetzte kastrierte Ferkel (EUROC x Pietrain) (Schweinezucht Uckermark, 16278 Kerkow) eingesetzt.

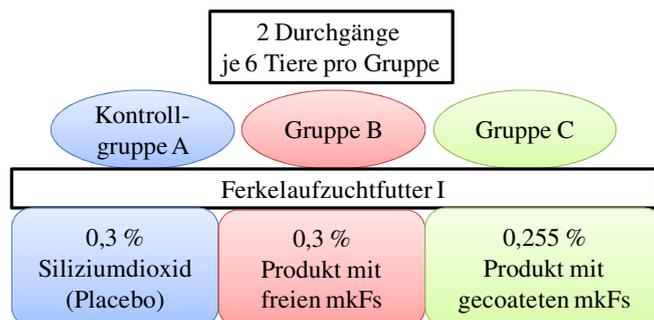
Die Durchführung erfolgte in zwei aufeinander folgenden Versuchsreihen. In jeder Versuchsreihe wurden 18 Ferkel gleichmäßig auf drei Gruppen (Kontrollgruppe A, Versuchsgruppe B und Versuchsgruppe C) verteilt.

#### **3.2 Haltung**

Die Haltung erfolgte in einem Stallraum mit mehreren Flatdeckabteilen (Vollspaltenboden ohne Einstreu). In beiden Versuchsgruppen wurden alle 6 Ferkel in einem Abteil zusammengehalten, wogegen die Kontrollgruppe, aufgrund des mangelnden räumlichen Angebots, zusätzlich in zwei Gruppen á 3 Ferkel aufgeteilt wurde. Beim Einstellen betrug die Raumtemperatur 28 °C und wurde anschließend stufenweise auf 22 °C abgesenkt. Die Luftfeuchte betrug 65 % und ein Lichtprogramm gewährleistete eine 16stündige Licht- und eine 8stündige Dunkelphase. Den Tieren stand zu jeder Zeit frisches Wasser in Form von Nippeltränken und Wassertrögen zur Verfügung. Die Fütterung erfolgte *ad libitum* über Metallbreifutterautomaten (B-Breifutterautomat, Siepmann GmbH, Deutschland). Es wurden Plastikbälle als Spielzeug angeboten.

#### **3.3 Versuchsfutter und Fütterung**

Als Basisfutter wurde ein Alleinfuttermittel für Ferkel (Ferkelaufzuchtfutter I der Firma Fugema GmbH&Co.KG, Malchin, Deutschland) verwendet (Tabellen 6 und 7). Der Versuchsfuttermischung der Gruppe B wurde 0,3 % eines Produkts, welches Caprylsäure (C8:0) und Caprinsäure (C10:0) in ungecoateter Form enthielt, zugesetzt. Für die Versuchsfuttermischung der Gruppe C wurde dem Ferkelaufzuchtfutter 0,255 % eines Produkts, das diese Fettsäuren in gecoateter Form enthielt, hinzugefügt (siehe Tabelle 8, 9 und 10). Gecoatet wurden die mkFs mit pflanzlichem Fettmaterial. Da in beiden Produkten nicht derselbe Gehalt der beiden Fettsäuren vorlag, wurde die Zulage des Produkts mit den gecoateten mkFs anhand der Summe beider Fettsäuren an die vorgegebene Zugabe des Produkts mit freien mkFs angepasst. Daraus begründet sich der Einsatz von 0,255 % des Produkts mit den gecoateten mkFs. Als Placebo wurde dem Kontrollfutter 0,3 % Siliziumdioxid hinzugefügt, da die Fettsäuren in den anderen Zusätzen an Siliziumdioxid als Trägerstoff gebunden waren. Allen drei Mischungen wurde außerdem 0,3 % Chromoxid (Chromium(III)oxide (50µm, ≥ 98 %), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland) zugesetzt, das als Marker für die Verdaulichkeitsanalyse genutzt wurde. Die Futtermischungen wurden den Ferkeln in trockener und geschroteter Form vorgelegt.



**Abbildung 7:** Versuchs- und Fütterungsdesign des vorliegenden Versuchs

**Tabelle 6:** Futterzusammensetzung der drei Fütterungsgruppen

Futtermittel	Gruppe		
	A	B	C
	%		
Gerste	36,8	36,8	36,8
Weizen	29,8	29,8	29,8
Sojabohnen, dampferhitzt	15,9	15,9	15,9
Molkenfett	8,90	8,90	8,90
Kartoffeleiweiß	2,98	2,98	2,98
Prämix*	2,88	2,88	2,88
Kalziumkarbonat	0,99	0,99	0,99
Monokalziumphosphat	0,63	0,63	0,63
Sojaöl	0,25	0,25	0,25
Natriumchlorid	0,21	0,21	0,21
Chromoxid	0,30	0,30	0,30
Siliziumdioxid	0,30		
Produkt mit freien mkFs (enthält ca. 30 % Siliziumdioxid)	0	0,30	0
Produkt mit gecoateten mkFs (enthält ca. 37 % Siliziumdioxid)	0	0	0,255

\*Zusatzstoffe je kg Futtermittel: 20000 I.E. Vit. A; 3268 I.E. Vit. D3; Butylhydroxytoluol, Butylhydroxyanisol; 666 FYT 6-Phytase, 21mg Kupfer aus Kupfer-II -sulfat Pentahydrat; 0,5 mg Selen; L-Lysin-Konzentrat, flüssig; DL-Methionin-Natrium-Konzentrat, flüssig; DL-Methionin; L-Threonin; DL-Tryptophan - keine Aromastoffe, Säuren, Probiotika, keine kohlenhydratspaltenden Enzyme

**Tabelle 7:** Rohnährstoff-, Mineralstoff- und Spurenelementgehalte und Säurebindungskapazität der eingesetzten Futtermittel (entsprechend der Empfehlungen der VDLUFA analysiert, nach Naumann und Bassler (2004))

		Gruppe		
		A	B	C
Trockensubstanz	g/kg uS	915	914	913
Rohasche	g/kg TS	54,8	54,2	54,2
Rohprotein	g/kg TS	181	181	174
Rohfett	g/kg TS	54,2	54,2	56,1
Rohfaser	g/kg TS	51,5	48,0	46,9
N-freie Extraktstoffe	g/kg TS	659	663	669
Kalzium	g/kg TS	7,39	6,72	6,31
Phosphor	g/kg TS	4,84	5,06	5,56
Natrium	g/kg TS	2,62	2,07	2,15
Eisen	mg/kg TS	350	290	293
Magnesium	g/kg TS	1,65	1,57	1,61
Kalium	g/kg TS	7,41	7,03	7,03
Zink	mg/kg TS	150	111	117
Kupfer	mg/kg TS	17,1	20,4	18,2
Säurebindungskapazität	mEq/kg	460	490	500
ME	kJ/kg uS	13,9	13,9	13,9

TS = Trockensubstanz, uS = ursprüngliche Substanz, mEq = Milliequivalent

**Tabelle 8:** Inhaltsstoffe der zugesetzten Produkte (Angaben der Hersteller)

Inhaltsstoffe	% des Gesamtprodukts	
	Produkt mit freien mkFs	Produkt mit gecoateten mkFs
mkFs (C8:0+C10:0)	50,0	50,8
Siliziumdioxid	30,0	37,0
Aromastoffe	20,0	-
Sonstiges pflanzliches Fettmaterial	-	12,2

C8:0 = Caprylsäure, C10:0 = Caprinsäure

**Tabelle 9:** Analysierter Gehalt (% der Gesamtfettsäuren) mittel- und langkettiger Fettsäuren der drei Futtermischungen  
(gemessen vom Labor: LOVAP NV, Geel, Belgien)

Fettsäuren	Gruppe		
	A	B	C
	% der Gesamtfettsäuren		
C8:0	0,70	1,60	1,60
C10:0	0,80	2,10	1,70
C12:0	11,1	10,9	10,9
C14:0	3,80	3,60	3,70
C16:0	12,2	12,1	12,3
C16:1	0,10	0,10	0,10
C17:0	0,10	0,10	0,10
C18:0	8,90	8,50	8,80
C18:1	18,4	17,9	17,9
C18:2	36,6	36,1	35,8
C18:3	6,20	6,00	6,00
C20:0	0,30	0,30	0,30
C20:1	0,30	0,30	0,30
C22:0	0,20	0,20	0,20
C22:1	0,10	0,10	0,10
C24:0	0,10	0,10	0,10
undefinierter Rest	0,10	0,00	0,10

**Tabelle 10:** Capryl- und Caprinsäure-Konzentrationen (g/kg Futter (uS)) in den Futtermischungen der drei Fütterungsgruppen  
(gemessen vom Labor: LOVAP NV, Geel, Belgien)

	Gruppe		
	A	B	C
Caprylsäure	0,347	0,792	0,820
Caprinsäure	0,397	1,04	0,871

### **3.4 Versuchsdurchführung**

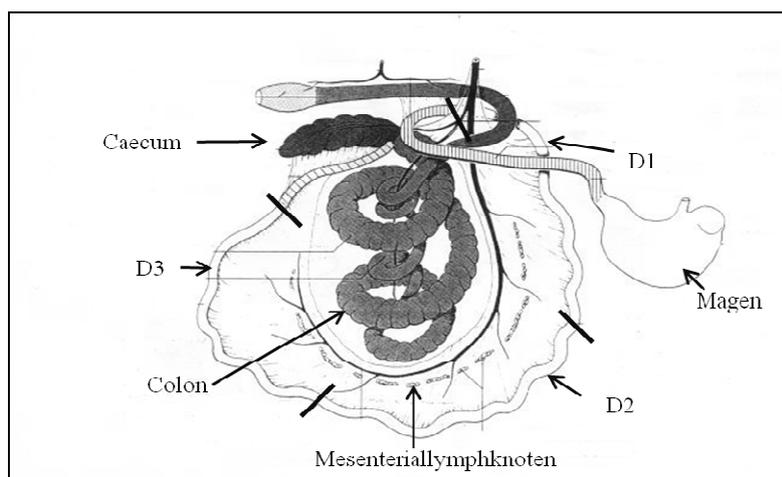
Unmittelbar nach dem Einstellen wurden die Tiere gewogen und nach der Blutentnahme in drei Gruppen aufgeteilt. Die Gruppeneinteilung erfolgte unter Berücksichtigung der Lebendmasse, sodass in jeder Gruppe die verschiedenen Lebendmassen gleichmäßig repräsentiert waren. Die drei Gruppen wurden *ad libitum* gefüttert und die Futteraufnahme

pro Bucht täglich protokolliert. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte eine Gesundheitsbewertung (Bewertungsschema s. Anhang Tab. 48) und einmal pro Woche wurden alle Ferkel gewogen. Die Fütterungsphase erstreckte sich über 25 bis 27 Tage. Am 26., 27. und 28. Versuchstag wurden je 2 Ferkel jeder Gruppe getötet.

Vor dem Tötungstag wurde den Ferkeln ab 17 Uhr das Futter entzogen. Die morgendliche Fütterung am Tötungstag wurde so organisiert, dass die Zeitspanne vom Zugang zum Futter bis zum Töten für jedes Ferkel ca. 3 Stunden betrug. Damit sollte sowohl eine möglichst starke Füllung des Gastrointestinaltrakts als auch die Vergleichbarkeit der Digesta-Parameter zwischen den Gruppen und Tieren erreicht werden.

### **3.5 Sektionsgang und Probengewinnung**

Die Ferkel wurden am Tötungstag mit Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®, 10 %ig; Serumwerk Bernburg Ag, Deutschland) und Azaperon (Stresnil®, Jansen-Cilag, Neuss, Deutschland) intravenös (0,2 ml/ 0,1 ml pro kg KM) sediert, sodass ihnen schmerzfrei Blut aus dem Herzen entnommen werden konnte. Darauf erfolgte die Tötung durch die intrakardiale Gabe eines Kombinationspräparates bestehend aus Tetracainhydrochlorid, Mebezoniumiodid und Embutramid (T61®, Intervet, Deutschland). Anschließend wurde der Bauchraum durch einen Schnitt in der Linea alba eröffnet und der Magen und der gesamte Dünndarm entnommen. Das Jejunum wurde vollständig mäanderförmig auf dem Sektionstisch ausgebreitet und in drei Drittel aufgeteilt. Aus dem Magen, den drei Jejunumdritteln, dem Ileum, dem Caecum und dem Colon wurde Digesta in 50-ml-Röhrchen abgefüllt, homogenisiert und danach weiter in 2-ml-Gefäße abgefüllt. Aus dem im Bauchraum verbliebenen Gekröse wurden die Mesenteriallymphknoten des Versorgungsbereiches des mittleren Jejunums entnommen. In der 2. Versuchsreihe wurde jedem Ferkel zusätzlich eine 2 x 4 cm große Probe aus der Mitte des Ileums entnommen und kryokonserviert.



**Abbildung 8:** Einteilung der Darmabschnitte zur Probenentnahme

Modifizierte schematische Darstellung des Schweinedarms, nach König und Liebich (2005)

D1 = proximales Jejunum, D2 = mittleres Jejunum, D3 = distales Jejunum

### **3.6 Futtermitteluntersuchung**

Die Roh Nährstoffgehalte der Futtermischungen wurden nach den Vorschriften der Weender-Analyse (Naumann und Bassler, 2004) ermittelt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Tabelle 7 dargestellt, die verwendeten Geräte in Tabelle 11 näher bezeichnet.

#### **3.6.1 Roh Nährstoffe (Weender-Analyse)**

##### Trockensubstanz (TS)

Zur Bestimmung der TS wurde das Probenmaterial in Porzellantiegel eingewogen und im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Nach Abkühlung im Exsikkator auf Zimmertemperatur wurden die Proben erneut gewogen und der TS-Gehalt errechnet, der in Prozent der ursprünglichen Substanz (uS) angegeben wurde.

##### Rohasche (Ra)

Die Ermittlung der Rohasche schloss sich an die TS-Bestimmung an. Dafür wurden die Proben 9 Stunden im Muffelofen bei 600 °C verascht und nach dem Abkühlen im Exsikkator gewogen.

##### Rohprotein (Rp)

Die Rohproteinbestimmung erfolgte über die Messung des Stickstoffgehaltes der Probe, der mit Hilfe eines Makro-Elementaranalysators gemessen wurde.

##### Rohfett (Rfe)

Die Rohfettanalyse erfolgte nach Naumann und Bassler (2004), wobei jedoch auf den Säureaufschluss verzichtet wurde, da sich daraus keine Unterschiede der Analyse ergeben hatten. Es erfolgte eine Extraktion des Fettes für 6 Stunden mit Petrolether nach Soxhlet, woran sich eine Trocknung bei 80 °C im Trockenschrank für 1 Stunde anschloss, um den Petrolether abzdampfen. Die Menge an Rohfett wurde durch die Gewichtsbestimmung des Probengefäßes mit und ohne Rohfett rechnerisch ermittelt.

##### Rohfaser (Rfa)

Die Bestimmung des Rohfasergehaltes erfolgte mit Hilfe eines Rohfaser-Analysators. Dabei wurden die Proben in 1,25 %iger Schwefelsäure gekocht, nach dem Absaugen der flüssigen Phase 1,25 %ige Natronlauge hinzugefügt und danach mit heißem destilliertem Wasser gespült. Nach der Entnahme der Glasfiltertiegel aus dem Analysator wurden sie bei 105 °C im Trockenschrank getrocknet, gewogen und dann im Muffelofen bei 500 °C verascht. Der Rohfasergehalt errechnete sich durch Subtraktion des Gewichtes der Rohasche vom Gewicht des getrockneten Inhalts der Glasfiltertiegel.

#### **3.6.2 Mineralstoffe und Spurenelemente**

##### Probenvorbereitung

Nach der Veraschung der Futterproben wurden diese mit 6 ml Salzsäure (37-38 %ig) und 20 ml destilliertem Wasser versetzt. Daraufhin wurden die Proben für 50 Minuten bei 250 °C

im Sandbad erhitzt. Nach der Filtrierung durch einen Faltenfilter wurden die Proben mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt und konnten so bis zur Messung aufbewahrt werden.

#### Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen

Der Gehalt an Kalzium, Natrium, Magnesium, Kalium, Kupfer, Zink und Eisen in der Aschelösung wurde mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bestimmt. Die erhobenen Mineralstoffgehalte sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

#### Phosphor

Für die Bestimmung des Phosphorgehalts im Futter wurden 500 µl der Aschelösung mit 5 ml einer Lösung aus Salpetersäure (134 ml, w = 65 %) und den P-Komplexbildnern Ammoniumvanadat (200 ml) und Ammoniummolybdat (200 ml) versetzt und anschließend mit destilliertem Wasser auf 20 ml aufgefüllt. Der in der Probe enthaltene Phosphor reagierte in dem salpetersauren Milieu zu einem gelben Farbkomplex, dessen Extinktion photometrisch bei einer Wellenlänge von 436 nm gemessen wurde. Anhand einer Eichkurve konnte dann der Phosphorgehalt bestimmt werden.

Die erhobenen P-Gehalte sind in der Tabelle 7 zusammengefasst.

#### **3.6.3 Säurebindungskapazität**

Für die Bestimmung der Säurebindungskapazität wurden 10 g der jeweiligen Futtermischung mit 90 ml *Aqua dest.* vermischt. Nachdem der pH-Wert der Suspension bestimmt worden war, wurde durch die Zugabe einer 1 N Salzsäure der pH-Wert 3 eingestellt. Die dazu benötigte Menge (ml) der Salzsäure wurde mit 100 multipliziert und die so errechnete Säurebindungskapazität als Milliequivalente (mEq) pro kg angegeben.

Die Säurebindungskapazität der verschiedenen Futtermischungen ist in Tabelle 7 angegeben.

#### **3.6.4 Fettsäuren**

Die Fettsäuregehalte der Futtermischungen wurden von dem externen Labor LOVAP NV (Geel, Belgien) ermittelt. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tabelle 11:** Für die Futteruntersuchungen eingesetzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Atomabsorptionsspektrometer: vario 6	Analytik Jena GmbH	Jena, Deutschland
Ammoniumheptamolybdat- Tetrahydrat	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Ammoniummonovanadat	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Analysewaage: Typ Genius	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Exsikkator: Typ Novus NS 24/29	Schott/Duran	Mainz, Deutschland
Heraeus® Trockenschrank T5042	Heraeus electronic	Hanau, Deutschland
Makro-Elementaranalysator: vario max CN	Elementar Analysesystem GmbH	Hanau, Deutschland
Muffelofen: Heraeus®Thermicon®P	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Petroleumbenzin, reinst.	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Photometer: Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Rohfaser-Analysator: Ankom <sup>2000</sup> Fibre Analyser	Ankom Technology	Macedon, USA
Salpetersäure (65 %)	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (37-38 %)	J.T.Baker	Griesheim, Deutschland
Schwefelsäure (95-97 %)	J.T.Baker	Griesheim, Deutschland

### **3.7 Leistungsparameter**

#### **3.7.1 Beurteilung des Gesundheitszustandes**

Der Gesundheitszustand der einzelnen Ferkel wurde jeden zweiten bis dritten Tag anhand eines Bewertungssystems überprüft. Die zugrunde liegenden Bewertungskriterien sind in der Tabelle 48 (s. Anhang) aufgelistet.

#### **3.7.2 Lebendmasseentwicklung und Lebendmassezunahme**

Jedes Ferkel wurde beim Einstellen, während der Versuchszeit einmal pro Woche und am Tag vor der Tötung gewogen (DE Plattformwaage 36K10N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland). Die Lebendmassezunahme wurde rechnerisch mit Hilfe der Lebendmassedaten ermittelt.

#### **3.7.3 Futteraufnahme und Futteraufwand**

Die Ermittlung des Futtermittelsverzehrs pro Bucht erfolgte durch die Futtereinwaage und die Rückwaage verbliebenen Futters am Folgetag (DE Plattformwaage 36K10N, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland).

Der Futteraufwand wurde mit Hilfe der Lebendmassezunahme ermittelt.

$$\text{Futteraufwand} = \frac{\text{mittlere Futteraufnahme (kg)}}{\text{mittlere Lebendmassezunahme (kg)}}$$

### **3.8 pH-Wert, Trockensubstanz und scheinbare praecaecale Verdaulichkeit**

#### **3.8.1 pH-Wert der Digesta**

Von den Darminhalten der Lokalisationen Magen, D1, D2, D3, Caecum und Colon wurde je 1 Gramm in ein 15-ml-Gefäß überführt, mit 9 ml destilliertem Wasser verdünnt und homogenisiert. Der pH-Wert wurde mit einer pH-Elektrode gemessen, nachdem eine 2-Punktkalibrierung mit Standardlösungen pH 4 und pH 7 durchgeführt worden war. Da aus dem Abschnitt D1 einiger Tiere nicht ausreichend Digesta gewonnen werden konnte, war eine pH-Wert-Messung in dieser Lokalisation nicht für alle Tiere möglich.

Hierfür genutzte Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 12 aufgelistet.

#### **3.8.2 Trockensubstanzgehalt der Digesta**

Die frischen Digesta-Proben der Lokalisationen Magen, D1, D2, D3, Caecum und Colon wurden in vorher abgewogene 2-ml-Gefäße eingewogen und bei minus 80 °C eingefroren. Danach wurden die Proben mit Hilfe der Vakuum-Gefriertrocknung für 2 Tage getrocknet. Die Gefäße mit der gefriergetrockneten Trockensubstanz wurden erneut gewogen. Nach Abzug der Leergewichte der Gefäße wurde anhand folgender Formel der prozentuale Trockensubstanzgehalt berechnet:

$$\% \text{ TS} = \left[ \frac{\text{Gefriergetrocknete Auswaage}}{\text{Frische Einwaage}} \right] \times 100$$

Die genutzten Geräte sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

#### **3.8.3 Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit**

##### **Messung des Chromgehaltes der Digesta-Proben des distalen Jejunums**

Für die Messung des Chromgehaltes in der Digesta aus D3 wurden ca. 0,5 g Digesta in Tiegel eingewogen und im Muffelofen verascht. Den veraschten Proben wurden 4 ml Kaliumbromatlösung (4,5 % in entionisiertem Wasser) und 3 ml Mangansulfatlösung (3 ml MnSO<sub>4</sub> (10%) mit 85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf 100 ml aufgefüllt) zugefügt und leicht geschwenkt. Anschließend wurden die Proben für 50 Minuten bei 200 °C im Sandbad erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben durch einen Faltenfilter in 50-ml-Messkolben überführt, in die je 6 ml 1,47 %ige Kalziumchloridlösung (4 g/l Kalzium) vorgelegt worden waren, und anschließend mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Aus den so aufbereiteten Proben wurde atomabsorptionsspektrometrisch die Menge an enthaltenem Chrom ermittelt.

Geräte und Chemikalien, die für die Bestimmung der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit genutzt wurden, sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Berechnung der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit

Die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit wurde für die Inhaltsstoffe Rohprotein, Kalzium, Phosphor und Rohasche aus der Digesta des hinteren Jejunumdrittels erhoben (Messmethoden siehe 3.7 Futtermitteluntersuchung). Die Inhaltsstoffe von Digesta und Futter wurden mit den Chromgehalten des hinteren Jejunumdrittels und des Futters über folgende Formel in Beziehung gesetzt:

$$\text{Verdaulichkeit [\%]} = 100 - \frac{\text{Chromgehalt}_{\text{Futter}} [\text{g/kg}]}{\text{Chromgehalt}_{\text{Digesta}} [\text{g/kg}]} \times \frac{\text{Nährstoff}_{\text{Digesta}} [\text{g/kg}]}{\text{Nährstoff}_{\text{Futter}} [\text{g/kg}]} \times 100$$

**Tabelle 12:** Für die Messung des pH-Werts, der Trockensubstanz und der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit genutzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Atomabsorptionsspektrometrie: vario 6	Analytik Jena GmbH	Jena, Deutschland
Analysewaage Typ Genius	Sartorius AG	Göttingen, Deutschland
Eppendorf Gefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Greiner Röhrchen	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
InLab®410 pH-Kombinationselektrode	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Kaliumbromat	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kalziumchlorid-Dihydrat	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Mangansulfatmonohydrat	Merck, KGaA	Darmstadt, Deutschland
Muffelofen: Heraeus®Thermicon®P	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
pH-Pufferlösung pH 7	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
pH-Pufferlösung pH4	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Vakuum-Gefriertrockner: Freeze Dryer Alpha 1-4	Christ GmbH	Osterode am Harz, Deutschland

**3.9 Mikro- und molekularbiologische Parameter**

**3.9.1 Quantitative Lebendkeimzahlbestimmung in der Digesta des distalen Jejunums und des Caecums**

Die kulturelle mikrobiologische Untersuchung wurde von dem mikrobiologischen Labor des Zentrums für Experimentelle Tierhaltung des Versuchsgutes des BfR durchgeführt. Diese Untersuchung fand jeweils an zwei der drei Schlachttage statt. Die Keimzahlen wurden mit dem Tropfplattenverfahren nach der amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren, §35 LMBG (L06.00-19), ermittelt (Anonym, 1984).

Untersucht wurde der Darminhalt des distalen Jejunums (D3) und des Caecums. Dafür wurde 1 g der Digesta in 9 g viertelstarker Ringerlösung verdünnt (Verdünnungsstufe 10<sup>-1</sup>) und mit einem Reagenzglas-Schüttler (Multi Reax, Heidolph-Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland) gründlich gemischt. Nach kurzem Absetzen der festen Bestandteile wurde von dieser Suspension 1 ml in 9 ml Ringerlösung pipettiert und homogenisiert

(Verdünnungsstufe  $10^{-2}$ ). Diese Prozedur wurde so oft wiederholt, bis die Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  vorhanden waren.

Die Nährmedienplatten wurden geviertelt und jeder Sektor wurde mit 50  $\mu$ l der entsprechenden Verdünnungsstufe im Doppelansatz beimpft. Die genutzten Nährmedien, die Inkubationsbedingungen und die betrachteten Verdünnungsstufen sind in der Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13:** Verwendete Selektivnährböden, Inkubationszeiten und untersuchte Verdünnungsstufen

Untersuchte Keime	Nährmedium	Inkubationsbedingungen		Verdünnungsstufen
Aerobe Gesamtkeimzahl	Plate-Count-Agar	24 h bei 37 °C	aerob	$10^{-3}$ bis $10^{-7}$
Anaerobe Gesamtkeimzahl	Columbia-Blutagar	48 h bei 37 °C	anaerob	$10^{-4}$ bis $10^{-8}$
Coliforme Keime	MacConkey Agar	24 h bei 37 °C	aerob	$10^{-4}$ bis $10^{-8}$

Bei der Auswertung wurden die Nährmediensektoren berücksichtigt, auf denen 5 bis 100 gut auszählbare Kolonien zu finden waren. Anhand der Formeln der Methodensammlung des §35 LMBG wurde mit der Anzahl der gezählten Kolonien das gewichtete Mittel bestimmt und diese Ergebnisse zur Basis 10 logarithmiert.

### **3.9.2 Bakterielle Metaboliten**

#### **3.9.2.1 D- und L-Laktat**

Die Messung des D- und L-Laktats in Digesta-Proben der Lokalisationen Magen, mittleres (D2) und distales (D3) Jejunumdrittel und Caecum wurde mit einem kommerziellen Laktat-Kit (R-Biopharm, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde je 1 g der aufgetauten Proben aliquotiert, mit 2 ml einer 1-molaren Perchlorsäure versetzt und homogenisiert. Danach wurden jeder Probe 200  $\mu$ l 4 N Kalilauge hinzugefügt, wieder homogenisiert und für 10 Minuten auf Eis gehalten. Die so aufgeschlossenen Proben wurden 10 Minuten bei 4 °C mit 400xg zentrifugiert. Von dem Überstand wurde 1 ml in ein 2-ml-Gefäß überführt und gleich weitergenutzt, der restliche Überstand wurde in einem 15-ml-Röhrchen gesammelt und bei minus 20 °C eingefroren.

Der Inhalt der 2-ml-Gefäße wurde mit 4 N Kalilauge auf einen pH-Wert zwischen 8 und 10 eingestellt und danach erneut 10 Minuten lang bei 4 °C mit 16200xg zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde als Probe für das Laktat-Kit genutzt.

Das Prinzip dieses Kits beruht darauf, dass das in der Probe vorhandene D-Laktat durch NAD in Gegenwart einer *D-Laktat-Dehydrogenase* zu Pyruvat oxidiert wird. Analog dazu erfolgt eine Oxidation von L-Laktat durch die *L-Laktat-Dehydrogenase*. Durch die Zugabe der *Glutamat-Pyruvat-Transaminase* in Anwesenheit von Glutamat werden diese Reaktionen auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben. Das NADH wird photometrisch bei 365 nm bestimmt, da sich das entstehende NADH proportional zur Ausgangsmenge des Laktats verhält.

Die photometrische Messung wurde mit dem Programm Swift quantification II (Biochrom 1999, Cambridge, UK) durchgeführt. Die verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

### 3.9.2.2 Ammonium

Es wurde der Gehalt der freien Ammoniumionen in der Digesta des Magens, D2, D3 und des Caecums bestimmt. Gemessen wurde mit einer ionenselektiven Elektrode (Mettler Toledo Electrode Mettler Toledo ISE Combination, AMMONIUM, Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland). Zur Erstellung einer Standardkurve wurde zuerst aus Ammoniumchlorid und destilliertem Wasser eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 5, 10, 50, 100, 500 und 1000 ppm Ammonium erzeugt. Aus den damit gemessenen Ergebnissen wurde eine Standardkurve angefertigt, mit deren Hilfe die Probenergebnisse später umgerechnet werden konnten.

Von den aufgetauten Digesta-Proben wurden je 0,5 g eingewogen, denen danach 500 µl destilliertes Wasser hinzugefügt wurde. Diese Proben wurden homogenisiert, zentrifugiert (10 Minuten bei 4 °C und 16200xg) und die Überstände in neue Probengefäße überführt, mit 9,5 ml destilliertem Wasser und 200 µl 0,9-molarer Aluminiumsulfatlösung versetzt und homogenisiert. Die so aufbereiteten Proben wurden danach mit der ionenselektiven Elektrode gemessen. Die gemessenen Angaben in mV ergaben anhand der ermittelten Standardkurve die ppm-Konzentrationen, die weiter in mmol Ammonium pro kg Digesta umgerechnet wurden. Die verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

### 3.9.2.3 Kurzkettige Fettsäuren

Die kurzkettigen Fettsäuren wurden mit Hilfe der Gaschromatographie bestimmt. Die Methode ist unter Punkt 3.11.2 beschrieben.

**Tabelle 14:** Für die Bestimmung von Laktat und Ammonium genutzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
15-ml-Röhrchen	Greiner Bio One	Frickenhausen, Deutschland
2-ml-Gefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Aluminiumsulfatlösung, 0,9 mol/l	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
D-Milchsäure(D-Laktat)/L- Milchsäure (L-Laktat), UV-Test	R-Biopharm	Darmstadt, Deutschland
Heraeus Fresco17 Microcentrifuge	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Heraeus®Megafuge®1.0R	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Mettler Toledo Electrode Mettler Toledo ISE Combination, AMMONIUM	Mettler Toledo GmbH	Gießen, Deutschland
1 N Perchlorsäure	Riedel-de-Häen GmbH	Selze, Deutschland
Photometer: Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech	Freiburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries	West Palm Beach, USA

### **3.9.3 Quantifizierung der Eubakterien, Laktobazillen und *Escherichia ssp.* der Magendigesta mittels der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion**

#### **3.9.3.1 Herstellung der DNA-Extrakte der Magendigesta für die Polymerase-Kettenreaktion**

##### **Extraktion der Gesamt-Nukleinsäuren aus der Digesta des Magens**

1 g der Magendigesta-Proben wurde eingewogen, zusammen mit 3 g sterilen, säuregewaschenen Glasperlen und 10 ml der 60 °C warmen GTC-Lösung (s. Anhang) vermischt und für 5 Minuten im 60 °C warmen Wasserbad unter mehrmaligem kurzen Schütteln inkubiert. Um die Zellen mechanisch aufzuschließen, wurden die Proben mit einer Frequenz von 2000/min für 2 Minuten in einer Schwingmühle geschüttelt. Nach kurzem Absenken der Feststoffe wurde der Überstand in Oakride-Zentrifugenröhrchen dekantiert. Der verbleibende Rest wurde wieder mit 7 ml GTC-Lösung versetzt, 5 Minuten im Wasserbad inkubiert, 2 Minuten geschüttelt und anschließend vollständig in das 50-ml-Oakride-Zentrifugenröhrchen überführt.

Um die Nukleinsäuren zu extrahieren, wurden 20 ml Phenol/Chloroform (Roti<sup>®</sup>Phenol, Fa. Roth, Karlsruhe) dem Zellysate hinzugefügt und kurz geschwenkt. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 4 °C und 15000xg wurden 15 ml der wässrigen Phase in ein neues steriles 50-ml-Oakride-Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden anschließend 15 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugefügt und leicht geschwenkt. Nach der Zentrifugation (5 Minuten, 4 °C, 15000xg) wurde die wässrige Phase in ein neues 50-ml-Oakride-Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Nukleinsäuren auszufällen, wurden 16 ml eiskaltes Isopropanol hinzugefügt und die Probe über Nacht bei minus 30 °C gelagert.

Die Abtrennung der Nukleinsäuren erfolgte durch eine Zentrifugation für 30 Minuten bei 4 °C und 18000xg. Der Überstand wurde abgegossen und das Zentrifugat mit 40 ml eiskaltem, 70 %igem Ethanol versetzt und erneut abzentrifugiert (30 Minuten, 4 °C, 18000xg). Nach vorsichtigem Abgießen des Überstandes und Ausdampfen des Zentrifugenröhrchens wurde das Zentrifugat in 1000 µl T1-Puffer (Lysispuffer) gelöst. Bis zur weiteren Aufbereitung wurden die Nukleinsäuren bei minus 30 °C aufbewahrt.

##### **DNA-Reinigung der Nukleinsäureextrakte**

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin<sup>®</sup> Tissue Kit (Fa. Macherey-Nagel, Düren, Deutschland). Es wurden 360 µl der Nukleinsäuren nach Anleitung des Herstellers mit *Proteinase K* und *RNAse* behandelt und die DNA über Silica-Matrix-Säulen gereinigt. Nach der Aufreinigung erhielt man ca. 150 µl DNA-Extrakt, der in sterilen 2-ml-Gefäßen bei minus 30 °C aufbewahrt wurde.

##### **Fluorometrische Quantifizierung der DNA-Konzentrationen**

Der DNA-Gehalt der extrahierten Proben wurde fluorometrisch bestimmt. Die Methode beruht auf der ausschließlichen Bindung eines Bisbenzimid-Fluoreszenzfarbstoffes (Hoechst 33258) an die doppelsträngige DNA einer Probe. Aus 1x TNE-Puffer (s. Anhang) und der Hoechst 33258-Färbung wurde eine Arbeitslösung hergestellt. 2 µl der DNA-Extrakte wurden mit 100 µl TE/Farbstoff-Verdünnung gemischt. Von dieser Mischung wurden 2 µl auf das

Fluorospektrometer aufgebracht und bei 450 nm fluorometrisch gemessen. Anhand einer vorher gemessenen Eichreihe wurde mit dem Programm NanoDrop ND 3300 2.5.0 die DNA-Menge des Extraktes ermittelt.

Die Geräte und Chemikalien, die für die DNA-Aufbereitung genutzt wurden, sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

**Tabelle 15:** Für die DNA-Aufbereitung genutzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
70 % Ethanol	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Bisbenzimid-Fluoreszenzfarbstoffes (Hoechst 33258)	BioRad	München, Deutschland
Chloroform/Phenol: Roti®Phenol	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Computerprogramm: NanoDrop ND 3300 2.5.0	NanoDrop Technologies	Wilmington ,USA
Gefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Glasperlen, 0,25 mm	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Isoamylalkohol	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol: 2-Propanol	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
NanoDrop® ND-3300	NanoDrop Technologies	Wilmington ,USA
NucleoSpin® Tissue Kit	Fa. Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Proteinase K	Fa. Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Ribonuklease A	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Schwingmühle MM 200	Retsch Technology	Haan, Deutschland
T1-Puffer	Fa. Macherey-Nagel	Düren, Deutschland
Trichlormethan/Chloroform	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge: Sorvall®RC 5B Plus	Kendro	Newton, USA

### 3.9.3.2 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

#### Prinzip der qPCR

Die quantitative oder auch „real time“ PCR (qPCR) beruht auf demselben Prinzip wie die herkömmliche PCR, d.h. es werden auch hier durch spezifische Primer festgelegte Nukleotidsequenzen vervielfältigt. Bei der qPCR ist darüber hinaus die Quantifizierung der gewonnenen DNA mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung möglich. Durch Fluoreszenzfarbstoffe, deren Fluoreszenz sich erst bei der Bildung des PCR-Produktes entfaltet, kann in jedem PCR-Zyklus auf die Menge des PCR-Produktes zurückgeschlossen werden. Aus den Fluoreszenzmessungen des gesamten PCR-Laufs ergibt sich eine sigmoidale Amplifikationskurve.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten qPCRs wurden sowohl der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green als auch TaqMan-Sonden eingesetzt. Bei SYBR Green handelt es sich um einen DNA-Farbstoff, der nach der Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) fluoresziert. Diese Methode wurde in dieser Arbeit für die Quantifizierung der Laktobazillen genutzt. Dagegen wurde die Quantifizierung der Eubakterien und der *Escherichia ssp.* mit TaqMan-Sonden durchgeführt. Diese Sonden haben am 5'-Ende einen sogenannten Quencher (Löschsubstanz) und am 3'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff, deren räumliche Nähe eine Unterdrückung der Fluoreszenzaktivität mit sich bringt. Durch den Einsatz einer *Taq-Polymerase*, die sowohl eine Polymeraseaktivität als auch eine 5'-3'-*Exonuklease*-Aktivität besitzt, wird während der

Synthese des Gegenstrangs der Quencher am 5'-Ende abgebaut. Dadurch werden Quencher und Fluoreszenzfarbstoff voneinander getrennt und der Farbstoff beginnt zu fluoreszieren.

#### Durchführung der quantitativen Echtzeit PCR

Die qPCR wurde mit dem Real-time PCR-Gerät Mx3000P qPCR System von Stratagen (Amsterdam, Niederlande) und dem MxPro QPCR-Programm (Stratagen, Amsterdam, Niederlande) ausgeführt. Für die quantitative Bestimmung der Eubakterien, Laktobazillen und *Escherichia ssp.* in der Digesta des Magens der Ferkel wurden die in Tabelle 16 aufgeführten Primer genutzt. Die hergestellten Magen-DNA-Proben wurden ohne weitere Verdünnung für die Real-Time-Reaktion eingesetzt. Dabei wurde 1 µl der untersuchten DNA-Probe mit den 25 µl der in Tabelle 17 aufgelisteten Reaktionskomponenten (Master Mix, Primer, ROX) in einem PCR-Gefäß zusammenpipettiert.

**Tabelle 16:** Für die qPCR genutzte Primer  
(nach Klär, 2008)

Detektierte Bakterien	Primer/Sonden	Primer-, SONDENSEQUENZ (5' → 3')	Produktgröße	Zielgene	Literatur
Eubakterien	785 (f) <sup>1</sup> 1512 (r) <sup>2</sup> T-1400 (r) <sup>3</sup>	GGA TTA GAT ACC CTG GTA GTC TAC CTT GTT ACG ACT T TGA CGG GCG GTG TGT ACA AGG C	727 bp	16S rDNA	Lyons <i>et al.</i> (2000)
Laktobazillen	Lac1 (f) Lac2 (r)	AGC AGT AGG GAA TCT TCC A ATT (CT)CA CCG CTA CAC ATG	340 bp	16s rDNA	Walter <i>et al.</i> (2001)
Escherichia	Enter0 (f) Enter0 (r) Enter0 FAM	GTT AAT ACC TTT GCT CAT TGA ACC AGG GTA TCT AAT CCT GTT CGT GCC AGC AGC CGC GGT A	340 bp	16S rDNA	Malinen <i>et al.</i> (2003)

<sup>1</sup> 785, 1512: Primer-Positionen bezogen auf die *E.coli*-Sequenz

<sup>2</sup> (f): Vorwärts-Primer, bindet an den (-)DNA-Strang; (r): Rückwärts-Primer, bindet an den (+)DNA-Strang

<sup>3</sup> Die Sonden hatten am 5'-Ende den Reporter-Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxy-Fluoreszein (6-FAM) und am 3'-Ende den Quencher 4-Dimethylaminophenylbenzoesäure

**Tabelle 17:** Reaktionskomponenten der qPCR-Ansätze

Reaktionsansatz mit SYBR Green I	Menge	Reaktionsansatz mit TaqMan-Hybridisierungs-sonde	Menge
Brilliant <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> GreenQPCR Master Mix	12,5 µl	HotStarTaq Master Mix	12,5 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl	Forward-Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Reverse-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl	Reverse-Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Referenzfarbstoff ROX (30 nM)	0,75 µl	Referenzfarbstoff ROX (30 nM)	0,75 µl
		Hybridisierungs-sonde (2 pmol/µl)	1,0 µl
Wasser (DNase, RNase frei)	10,75 µl	Wasser (DNase, RNase frei)	8,75 µl

Die qPCR-Analysen der Eubakterien, der Laktobazillen und der *Escherichia ssp.* wurden nach den in Tabelle 18 beschriebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Die Ziel-DNA wurde in allen Assays über 40 Zyklen amplifiziert. Als Quantifizierungsstandards wurden

DNA-Extrakte aus Referenzstämmen genutzt, die am Institut für Tierernährung hergestellt und getestet worden waren (s. Anhang).

Bei dem Reaktionsansatz mit SYBR Green, der in dieser Arbeit für die Quantifizierung der Laktobazillen genutzt wurde, wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalytik durchgeführt, um spezifisch und unspezifisch gebildete PCR-Produkte zu differenzieren. Da jede dsDNA (PCR-Produkt, Primer-Dimer) einen spezifischen Schmelzpunkt hat, wurde durch eine langsame Temperaturerhöhung, die im Anschluss an die qPCR erfolgt, die dsDNA zu spezifischen Zeitpunkten wieder denaturiert. Durch diese Denaturierung wurde das SYBR Green wieder freigegeben und es kam zu einem Fluoreszenzabfall, der detektiert wurde.

Die für die qPCR genutzten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 19 zusammengestellt.

**Tabelle 18:** Reaktionsbedingungen und PCR-Parameter

	Eubakterien		Laktobazillen		<i>Escherichia ssp.</i>	
Detektionssystem	TaqMan		SYBR Green		TaqMan	
Aktivierung	1x	95 °C/15 min.	1x	95 °C/15 min.	1x	95 °C/15 min.
Denaturierung	40x	95 °C/30 sec.	40 x	95 °C/30 sec.	40x	95 °C/30 sec.
Binden der Primer- moleküle		50 °C/60 sec.		55 °C/60 sec.		50 °C/60 sec.
Elongation der DNA- Fragmente		72 °C/30 sec.		72 °C/30 sec.		72 °C/30 sec.
Schmelzkurven- analytik		-		+		-

### Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit der Software MxPro QPCR (Stratagen, Amsterdam, Niederlande). Um die nach Abschluss des gesamten PCR-Zyklus erhaltenen Amplifikationskurven auf einen Zahlenwert zu reduzieren, wurde der  $C_T$ -Wert (cycle threshold value) genutzt. Dieser  $C_T$ -Wert entspricht dem Zyklus-Wert, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt und somit den Fluoreszenzschwellenwert (cycle threshold) überschreitet. Um die Bakterien in den Proben zu quantifizieren, wurden ihre  $C_T$ -Werte mit denen der eingesetzten Quantifizierungsstandards verglichen, aus deren  $C_T$ -Werten die Software MxPro zuvor eine Standardkurve gebildet hatte. Bei der Analyse der Laktobazillen, deren Reaktionsansatz mit SYBR Green durchgeführt wurde, wurde außerdem mittels Schmelzkurvenanalyse die Bildung von unspezifischen PCR-Produkten untersucht. Hierbei wurden die gemessenen Ergebnisse mit denen verglichen, die zuvor für die Laktobazillen am Institut für Tierernährung etabliert worden waren (Klär, 2008). Ergebnisse, die eine Abweichung des Schmelzpunktes von mehr als  $\pm 0,5$  °C hatten, wurden nicht ausgewertet und die Proben erneut analysiert.

Um die gemessenen Zellzahlen auf eine einheitliche DNA-Menge abzugleichen, wurden sie mit einem Faktor (DNA-Gehalt der Probe/ DNA-Gehalt der Probe mit dem höchsten DNA-Gehalt) multipliziert, zur Basis 10 logarithmiert und als Zellzahl pro g Digesta dargestellt.

**Tabelle 19:** Für die Durchführung der qPCR genutzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Brilliant <sup>®</sup> SYBR <sup>®</sup> GreenQPCR Master Mix	Stratagen	Amsterdam, Niederlande
Eppendorf Gefäße	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
HotStar Master Mix Kit	Stratagen	Amsterdam, Niederlande
Real Time PCR-Gefäße	Stratagen	Amsterdam, Niederlande
Real time QPCR System Mx3000P <sup>®</sup>	Stratagen	Amsterdam, Niederlande
Software MxPro QPCR.	Stratagen	Amsterdam, Niederlande
Spezies-spezifische Oligonukleotide	MWG-Biotech AG	Ebersberg, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries	West Palm Beach, USA

### **3.10 Gaschromatographische Analysen**

#### **3.10.1 Prinzip der Gaschromatographie**

Bei der Gaschromatographie handelt es sich um eine Trennmethode, die schon mit sehr geringen Mengen der zu untersuchenden Substanz auskommt (1 µl). Die Probe wird mit einer Mikroliter-Spritze in den Injektorblock eingespritzt und dort direkt verdampft. Meist wird nur ein kleiner Teil der eingespritzten Probe mit einem Trägergas (Helium oder Wasserstoff) auf die Trennsäule aufgebracht. Um diese kleinen Volumina reproduzierbar zu dosieren, kann der Gasstrom mit enthaltener Probe geteilt werden (Split). So wird nur ein Teil der Probe auf die Säule geleitet und der andere aus dem System herausgeschleust. Bei den Säulen handelt es sich um dünne Kapillaren aus Quarzglas, die mit einer selektiven Innenbeschichtung ausgekleidet sind. Der Innendurchmesser dieser Säulen liegt meist zwischen 0,53 und 0,25 mm, sodass die Schichtdicke, die zu der Trennung der einzelnen Bestandteile führt, nur wenige Mikrometer beträgt. Die unterschiedlichen Verbindungen der aufgebrachten Probe werden unterschiedlich von der Säule retiniert und somit aufgetrennt. Durch das Trägergas werden zuerst die kleineren, dann die mittleren und zuletzt die größeren Moleküle aus der Säule eluiert. Die verschiedenen Moleküle erreichen auf diese Weise nacheinander den am Ende der Säule gelegenen Detektor, wo sie in Abhängigkeit ihrer Menge ein Signal erzeugen. Es gibt verschiedene Detektoren, die eingesetzt werden können. Für die Bestimmung organischer Substanzen wird meist der Flammenionisationsdetektor genutzt, wobei die Leitfähigkeit einer Knallgasflamme (Brenngas ist Wasserstoff) zwischen zwei Elektroden gemessen wird. Die zu analysierenden Substanzen werden mit dem Trägergasstrom zur Flamme transportiert und dort ionisiert, wobei Elektronen frei werden. Diese Elektronen werden mit Hilfe eines Gitters, das um die Flamme angebracht ist, aufgefangen und senden ein Signal, welches als Peak im Chromatogramm sichtbar wird. Die Fläche unter einem Peak ist der Konzentration des Analyten in der Probe proportional. Das System wird mittels eingesetzter Standards für die qualitative und quantitative Auswertung geeicht. Die für die Gaschromatographie eingesetzten Geräte und Chemikalien sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

**Tabelle 20:** Für die gaschromatographischen Analysen genutzte Geräte und Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
2-Propanol	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
Gaschromatograph: Modell 6890N	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Gefriertrockner: Freeze Dryer Alpha 1-4	Fa.Christ	Osterode am Harz, Deutschland
n-Hexan	Carl Roth GmbH&Co.KG	Karlsruhe, Deutschland
n-Trimethylsulfoniumhydroxid	Macherey- Nagel GmbH&CoKG	Düren, Deutschland
Rüttler: Reax 2000	Heidolph Instruments GmbH&Co.KG,	Schwabach, Deutschland
Säule CP-SIL 88	Varian	Middelburg, Niederlande
Säule HP-INNOWax	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Screw cap vials, clear (Part No. 5182-0714)	Agilent Technologies	Waldbronn, Deutschland
Tridecanoic acid, $\geq 98\%$	Sigma Aldrich	Steinheim, Deutschland
Ultraschallbad: Sonorex Super nRK 106	Bandelin electronic GmbH&Co.KG	Berlin, Deutschland
Volatile Acid Standard Mix	Supelco	Bellefonte, USA
Vortex Genie2	Scientific Industries	West Palm Beach, USA
Zentrifuge: Centrifuge 5415 C	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland

### **3.10.2 Kurzkettige Fettsäuren in der Digesta**

Die Gehalte der kurzkettigen flüchtigen Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat und Valeriat) in der Digesta des Magens, D2, D3 und des Caecums wurden mit Hilfe eines Gaschromatographen der Firma Agilent Technologies und einem Flammenionisationsdetektor ermittelt. Hierfür wurde die Kapillarsäule HP-INNOWax (Länge: 30 m; Durchmesser: 530  $\mu\text{m}$ ) genutzt, wobei Wasserstoff als Trägergas diente.

Es wurden von den jeweiligen Digesta-Proben nach dem Auftauen ca. 300 mg eingewogen und mit 1 ml eines internen Standards, der 0,5 mmol/l Capronsäure (C6:0) enthielt, versetzt. Nach einstündigem Schütteln wurden die Proben für 8 Minuten bei Raumtemperatur mit 16200xg zentrifugiert. Von den Digesta-Proben des Magens wurden 500  $\mu\text{l}$  des Überstands mit 500  $\mu\text{l}$  des internen Standards versetzt, von den Jejunum- und Caecumdigesta-Proben wurden je 400  $\mu\text{l}$  des Überstandes mit 800  $\mu\text{l}$  internem Standard versetzt und erneut gut geschüttelt und anschließend gemessen.

Am GC wurden folgende Parameter eingestellt:

<u>Ofenprogramm</u>	Temperatur (°C):	70 (initial)	140	190
	Zeit (Minuten):	0,5	1,0	3,0
	°C/Minute:		150	120

Analysezeit 9,6 Minuten

<u>Injektortemperaturprogramm</u>	Temperatur (°C):	100 (initial)	150	250
	Zeit (Minuten):	0,02	0,5	2,0
	°C/Minute:		600	600

Splitverhältnis 1:1

### **3.10.3 Mittelkettige und langkettige Fettsäuren in der Digesta**

Die Bestimmung der Gehalte der mittel- und langkettigen Fettsäuren wurde in der Digesta der Lokalisationen Magen, D1, D2, D3 und Caecum durchgeführt. Die Digesta wurde zuerst gefriergetrocknet, dann wurden 70 bis 100 mg eingewogen. Nach Zusatz des internen Standards und Zugabe von 150 µl 0,5 molarer Salzsäure wurde dieses Gemisch in 1 ml Hexan-Isopropanol Gemisch (3:2) aufgenommen. Bei dem internen Standard handelte es sich um Tridecansäure (C13:0), welche in einem Hexan-Isopropanol-Gemisch (3:2) gelöst wurde. Nach kräftigem Schütteln kamen die Proben für 30 Minuten in den Rüttler. Danach wurde jede Probe kurz im Ultraschallbad behandelt und noch einmal kräftig homogenisiert. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 16200xg zentrifugiert und 100 µl des Überstands zusammen mit 50 µl n-Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) in die GC-Probengefäße überführt.

Die Messung der mittelkettigen Capryl- und Caprinsäure wurde wie die Messung der kurzkettigen Fettsäuren mit der Kapillarsäule HP-INNOWax (Länge: 30 m; Durchmesser: 530 µm) durchgeführt.

Am Gaschromatographen wurden folgende Parameter eingestellt:

<u>Ofenprogramm</u>	Temperatur (°C):	80 (initial)	100	190
	Zeit (Minuten):	0,5	1,0	4,0
	°C/Minute:		5	120

Analysezeit 10,25 Minuten

<u>Injektortemperaturprogramm</u>	Temperatur (°C):	150 (initial)	150
	Zeit (Minuten):	0,02	2,5
	°C/Minute:		600

Splitverhältnis 1:1

Für die Messung der langkettigen Fettsäuren (C12:0 bis C18:3) wurde die Kapillarsäule CP-SIL 88 (Länge: 50 m; Durchmesser: 250 µm, Schichtdicke: 0,20 µm) benutzt. Das Trägergas war auch hier Wasserstoff.

Am Gaschromatographen wurden folgende Parameter eingestellt:

<u>Ofenprogramm</u>	Temperatur (°C):	70 (initial)	180	220
	Zeit (Minuten):	5	16	43
	°C/Minute:		5	80

Analysezeit            46,5 Minuten

Injektortemperatur   130 °C

Splitverhältnis        10:1

### **3.11 Immunologische Parameter**

#### **3.11.1 Differentialblutbild und hämatologische Untersuchungen**

Im Laufe des gesamten Versuchs wurde den Ferkeln zweimal Blut abgenommen. Beim Einstellen wurde jedem Ferkel aus der Vena jugularis mit einer EDTA-Monovette (S-Monovette® 9 ml Kalium-EDTA, Sarstedt) Blut entnommen. Am Tötungstag wurde den anästhesierten Ferkeln kurz vor der Euthanasie mit EDTA- und Heparin-Monovetten intrakardial Blut entnommen. Das zu Beginn und am Ende des Versuchs entnommene EDTA-Blut wurde an ein externes Labor (LABOKLIN, Bad Kissingen) verschickt, um dort eine allgemeine hämatologische Untersuchung und eine Differentialblutbildanalyse durchführen zu lassen. Das Heparinblut wurde am Tötungstag für die Phänotypisierung, Proliferation und den Phagotest® eingesetzt.

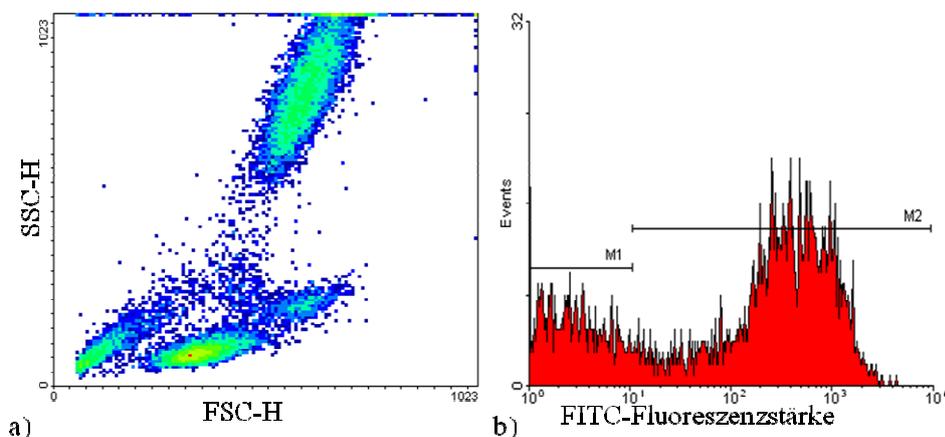
#### **3.11.2 Durchflusszytometrische Analytik**

##### 3.11.2.1 Prinzip der Durchflusszytometrie (FACS)

FACS steht für „Fluorescent-Activated Cell Sorting“ und ermöglicht das Zählen, die Differenzierung und das Sortieren von Fluoreszenz-markierten Zellen. Das Prinzip beruht darauf, dass die Zellen einer Probe einzeln in einer Flusskammer an einem Laserstrahl, der im rechten Winkel auf die Zellen trifft, vorbeigeführt werden. Das von den Zellen abgestrahlte Licht wird von Photodetektoren detektiert und von Photomultipliern verstärkt. Die gemessene Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (180°-Forward Scatter) ist das Maß für die Größe der Zellen. Die im 90°-Winkel gemessene Seitwärtsstreuung (Sideward Scatter) steht als Maß für die Granularität der Zellen. Darüber hinaus wird das emittierte Fluoreszenzsignal registriert, das durch die Anregung der Farbstoffmarkierung auf den Zellen durch den Laser entsteht.

Die Auswertung der gemessenen Daten erfolgte mit dem Computerprogramm CellQuest pro® (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA), wobei als Darstellungen das Streudiagramm (Density Plot) und das Histogramm gewählt wurden. Mit Hilfe des Streudiagramms können

einzelne Zellpopulationen anhand verschiedener Merkmale wie Morphologie (Abbildung 9) aber auch Bindung von Antikörpern (s. Abbildung 11b und 12b) von einander abgegrenzt und weiter untersucht werden. Das Histogramm wurde für die Auswertung der Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten genutzt.



**Abbildung 9:** Darstellungsformen, der in dieser Arbeit genutzten FACS-Datenauswertung

- Dargestellt ist die Größe der Zellen (Forward Scatter [FSC-H]) gegenüber der Granularität der Zellen (Sideward Scatter [SSC-H]) im Streudiagramm (Density Plot).
- Dargestellt ist die FITC-Fluoreszenzstärke der gezählten Fälle in einem Histogramm.

Das Verfahren der Durchflusszytometrie wurde für die Phänotypisierung der Immunzellen aus dem peripheren Blut und aus den Mesenteriallymphknoten sowie die Auswertung der Proliferation der Immunzellen des peripheren Blutes und des Phagotest<sup>®</sup> genutzt. Die verwendeten Geräte und Materialien sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

**Tabelle 21:** Für die durchflusszytometrischen Analysen benötigte Geräte und Materialien

Bezeichnung	Hersteller	Ort, Staat
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Bromdeoxyuridin	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments	Osterode, Deutschland
CellQuest pro <sup>®</sup>	Becton Dickinson Bioscience	San José, USA
Cellstar <sup>®</sup> 96-Well-Microplates	Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Inkubator:biocenter BC170	SalvisLab	Rotkreuz, Schweiz
Concanavalin A	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	Hamburg, Deutschland
DNase	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	Hamburg, Deutschland
Ethanol (96 %)	Fa. Roth	Karlsruhe, Deutschland
FACS Calibur <sup>®</sup>	Becton Dickinson Bioscience	San José, USA
FACS-Röhrchen	Falcon (Becton Dickinson)	Franklin Lake, USA
Heraeus <sup>®</sup> Megafuge <sup>®</sup> 1.0R	Thermo Scientific	Karlsruhe, Deutschland
Lipopolysaccharid O111	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG	Lauda-Königshofen, Deutschland
PBS	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
S-Monovette <sup>®</sup> 7,5ml Li-Heparinat	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Testkits Phagotest <sup>®</sup>	Orpegen Pharma	Heidelberg, Deutschland
Trypanblau, 0,5 %	Biochrom AG	Berlin, Deutschland

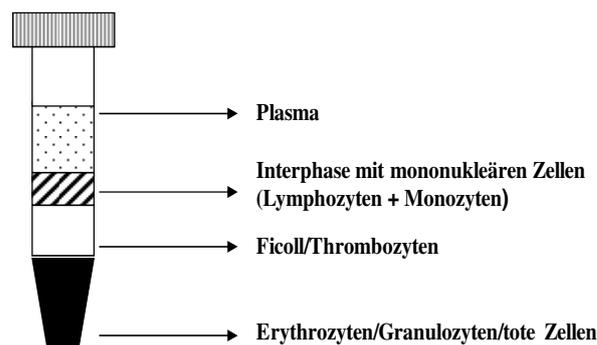
### 3.11.2.2 Isolierung der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut und den Mesenteriallymphknoten

#### Periphere mononukleäre Blutzellen

Die Isolierung der peripheren mononukleären Zellen erfolgte durch die Gradientenzentrifugation mittels Ficoll, einem synthetisch hergestellten Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin. Dafür wurde frisch entnommenes Heparinblut, nachdem es in PBS (engl.: phosphate buffered saline) 1:2 verdünnt worden war, auf das Ficoll geschichtet und für 30 Minuten bei 400xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Durch den Dichtegradienten kam es zu einer Phasentrennung der einzelnen Blutbestandteile (siehe Abbildung 10). Die leichten Erythrozyten werden aufgrund ihrer Aggregation mit den Granulozyten schwerer und lagern sich dementsprechend unten im Gefäß ab. Nach Überführung der gewonnenen Interphase in steriles, eiskaltes PBS und darauf folgendes zweimaliges Waschen in sterilem PBS mit Zentrifugation für 10 Minuten bei 4 °C und 300xg wurde nach der zweiten Zentrifugation der Überstand abgegossen und das Zentrifugat mit 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Zehn µl dieser Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau verdünnt. Mit 10 µl dieser Verdünnung wurde eine Neubauer Zählkammer beschickt, um die Anzahl der mononukleären Zellen zu bestimmen. Es wurden 16 Kleinstquadrate (Volumen 1 µl) ausgezählt und nach folgender Formel die Konzentration der mononukleären Zellen in 1 ml der Suspension ermittelt:

$$\text{Blutzellen in 1 ml Suspension} = \text{Gezählte Anzahl lebender Zellen} \times \text{Verdünnung in Trypanblau (10)} \times \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)} \times \text{Volumen der Zellsuspension (1 ml)}$$

Anhand der ermittelten Zellzahl der Suspension wurde durch Verdünnung mit sterilem Zellkulturmedium für die Phänotypisierung eine Zellsuspension mit der Konzentration  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml und für den Proliferationsassay eine Zellsuspension mit der Konzentration  $4 \times 10^6$  Zellen pro ml hergestellt und bis zur Färbung auf Eis gelagert.



**Abbildung 10:** Phasentrennung nach der Gradientenzentrifugation mit Ficoll

#### Mononukleäre Zellen der Mesenteriallymphknoten

Um die mononukleären Zellen aus den Mesenteriallymphknoten zu isolieren, wurden die nach der Entnahme in eiskaltem PBS gelagerten Mesenteriallymphknoten von der Serosa befreit und mit einem Skalpell fein zerkleinert. Die zerkleinerten Lymphknoten wurden zweimal durch feine Siebe (Maschenweite 0,6 mm und 0,4 mm) gedrückt und mit PBS gespült. Anschließend wurde diese Mischung durch Baumwollwatte filtriert. Die Zellen wurden

abzentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 300xg) und das Zentrifugat in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Da keine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll durchgeführt wurde, wurden mit dieser Aufarbeitung auch Granulozyten isoliert. Die Konzentration der weißen Blutzellen wurde wieder mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Da mit den weißen Blutzellen der Mesenteriallymphknoten nur die Phänotypisierung durchgeführt wurde, konnte die gesamte Suspension auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt werden.

### 3.11.2.3 Phänotypisierung der peripheren mononukleären Zellen und der mononukleären Zellen der Mesenteriallymphknoten

#### Prinzip der Phänotypisierung mononukleärer Zellen

Die mononukleären Zellen tragen populationspezifische Zelloberflächenproteine (Cluster of differentiation, CD). An diese CD-Moleküle binden spezifische primäre Antikörper (monoklonale Antikörper, mAK), die wiederum durch einen sekundären Antikörper, der einen fluoreszierenden Farbstoff trägt, markiert werden. Es wurden hier die Farbstoffe Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) eingesetzt, da sie bei der Anregung mit der gleichen Wellenlänge (488 nm) in verschiedenen Wellenlängenbereichen emittieren. FITC ergibt eine Grünfluoreszenz im Wellenlängenbereich von 500 bis 570 nm, wogegen PE eine Rotfluoreszenz im Wellenlängenbereich von 570 bis 600 nm emittiert. Dadurch ist es möglich, diese zwei Farbstoffe gleichzeitig mit Hilfe des Durchflusszytometers zu messen.

#### Durchführung der Phänotypisierung

Von den auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellten, eiskalten Suspensionen, die aus dem Blut und den Mesenteriallymphknoten gewonnen worden waren, wurden je 100 µl mit 50 µl einer verdünnten Antikörpersuspension (siehe Tabelle 22) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Probenröhrchen mit 2 ml FACS-Puffer (s. Anhang) aufgefüllt und zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 400xg). Der Überstand wurde abgegossen, den Proben wurden 50 µl des passenden sekundären Antikörpers hinzugefügt (siehe Tabelle 23) und sie wurden für weitere 30 Minuten auf Eis unter Lichtabschluss inkubiert. Den Proben wurden wieder 2 ml FACS-Puffer zugefügt, danach wurde zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 400xg) und der Überstand abgenommen. Das verbleibende Zentrifugat wurde in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Messung, die mit dem Gerät FACS Calibur<sup>®</sup> (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) durchgeführt wurde, lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt.

**Tabelle 22:** Verwendete primäre Antikörper

Primäre Antikörper	Isotyp	Hersteller	Verdünnung	Sekundärer Antikörper
FITC Mouse Anti-Pig CD4a	IgG2b	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA	1:100	Anti-Mouse IgG2b FITC (Gekoppelt an primären AK)
Mouse Anti-Pig CD8	IgG2a	Institut für Immunologie, VU Wien	1:10	Anti-Mouse IgG2a PE
Mouse Anti-Human CD21	IgG1	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA	1:200	Anti-Mouse IgG1 PE
Mouse Anti-Pig MHC class II (MSA3)	IgG2a	Veterinary medical research and Development (VMRD), Inc., Pullman, USA	1:200	Anti-Mouse IgG2a FITC

CD = cluster of differentiation

**Tabelle 23:** Verwendete sekundäre Antikörper

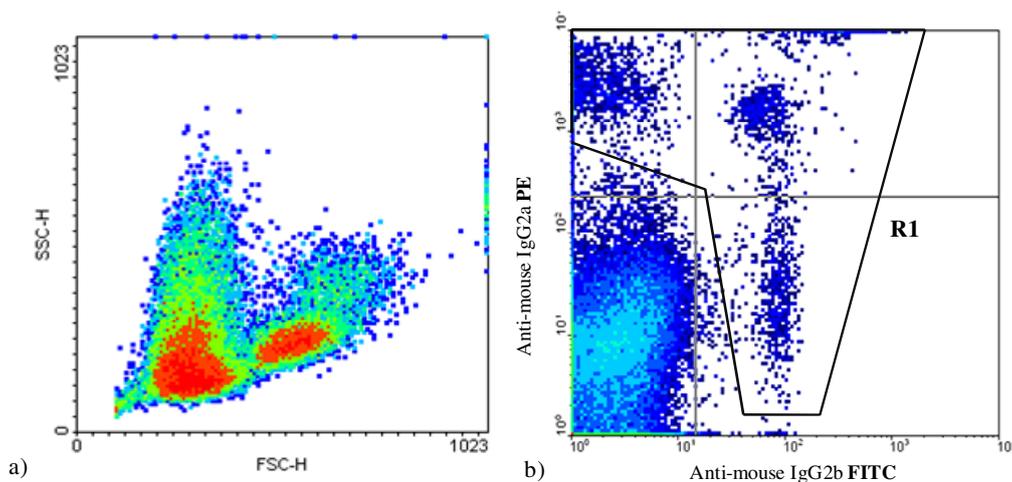
Sekundärer Antikörper	Hersteller	Farbstoff	Verdünnung
Anti-Mouse IgG2aPE	Southern Biotechnology Ass., Birmingham, USA	Phycoerythrin (PE)	1:100
Anti-Mouse IgG1 PE	Southern Biotechnology Ass., Birmingham, USA	Phycoerythrin (PE)	1:200
Anti-Mouse IgG2a FITC	Southern Biotechnology Ass., Birmingham, USA	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	1:50

### Auswertung der Phänotypisierung

Bei der durchflusszytometrischen Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogramms CellQuest pro<sup>®</sup> (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) der prozentuale Anteil der Zellen, die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> (T-Helferzellen), CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen), CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (aktivierter T-Helferzellen) sind, bestimmt. Außerdem wurde auch der prozentuale Anteil der MHC II<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup> (antigenpräsentierende Zellen), der MHC II<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup> (reife B-Lymphozyten und folliculäre dendritische Zellen) und der MHC II<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>-Zellen (reife B-Lymphozyten) an der Gesamtpopulation der mononukleären Zellen bestimmt.

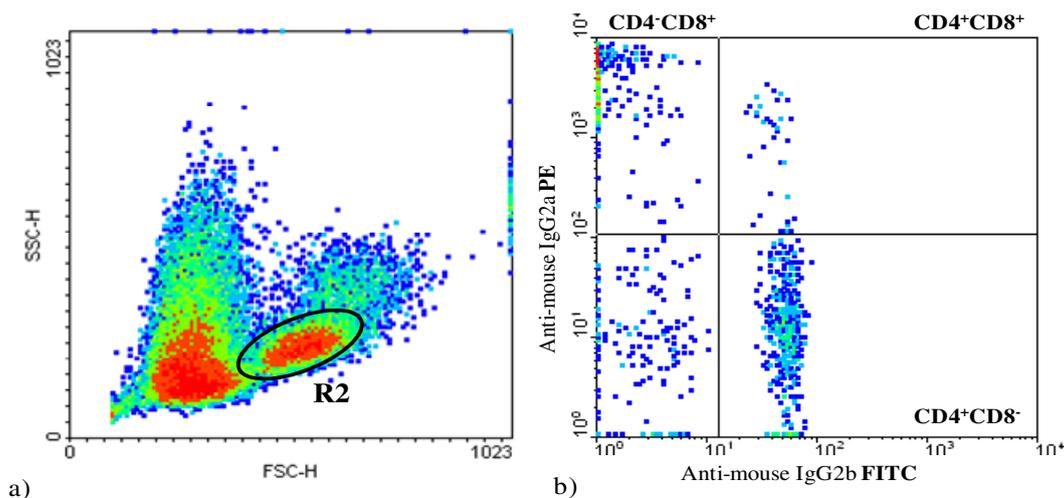
Dafür wurden zuerst die morphologischen Parameter Größe (dargestellt im Forward Scatter, FSC-H) und Granularität (dargestellt im Sideward Scatter, SSC-H) gegeneinander aufgetragen, um anhand der sich ergebenden Punktwolken die Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Zellreste (Debris) zu differenzieren (Abbildung 11a). Bei den untersuchten Proben war diese Art der Differenzierung jedoch nicht immer eindeutig, was möglicherweise durch die Aufarbeitung mit Ficoll verursacht worden war, sodass für die genauere Differenzierung die beiden Färbungen (PE und FITC) in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen wurden. Nachdem die im Beispiel mit den Zell-Markern CD4 und CD8 fluoreszenzmarkierten Zellen in einer Region (R1) zusammengefasst worden waren

(Abbildung 11b), wurde diese Region in das Diagramm Größe/Granularität übertragen und über den so durch T- und NK-Zellen markierten Zellbereich eine zweite Region gelegt (R2, Abbildung 12a). Diese Region zeigte den Bereich im Diagramm an, in dem sich Lymphozyten und NK-Zellen anhand ihrer morphologischen Ausprägung auffinden lassen. Sie diente so als Grundlage für die weitere Auswertung, nachdem die Darstellung aller Zellen wieder zugelassen worden war. Die Zellpopulation aus R2 wurde in das Diagramm PE gegen FITC eingefügt, um durch die Bildung von Quadranten den relativen Anteil an PE-positiven, FITC-positiven und PE und FITC-doppelt positiven Zellen zu ermitteln (Abbildung 12b).



**Abbildung 11:** Zweiparameterdarstellung der gewonnenen weißen Blutzellen im Density Plot am Beispiel von CD4- und CD8-markierten T-Lymphozyten und NK-Zellen

- a) Morphologische Darstellung der gewonnenen weißen Blutzellen anhand der Zellgröße (Forward Scatter [FSC-H]) und der Granularität (Sideward Scatter [SSC-H]). Aufgrund fließender Übergänge war mittels dieser Darstellung keine klare Zuordnung der einzelnen Zellpopulationen möglich.
- b) Anteil der fluoreszenzpositiven Zellen der Gesamtpopulationen: Der anti-CD4-Antikörper war mit FITC gekoppelt und der anti-CD8-Antikörper war mit PE markiert, sodass im Quadrant unten rechts die naiven T-Helferzellen ( $CD4^+CD8^-$ ), im Quadrant oben links die zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen ( $CD4^-CD8^+$ ) und im Quadrant oben rechts die Gedächtnis-T-Helferzellen ( $CD4^+CD8^+$ ) Zellen zu finden waren. Auf den Bereich aller fluoreszenzmarkierter Zellen wurde eine Region (R1) gelegt, um im Forward/Sideward Scatter-Diagramm die Lymphozyten und NK-Zellen genauer erkennen zu können, die für die endgültigen Ergebnisse als Grundlage dienen.



**Abbildung 12:** Zweiparameterdarstellung im Density Plot nach Festlegung einer Region um die Lymphozyten am Beispiel von CD4- und CD8-markierten T-Lymphozyten und NK-Zellen

- a) Es wurde eine Region (R2) um die Punkte gelegt, die aufgrund der Fluoreszenzmarkierung im PE/FITC-Diagramm als Lymphozyten identifiziert worden waren. Dafür wurden im Forward/Sideward Scatter-Diagramm zuerst nur die Zellen zugelassen, die in Region 1 (Abbildung 11b) zusammengefasst wurden. Um diese Zellen wurde eine neue Region gelegt (R2) und danach die Darstellung aller gemessenen Zellen wieder zugelassen.
- b) In diesem PE/FITC-Diagramm wurden nur die Zellen aus Region 2 zugelassen und mit Hilfe der Quadranten der prozentualen Anteile der naiven T-Helferzellen ( $CD4^+CD8^-$ ), der zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen ( $CD4^-CD8^+$ ) und der Gedächtnis-T-Helferzellen ( $CD4^+CD8^+$ ) bestimmt.

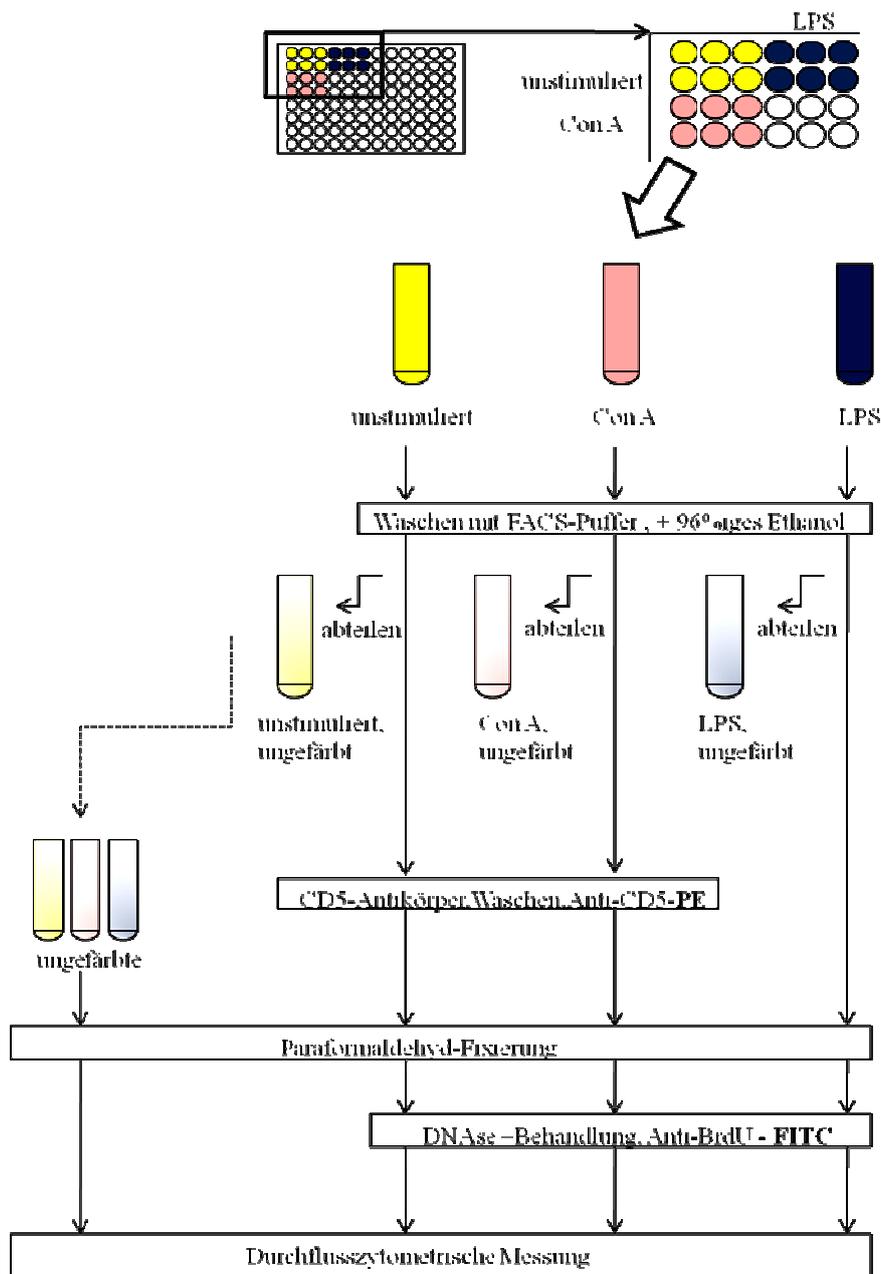
Die Auswertung der Anteile an MHC II- und CD21-positiven Zellen erfolgte in gleicher Weise wie die der CD4- und CD8-positiven Zellen.

### 3.11.2.4 Lymphozytenproliferation

#### Prinzip der Lymphozytenproliferation mononukleärer Zellen

Die mononukleären Zellen des peripheren Bluts wurden mit Mitogenen stimuliert, um eine Proliferation dieser Zellen zu bewirken. In der vorliegenden Arbeit wurden Concanavalin A (Con A) und das Lipopolysaccharid O111 (LPS) als Mitogene genutzt. Durch die Zugabe des Thymidin-Analogons Bromdeoxyuridin (BrdU), das sich in die neu synthetisierte DNA der proliferierenden Zellen anstelle des Thymidins einbaut, kann durch die Anlagerung von markierten Antikörpern an das BrdU der Anteil der neugebildeten Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Für eine nähere Spezifizierung der mit Con A stimulierten Lymphozyten wurde ein CD5-Antikörper eingesetzt, der hauptsächlich T-Zellen und in einem geringen Maße B-Zellen markiert (Appleyard und Wilkie, 1998).

Durchführung der Lymphozytenproliferation



**Abbildung 13:** Verlaufsschema des Lymphozytenproliferationstests

Der Ablauf der Lymphozytenproliferation-Methode ist in Abbildung 13 schematisch zusammengefasst. Zu Beginn wurden von der auf  $4 \times 10^6$  Zellen pro ml eingestellten Suspension der mononukleären Blutzellen je 100  $\mu$ l in die Vertiefung einer 96-Vertiefungsplatte pipettiert. Von den vorverdünnten Mitogenen wurden jeweils 25  $\mu$ l/Vertiefung hinzugefügt, sodass für Con A eine Endkonzentration von 5  $\mu$ g/ml und für LPS eine Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml in jeder Vertiefung erreicht wurde. Als Negativkontrolle wurden 25  $\mu$ l/Vertiefung Zellkulturmedium verwendet. Je nach Zellausbeute wurden pro Tier bis zu 6 Vertiefungen je Mitogen bzw. Kontrolle angesetzt. Nach 48 Stunden Inkubation im CO<sub>2</sub>-Brutschrank wurde BrdU (Endkonzentration 60  $\mu$ M/Well) zugefügt und für weitere 24 Stunden inkubiert.

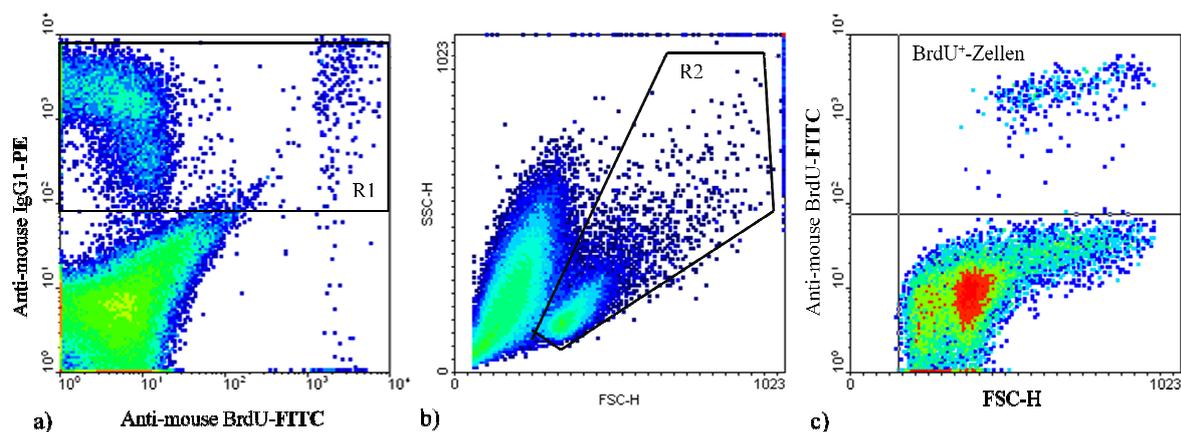
Die jeweiligen Ansätze wurden nach der Inkubation in ein FACS-Röhrchen überführt, mit 2 ml FACS-Puffer (s. Anhang) aufgefüllt und zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 300xg). Nach dem Abgießen des Überstandes wurde bei gleichzeitigem Vortexen tropfenweise 1 ml eiskaltes 96 %iges Ethanol hinzugefügt. Danach wurden die Röhrchen für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 2 ml FACS-Puffer wurde jeder Ansatz jeweils in zwei gleiche Teile aufgeteilt. Der eine Teil wurde nicht mit Farbstoffen behandelt („ungefärbte“), der andere Teil wurde mit Fluoreszenzfarbstoffen behandelt („FITC bzw. PE gefärbte“). Hiermit sollte eine mögliche unspezifische Fluoreszenz, die in den ungefärbten Proben zu sehen wäre, ausgeschlossen werden. Alle Röhrchen wurden für 10 Minuten bei 4 °C und 400xg zentrifugiert, der Überstand verworfen und die „ungefärbten“ sowie die „LPS-stimulierten (gefärbt)“ mit 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und auf Eis gestellt. Inzwischen wurden den „Con A-stimulierten (gefärbt)“ und „unstimulierten (gefärbt)“ 100 µl CD5-Antikörper beigefügt und für 30 Minuten inkubiert. Nach der Waschung mit 2 ml FACS-Puffer, einer Zentrifugation (5 Minuten, 4 °C, 300xg) und Abgießen des Überstandes wurden diesen Proben 50 µl des sekundären Antikörpers mit PE-Färbung hinzugefügt und die Proben wurden erneut für 30 Minuten unter Lichtschutz inkubiert. Diese wurden wieder gewaschen und mit 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Ab diesem Schritt wurden die zurückgestellten Proben wieder mitbehandelt. Nach Zentrifugation (5 Minuten, 4 °C, 300xg) und Abgießen des Überstandes wurde das Zentrifugat der Proben mit 500 µl einer Fixierlösung (Paraformaldehyd, s. Anhang) resuspendiert, für 10 Minuten eisgekühlt und unter Lichtschutz inkubiert. Nach einer erneuten Waschung wurde den „ungefärbten“ Proben 400 µl FACS-Puffer zugefügt. Diese konnten dann bis zur Messung zurückgestellt werden. Die anderen Röhrchen wurden mit 500 µl einer DNase-Verdünnung (DNase 10 mg/ml 1:10 verdünnt in DNase-Puffer s. Anhang) resuspendiert und abgedeckt für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank belassen. Durch die DNase wurde die DNA der Proben verdaut, sodass sie nach der Inkubation in Form von Mono- und Oligonukleotiden vorlag. Danach wurden die Proben gewaschen, die Zentrifugate mit 50 µl FITC-konjugiertem anti-BrdU-Antikörper, der zur Markierung des eingelagerte BrdU der frei vorliegenden Nukleotide eingesetzt wurde, resuspendiert und 30 Minuten auf Eis unter Lichtschutz inkubiert. Nach einer letzten Waschung wurden die Pellets in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen und bis zur durchflusszytometrischen Messung lichtgeschützt auf Eis belassen. Die eingesetzten mAk sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

**Tabelle 24:** Für die Lymphozytenproliferation verwendete Antikörper

Antikörper		Hersteller	Farbstoff	Verdünnung
Primärer	Anti-Pig CD5	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA	-	1:100
Sekundärer	Anti-Mouse IgG1 PE	Southern Biotechnology Ass., Birmingham, USA	Phycoerythrin (PE)	1:100
	Mouse anti- BrdU FITC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	1:5

Auswertung der Lymphozytenproliferation

Für die Auswertung der Lymphozytenproliferation wurde das Computerprogramm CellQuest pro<sup>®</sup> (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) genutzt. Bei der Untersuchung der durch Con A stimulierten T-Lymphozyten wurde die Oberfläche der T-Lymphozyten und eines geringen Anteils B-Lymphozyten zusätzlich mit einem CD5-Antikörper markiert. Die so markierten Lymphozyten wurden im ersten Schritt im PE/FITC-Diagramm in einer Region (R1) zusammengefasst (Abbildung 14a), die Zellen dieser Region wurden in einem Größe (FSC-H)/Granularität (SSC-H)-Diagramm abgebildet und mit einer Region (R2) zusammengefasst (Abbildung 14b). Daraufhin wurden im selben Diagramm wieder alle Zellen zugelassen, um alle Zellen, die morphologisch in die Region 2 fielen, mit einzubeziehen. Im letzten Schritt wurden die Zellen der Region 2 in ein Größe (FSC-H)/FITC-Diagramm übertragen und der Anteil der BrdU-enthaltenden Zellen (FITC-positiv) ermittelt (Abbildung 14c). Für die mit LPS O 111-stimulierten Zellen wurde in ähnlicher Weise vorgegangen, jedoch fehlte eine Oberflächenmarkierung der Zellen, sodass die Eingrenzung der zu untersuchenden Zellen rein nach morphologischen Gesichtspunkten stattfand.



**Abbildung 14:** Zweiparameterdarstellung im Density Plot der mit Con A-stimulierten peripheren mononukleären Blutzellen

- a) Im FITC/PE-Diagramm wurde eine Region (R1) um die CD5-positiven Zellen, die hauptsächlich den T-Lymphozyten und ca. 10 bis 30 % der B-Lymphozyten (Appleyard und Wilkie, 1998) entsprechen, gelegt.
- b) Mit Hilfe der Region 1 (R1) wurde im FCS-H/SSC-H die Lage der T- (und B-) Lymphozyten ermittelt und die Region 2 (R2) festgelegt, die alle Zellen erfasst, die morphologisch (nach Größe und Granularität) den T- (und B-) Lymphozyten entsprechen.
- c) Die Zellen der Region 2 (R2) wurden in ein FSC-H/FITC-Diagramm übertragen, um mittels der Quadrantenbildung den Anteil der BrdU-positiven Zellen zu ermitteln.

Dargestellt wurde die Stimulation in Form eines Stimulationsindex SI, der nach folgender Formel errechnet wurde:

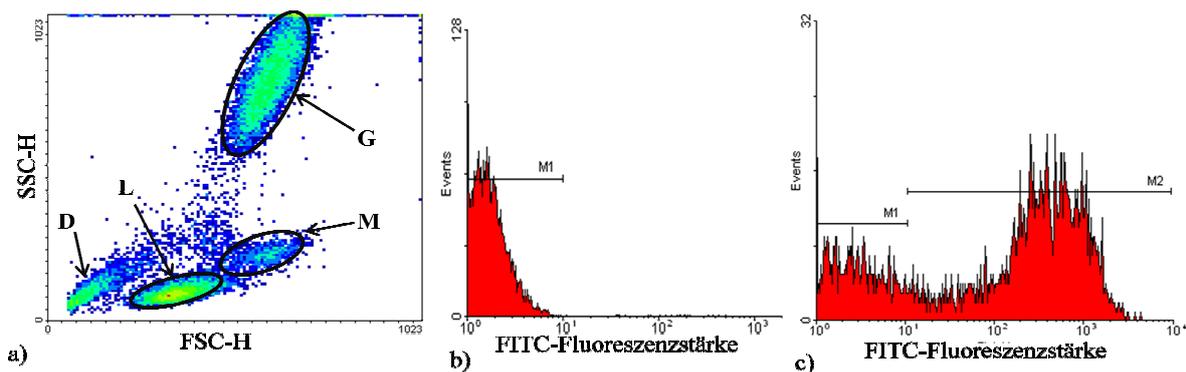
$$SI = \frac{\% \text{ proliferierter Zellen (mit Mitogenbehandlung)}}{\% \text{ proliferierter Zellen (ohne Mitogenbehandlung)}}$$

### 3.11.2.5 Phagozytoseaktivität von Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut

Die Untersuchung der Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten wurde mittels des Testkits Phagotest<sup>®</sup> (Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Als Probenmaterial wurde heparinisierendes Vollblut genutzt. Pro Tier wurden je 3 Ansätze zu je 100 µl Vollblut bereitgestellt, wobei ein Ansatz als Negativkontrolle fungierte. Auf diese Blutproben wurde 20 µl eisgekühlte, FITC-markierte *E. coli*-Suspension gegeben und gut durchmischt. Während die Negativkontrolle auf Eis gehalten wurde, wurden die beiden Testansätze für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Um die Phagozytoseaktivität zu stoppen, wurde allen Ansätzen 100 µl eisgekühlte Quenchlösung zugegeben. Danach wurden die Ansätze zweimal nacheinander mit einer eiskalten Waschlösung behandelt, zentrifugiert (5 Minuten, 4 °C, 250xg) und der Überstand dekantiert. Um die in den Proben vorhandenen Erythrozyten zu entfernen, wurde den Proben eine Lyselösung zugefügt und 20 Minuten inkubiert. Nach erneutem Waschen und Abzentrifugieren (5 Minuten, 4 °C, 250xg) wurden den Proben 200 µl einer DNA-Färbelösung zugegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben durchflusszytometrisch gemessen.

#### Auswertung der Phagozytoseaktivität

Auch die Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten wurde mit dem Computerprogramm CellQuest pro<sup>®</sup> (Becton Dickinson Bioscience, San José, USA) ausgewertet. Dafür wurden zuerst anhand der Größe (FSC-H) und Granularität (SSC-H) die Bereiche der Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und der Zellreste (Debris) differenziert (Abbildung 15a). Anschließend wurden die Regionen der Granulozyten und der Monozyten festgelegt und einzeln in einem Histogramm (FITC<sup>+</sup>Fälle/Anzahl der gezählten Fälle) analysiert. Da die Kontrollproben, die bei 4 °C statt 37 °C mit den FITC-markierten *E. coli* inkubiert wurden, immer eine gewisse FITC-Fluoreszenz aufwiesen, wurden zunächst die Histogramme für die Kontrollproben gebildet und eine Markierung (M1) über deren Fluoreszenz gesetzt, von der angenommen wurde, dass sie nicht durch Phagozytose verursacht wurde (Abbildung 15b). Bei der Analyse der Testansätze wurde eine darüber liegende zweite Markierung (M2) festgelegt, die den Bereich der stärkeren Fluoreszenzintensität umfasst, die als Phagozytoseaktivität gewertet wurde (Abbildung 15c). Mittels dieser Auswertung wurde sowohl der prozentuale Anteil der phagozytierenden Zellen bestimmt als auch die mittlere Fluoreszenz, die die Anzahl der aufgenommenen Bakterien pro Leukozyt widerspiegelt.



**Abbildung 15:** Zweiparameterdarstellung im Density Plot (a) und im Histogramm (b, c) zur Beurteilung der Phagozytoseaktivität der Granulozyten und Monozyten

- Anhand der morphologischen Eigenschaften der weißen Blutzellen wurden die Granulozyten (G), Monozyten (M), Lymphozyten (L) und die Zelltrümmer (Debris, D) differenziert. Die Regionen der Granulozyten und der Monozyten wurden weiter für die Analysen im Histogramm genutzt.
- In dem Histogramm wurde die FITC-Fluoreszenzstärke gegen die Anzahl der gezählten Zellen einer Kontrollprobe, die bei 4 °C inkubiert wurde, aufgetragen. Mit M1 wurde der Bereich festgelegt, bis zu welcher Fluoreszenzstärke noch nicht von einer phagozytosebedingten Fluoreszenz ausgegangen wurde.
- Das Histogramm (FITC-Fluoreszenzstärke/Anzahl der gezählten Fälle [Events]) zeigt die Ergebnisse einer Versuchssprobe, die bei 37 °C inkubiert wurde. Die Phagozyten wurden in M2 zusammengefasst.

### 3.11.3 Messung der mRNA der Zytokine MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und MCP1 im Ileumgewebe

Die Messung der Zytokine MIP1 $\beta$  (engl. macrophage inflammatory protein 1-beta), IFN $\gamma$  (Interferon gamma), IL1 $\beta$  (Interleukin beta), TNF $\alpha$  (Tumornekrosefaktor alpha) und MCP1 (engl. monocyte chemoattractant protein) wurde von dem Institut für experimentelle Endokrinologie der Charité Berlin durchgeführt. Die Messung erfolgte auf der Ebene der mRNA mit Hilfe der quantitativen Real-Time-Polymerasekettenreaktion (qPCR).

Hierfür wurden die im zweiten Versuchsdurchgang entnommenen Ileumgewebestücke bei minus 80 °C tiefgefroren. Die Gewebestücke wurden daraufhin in einer Kugelmühle im gefrorenen Zustand zerkleinert und homogenisiert. Aus dem homogenen Gewebepulver wurde die Gesamt-RNA isoliert (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion; Trifast). 1  $\mu$ g RNA wurde mittels reverser Transkription (RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) in cDNA (engl. complementary DNA) umgeschrieben und anschließend nach entsprechender Verdünnung (1:10) in die qPCR-Reaktion eingesetzt. Für die Auswertung der resultierenden C<sub>T</sub>-Werte (s. Kapitel 3.9.3.2) kam die Software REST (engl. relative expression software tool) zur Anwendung (Pfaffl et al., 2002). Ermittelt wurden die relativen Transkriptregulationen der gezeigten Gene jeweils in Bezug auf die Kontrollgruppe. Die Ergebnisse wurden auf das housekeeping-gene *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) normalisiert. Sämtliche für die qPCR verwendeten Primer wurden nach einem festen Schema erstellt. Die Referenzsequenzen wurden aus der US-amerikanischen Genbank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) kopiert und in das Online-Tool Primer3 (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) kopiert. Unter den Algorithmus-Spezifikationen wurde eine optimale Fragmentlänge von 100-300 bp sowie eine

optimale Schmelztemperatur von 58 °C und eine optimale Primerlänge von 22 bp gewählt. Diese Primersequenzen sind in der Tabelle 25 dargestellt.

**Tabelle 25:** Primersequenzen zur Bestimmung der mRNA der Zytokine MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und MCP1

Zytokin	Fw-Primer	Rev-Primer	Produkt	NCBI AC
<b>MIP1<math>\beta</math></b>	AGCAAGACCATGAAGCTCTG	GCTGCTGGTTCATAGTAATCAG	177 bp	NM_213779
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	ATGTACCTAATGGTGGACCTCTT	CTACCGGAATTTTAATCAGCTTT	240 bp	NM_213948
<b>IL1<math>\beta</math></b>	GGGAAAGAATCTGTACCTGTCTT	TCGAATCAACTCTGTTCTTGAT	150 bp	NM_214055
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	CATCGTCTCAAACCTCAGATAAG	ACCTGGGAGTAGATGAGGTACAG	175 bp	NM_214022
<b>MCP1</b>	CCTAAAGAAGCAGTGATCTTCAA	GAGGGTATTTAGGGCAAGTTAGA	191 bp	NM_214214

Fw = forward (vorwärts), Rev = reverse (rückwärts)

### **3.12 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Es wurde das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung als Maß für die Streuung berechnet. Für einige Daten wurde aufgrund einer sehr hohen Streuung der Median, das Minimum und Maximum ermittelt. Die Daten wurden mit Hilfe des Kolmogorow-Smirnow-Test (mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors) auf Normalverteilung überprüft. Bei normalverteilten Daten wurde eine Varianzanalyse (engl. analysis of variance [ANOVA]) durchgeführt und als Post-Hoc-Test der Bonferroni-Test angewandt. Die immunologischen Parameter wurden mit dem Mann-Whitney-Test ausgewertet, da sie nicht normalverteilt waren.

Die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) wurde mit  $p \leq 0,01$  als hoch signifikant,  $p \leq 0,05$  als signifikant und mit  $p \leq 0,10$  als tendenziell angesehen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Leistungsparameter**

#### **4.1.1 Gesundheitsbeurteilung**

Es wurden während beiden Versuchsdurchläufen keine gravierenden gesundheitlichen Auffälligkeiten und kein Durchfall bei den Ferkeln beobachtet.

##### Versuchsreihe 1:

Beim ersten Versuchsdurchgang musste den Ferkeln einer Untergruppe der Kontrollgruppe A das Futter am zweiten Tag in feuchter Form angeboten werden, da sie das geschrotete Trockenfutter nicht annahmen. Ab dem dritten Versuchstag nahmen sie es schließlich eigenständig auf. Diese Ferkel blieben im Vergleich zu den anderen Ferkeln der Kontrollgruppe während der gesamten Versuchszeit in ihrer Lebendmasseentwicklung geringfügig, jedoch nicht signifikant, zurück. Insgesamt zeigte sich in der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchsverlauf eine große Streuung der Lebendmasse. Sowohl in der mit den freien mkFs gefütterten Versuchsgruppe B als auch in der Versuchsgruppe C, der die gecoateten mkFs zugeführt wurde, waren keine Auffälligkeiten während der ersten Versuchsreihe zu bemerken. Nur die Streuung der Lebendmasse war numerisch geringer als in der Kontrollgruppe.

##### Versuchsreihe 2:

Es gab erneut in einer der Untergruppen der Kontrollgruppe am ersten Tag Probleme mit der Futteraufnahme. Diese Ferkel wurden daher zunächst mit angefeuchtetem Futter zur Futteraufnahme animiert. Ab dem zweiten Tag nahmen sie das Futter in trockener, geschroteter Form selbst auf. Auch hier war in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Versuchsgruppen eine deutlichere Inhomogenität der Lebendmassen festzustellen. In der Gruppe B war über den gesamten Zeitraum des Versuches ein Ferkel auffällig, das schon mit dem geringsten Einstallgewicht in die Gruppe kam. Dieses Ferkel machte in den ersten Tagen einen dehydrierten Eindruck und hatte Untertemperatur. Der Zustand verbesserte sich zwar täglich, aber es konnte während der Versuchslaufzeit das Entwicklungsdefizit nicht ausgleichen.

Da neben den beschriebenen Besonderheiten in beiden Versuchsreihen keine weiteren Auffälligkeiten und Gruppenunterschiede anhand der Bewertungskriterien erfasst wurden, werden die Daten hier nicht dargestellt.

#### **4.1.2 Lebendmasse und Lebendmassezunahme**

Die Ferkel wurden anhand ihrer Lebendmasse auf die Gruppen verteilt. Da die Eingangsgewichte der Ferkel eine Spanne von 3,85 kg bis 6,23 kg aufwiesen, waren in jeder Gruppe gleichmäßig sowohl schwerere als auch leichtere Ferkel vertreten.

In der ersten Woche kam es bei allen Gruppen zu geringen Verlusten (Gruppen A und B) bzw. einer Stagnation der Lebendmasse (Gruppe C). In den folgenden 2,5 Versuchswochen

stieg in allen Gruppen die Lebendmasse an, wobei der Mittelwert der Kontrollgruppe am 25. Fütterungstag vergleichbar zu dem der beiden Versuchsgruppen war ( $p > 0,1$ ) (Tabelle 26). Die Ferkel mit einem geringen Einstallgewicht hatten, unabhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, eine geringere Zunahme als die schwereren Ferkel. Die mittlere tägliche Zunahme zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen (Tabelle 27).

**Tabelle 26:** Mittlere Lebendmasse (kg) der Ferkel der drei Fütterungsgruppen während der 25tägigen Fütterungszeit

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
Einstallen	4,62 <sup>2</sup> (±0,68)	4,57 (±0,56)	4,47 (±0,44)
1.Woche	4,51 (±0,87)	4,39 (±0,66)	4,55 (±0,72)
2.Woche	5,49 (±1,33)	5,41 (±0,77)	5,73 (±1,09)
3.Woche	7,68 (±1,97)	7,38 (±1,27)	7,65 (±1,59)
25.Tag	9,25 (±2,30)	8,79 (±1,63)	9,00 (±1,74)

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> arithmetisches Mittel (± Standardabweichung)

**Tabelle 27:** Mittlere wöchentliche Lebendmassezunahme (kg) der Ferkel der drei Fütterungsgruppen

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
1.Woche	-0,11 <sup>2</sup> (±0,43)	-0,18 (±0,29)	0,08 (±0,45)
2.Woche	0,98 (±0,63)	1,02 (±0,35)	1,18 (±0,50)
3.Woche	2,19 (±0,77)	1,98 (±0,58)	1,92 (±0,60)
21.bis 25. Tag	1,57 (±0,54)	1,40 (±1,17)	1,24 (±0,48)
mittlere Tageszunahme	0,19 (±0,07)	0,17 (±0,05)	0,18 (±0,06)

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> arithmetisches Mittel (± Standardabweichung)

### **4.1.3 Futteraufnahme und Futteraufwand**

Die mittlere tägliche Futteraufnahme je Tier wurde rechnerisch ermittelt und konnte nicht statistisch ausgewertet werden, da nur die tägliche Futteraufnahme der Gesamtgruppe gemessen werden konnte. Dabei fiel auf, dass die errechnete mittlere tägliche Einzeltierfutteraufnahme in den Versuchsgruppen B und C höher lag als die der Kontrollgruppe (Tabelle 28).

**Tabelle 28:** Rechnerisch ermittelte mittlere tägliche Einzeltierfutteraufnahme (g) der drei Fütterungsgruppen für die einzelnen Wochen und für die gesamte Fütterungsphase

	Gruppe		
	A	B	C
1. Woche	84,2	92,6	123
2. Woche	257	322	347
3. Woche	508	535	535
21. bis 25. Tag	634	630	652
mittlere tägliche Futteraufnahme pro Tier [g]	327	356	387

Aus der mittleren Futteraufnahme und der mittleren Lebendmassezunahme ließ sich der Futteraufwand (kg Futter je kg Lebendmassezunahme) ermitteln. Auch hier konnte aufgrund der fehlenden exakten Einzeltierfutteraufnahme keine statistische Auswertung erfolgen. Der Futteraufwand der Kontrollgruppe lag numerisch im Mittel in der zweiten und dritten Fütterungswoche unterhalb der Werte der Versuchsgruppen B und C. In den letzten Tagen des Versuches lag der Futteraufwand der Gruppe C unter dem der Kontrollgruppe. Der Futteraufwand in den einzelnen Wochen ist in der Tabelle 29 zusammengefasst.

**Tabelle 29:** Futteraufwand der Fütterungsgruppen in den einzelnen Versuchswochen und im Gesamtversuchszeitraum

	Gruppe		
	A	B	C
2. Woche	1,84	2,21	2,06
3. Woche	1,62	1,89	2,11
21. bis 25. Tag	1,21	1,35	1,06
Gesamtversuch	1,69	2,03	2,05

## **4.2 pH-Wert, Trockensubstanz und scheinbare praecaecale Verdaulichkeit**

### **4.2.1 pH-Wert der Digesta**

Auffällig war in allen drei Fütterungsgruppen der hohe pH-Wert in der Magendigesta. Zwischen den Gruppen waren in allen Abschnitten des GI-Trakts nur sehr geringe Schwankungen des pH-Werts festzustellen (Tabelle 30). Die geringe Probenanzahl des proximalen Jejunums (D1) erklärt sich dadurch, dass in diesem Bereich nicht bei jedem Tier Digesta vorhanden war.

**Tabelle 30:** pH-Wert der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
Magen	4,93 <sup>2</sup> (±0,59)	4,82 (±0,70)	5,13 (±0,78)
D1	6,02 <sup>4</sup> (±0,45)	5,90 <sup>3</sup> (±0,34)	5,84 <sup>3</sup> (±0,73)
D2	6,85 <sup>5</sup> (±0,28)	6,84 <sup>4</sup> (±0,28)	6,77 (±0,29)
D3	7,20 (±0,25)	7,17 (±0,45)	7,09 (±0,35)
Caecum	5,86 (±0,46)	5,88 (±0,46)	5,81 (±0,36)
Colon	6,47 (±0,72)	6,55 (±0,64)	6,53 <sup>5</sup> (±0,70)

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = arithmetisches Mittel (± Standardabweichung); <sup>3</sup> n = 6; <sup>4</sup> n = 8; <sup>5</sup> n = 11  
D1 = vorderes Jejunumdrittel, D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = hinteres Jejunumdrittel

#### **4.2.2 Trockensubstanzgehalt der Digesta**

Der Trockensubstanzgehalt der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Fütterungsgruppen (Tabelle 31).

**Tabelle 31:** Trockensubstanzgehalt (% der ursprünglichen Substanz) der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
Magen	30,4 <sup>2</sup> (±2,75)	29,6 (±4,33)	30,7 (±6,09)
D1	15,2 <sup>5</sup> (±5,08)	15,3 <sup>3</sup> (±8,43)	11,4 <sup>4</sup> (±4,07)
D2	16,7 (±4,80)	18,1 (±2,84)	16,7 (±2,95)
D3	17,3 (±2,55)	17,2 (±2,43)	16,4 (±1,97)
Caecum	16,6 <sup>6</sup> (±1,64)	16,5 (±1,79)	17,2 (±3,22)
Colon	23,9 (±4,05)	24,0 (±4,25)	23,1 (±4,58)

<sup>1</sup> = Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = arithmetisches Mittel (± Standardabweichung) <sup>3</sup>n = 4; <sup>4</sup>n = 6; <sup>5</sup>n = 7; <sup>6</sup>n = 11  
D1 = proximales Jejunumdrittel, D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = distales Jejunumdrittel

#### **4.2.3 Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Rohasche, des Rohproteins und der Mineralstoffe Kalzium und Phosphor**

Die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit wurde aus der Digesta des distalen Jejunumdrittels (D3) mittels Markermethode bestimmt. Es war bei den untersuchten Parametern eine höhere mittlere scheinbare praecaecale Verdaulichkeit in den beiden Versuchsgruppen als in der Kontrollgruppe festzustellen. Diese Unterschiede waren aber lediglich für das Rohprotein für die Gruppe C im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant (p = 0,028), für Gruppe B im Vergleich zur Kontrollgruppe war nur eine tendenzielle Differenz vorhanden (p = 0,063) (Tabelle 32).

Die hohe Verdaulichkeit des Phosphors in allen drei Gruppen entstand vermutlich durch die Zugabe einer Phytase zum Ferkelaufzuchtfutter.

**Tabelle 32:** Scheinbare praecaecale Verdaulichkeit der Rohasche, des Rohproteins, des Kalziums und des Phosphors (% der Digesta (TS)) im distalen Jejunum (D3)

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
Rohasche	48,1 <sup>2,4</sup> (±11,9)	53,2 (±6,14)	55,1 (±5,99)
Rohprotein	63,9 <sup>3</sup> (±5,33) <sup>a</sup>	71,1 (±6,62) <sup>ab</sup>	72,1 (±8,85) <sup>b</sup>
Kalzium	49,4 (±18,4)	53,9 (±12,2)	54,8 (±12,8)
Phosphor	55,2 (±14,7)	59,3 (±7,21)	64,6 (±7,57)

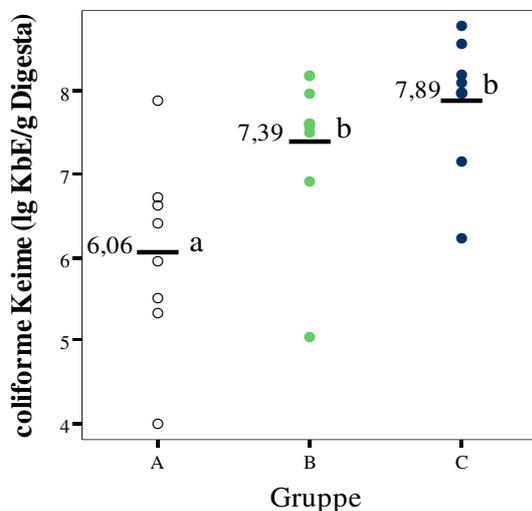
<sup>1</sup> = Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = arithmetisches Mittel (± Standardabweichung); <sup>3</sup>n = 11; <sup>4</sup>n = 10  
Die unterschiedlichen Indizes (a, b) zeigen signifikante Unterschiede (p < 0,05) an.

### 4.3 Mikro- und molekularbiologische Parameter

#### 4.3.1 Quantitative Lebendkeimzahlbestimmung im distalen Jejunum und im Caecum

##### 4.3.1.1 Nachweis von coliformen Bakterien

In beiden Versuchsgruppen traten signifikant höheren Keimzahlen der coliformen Bakterien in der Digesta aus D3 auf. Dabei waren die Coliformen in der Gruppe B (p = 0,027) und in der Gruppe C (p = 0,002) zur Kontrollgruppe A erhöht. Zwischen den beiden Versuchsgruppen zeigte sich kein Unterschied (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** Lebendkeimzahl der coliformen Bakterien als log<sub>10</sub> koloniebildende Einheiten in 1 g Digesta (uS) des hinteren Jejunums (D3), angezüchtet auf MacConkey-Agar

Dargestellt sind die Einzelwerte der untersuchten Ferkel und das arithmetische Mittel der Gruppen (schwarzer Strich). Die unterschiedlichen Indizes (a, b) zeigen signifikante Unterschiede (p < 0,05) der logarithmierten Daten an.

Dagegen zeigten die Keimzahlen der coliformen Bakterien in der Digesta des Caecums keine Unterschiede zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen (Tabelle 33).

**Tabelle 33:** Lebendkeimzahl der coliformen Bakterien (log<sub>10</sub> koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des Caecums, angezüchtet auf MacConkey-Agar

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 8)	B (n = 9)	C (n = 9)
Coliforme	7,27 <sup>2</sup> (±0,67)	7,54 (±0,80)	8,01 (±0,71)

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> arithmetisches Mittel (± Standardabweichung)

#### 4.3.1.2 Nachweis der aeroben Gesamtkeimzahl

In der Digesta aus D3 ergab sich zwar für die Kontrollgruppe A ein numerisch geringerer Mittelwert als bei den anderen Gruppen (Tabelle 34). Dieser Unterschied war jedoch für die Gruppe B nicht statistisch abzusichern und für Gruppe C lediglich tendenziell ( $p = 0,051$ ).

**Tabelle 34:** Aerobe Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$  koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des distalen Jejunumdrittels, angezüchtet auf Plate-Count-Agar

	Gruppe		
	A ( $n^1 = 8$ )	B ( $n = 9$ )	C ( $n = 9$ )
Aerobe Gesamtkeimzahl	6,28 <sup>2</sup> ( $\pm 2,29$ )	7,84 ( $\pm 1,59$ )	8,32 ( $\pm 0,73$ )

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> arithmetisches Mittel ( $\pm$  Standardabweichung)

Bei der aeroben Gesamtkeimzahl der Caecumdigesta waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen (Tabelle 35).

**Tabelle 35:** Aerobe Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$  koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des Caecums, angezüchtet auf Plate-Count-Agar

	Gruppe		
	A ( $n^1 = 8$ )	B ( $n = 9$ )	C ( $n = 9$ )
Aerobe Gesamtkeimzahl	8,42 <sup>2</sup> ( $\pm 0,67$ )	8,20 ( $\pm 1,67$ )	8,83 ( $\pm 0,45$ )

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> arithmetisches Mittel ( $\pm$  Standardabweichung)

#### 4.3.1.3 Nachweis der anaeroben Gesamtkeimzahl

Die anaerobe Gesamtkeimzahl der Kontrollgruppe A war in der Digesta aus D3 tendenziell geringer als die der Gruppe B ( $p = 0,061$ ) und C ( $p = 0,082$ ) (Tabelle 36).

**Tabelle 36:** Anaerobe Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$  koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des distalen Jejunumdrittels, angezüchtet auf Columbia-Blutagar

	Gruppe		
	A ( $n^1 = 8$ )	B ( $n = 9$ )	C ( $n = 9$ )
Anaerobe Gesamtkeimzahl	7,24 <sup>2</sup> ( $\pm 1,06$ )	8,28 ( $\pm 0,86$ )	8,22 ( $\pm 0,64$ )

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> arithmetisches Mittel ( $\pm$  Standardabweichung)

Die Bestimmung der anaeroben Gesamtkeimzahl der Caecumdigesta zeigte, wie schon die anderen Anzüchtungsverfahren, keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 37).

**Tabelle 37:** Anaerobe Gesamtkeimzahl ( $\log_{10}$  koloniebildende Einheiten in 1g Digesta (uS)) des Caecums, angezüchtet auf Columbia-Blutagar

	Gruppe		
	A ( $n^1 = 12$ )	B ( $n = 12$ )	C ( $n = 12$ )
Anaerobe Gesamtkeimzahl	9,52 <sup>2</sup> ( $\pm 0,53$ )	9,70 ( $\pm 0,50$ )	9,62 ( $\pm 0,33$ )

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> arithmetisches Mittel ( $\pm$  Standardabweichung)

### **4.3.2 Bakterielle Metaboliten**

#### **4.3.2.1 Kurzkettige Fettsäuren**

Die Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren in der Digesta der einzelnen Darmabschnitte zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 38). Es fiel jedoch auf, dass im Magen die mittlere Konzentration kurzkettiger Fettsäuren in der Kontrollgruppe numerisch höher lag als in den Versuchsgruppen, wogegen sich dieses Ergebnis im distalen Jejunum umkehrte und eine höhere Gesamtkonzentration in den beiden Versuchsgruppen messbar war.

**Tabelle 38:** Gesamtkonzentration der kurzkettigen Fettsäuren (mmol/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
Magen	9,28 <sup>2</sup> (±7,45)	7,33 (±6,26)	6,07 (±2,53)
D2	1,12 <sup>3</sup> (±0,41)	1,46 (±1,30)	1,09 (±0,60)
D3	6,22 (±5,34)	10,3 (±6,02)	8,52 (±5,38)
Caecum	135 (±39,8)	127 (±39,9)	135 (±23,6)

<sup>1</sup> Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> arithmetisches Mittel (± Standardabweichung), <sup>3</sup> n = 11  
D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = distales Jejunumdrittel;

Bei der Betrachtung des prozentualen Anteils der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren in Bezug auf die Gesamtkonzentration (Tabelle 39) fiel in D2 ein tendenziell ( $p = 0,095$ ) geringerer Anteil der Propionsäure in der Gruppe B im Vergleich zur Kontrollgruppe A auf. In D3 zeigte sich ein tendenziell ( $p = 0,074$ ) höherer Anteil an Essigsäure in der Gruppe C bezogen auf Gruppe A. Dagegen war der Anteil der Propionsäure in Gruppe C tendenziell geringer als in der Kontrollgruppe A ( $p = 0,086$ ) und Gruppe B ( $p = 0,096$ ).

**Tabelle 39:** Prozentualer Anteil der einzelnen kurzkettigen Fettsäuren in Bezug auf die Gesamtmenge in der Digesta (uS) der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

		Gruppe		
		A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
M	Essigsäure	76,4 <sup>2</sup> (±5,03)	74,7 (±5,73)	75,4 (±3,63)
	Propionsäure	14,2 (±6,43)	13,0 (±6,58)	14,3 (±4,78)
	i-Buttersäure	1,02 (±0,49)	1,45 (±0,80)	0,92 (±0,43)
	n-Buttersäure	0,65 (±0,32)	2,51 (±3,81)	1,57 (±1,66)
	i-Valeriansäure	2,04 (±1,61)	2,20 (±1,38)	3,00 (±2,11)
	n-Valeriansäure	5,72 (±3,65)	6,24 (±3,17)	5,00 (±1,66)
D2	Essigsäure	46,3 <sup>3</sup> (±15,6)	53,9 (±9,12)	52,9 <sup>3</sup> (±11,2)
	Propionsäure	14,9 <sup>3</sup> (±7,30)	7,80 (±8,63)	9,56 <sup>3</sup> (±5,65)
	i-Buttersäure	8,27 <sup>3</sup> (±4,51)	10,8 (±3,77)	9,12 <sup>3</sup> (±6,31)
	n-Buttersäure	10,9 <sup>3</sup> (±6,81)	9,46 (±6,01)	9,38 <sup>3</sup> (±5,00)
	i-Valeriansäure	13,5 <sup>3</sup> (±5,40)	11,9 (±4,38)	13,8 <sup>3</sup> (±3,18)
	n-Valeriansäure	6,17 <sup>3</sup> (±2,43)	6,05 (±2,70)	5,27 <sup>3</sup> (±1,23)
D3	Essigsäure	73,7 (±19,2)	82,1 (±12,7)	87,7 (±10,6)
	Propionsäure	7,81 (±4,90)	7,73 (±5,17)	3,69 (±2,77)
	i-Buttersäure	3,11 (±2,60)	1,89 (±1,52)	1,58 (±1,21)
	n-Buttersäure	6,22 (±5,00)	3,58 (±2,86)	2,66 (±4,00)
	i-Valeriansäure	5,79 (±5,38)	2,45 (±2,76)	2,84 (±2,85)
	n-Valeriansäure	3,39 (±2,81)	2,24 (±3,50)	1,50 (±1,41)
Cae	Essigsäure	55,8 (±4,94)	58,3 (±11,9)	54,9 (±3,90)
	Propionsäure	27,8 (±3,35)	25,5 (±8,54)	29,4 (±5,22)
	i-Buttersäure	0,58 (±0,33)	0,60 (±0,28)	0,62 (±0,30)
	n-Buttersäure	13,4 (±3,57)	13,2 (±5,06)	12,6 (±2,68)
	i-Valeriansäure	0,52 (±0,43)	0,63 (±0,28)	0,60 (±0,33)
	n-Valeriansäure	1,89 (±0,72)	1,74 (±0,87)	1,84 (±0,84)

<sup>1</sup>Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup>arithmetisches Mittel (± Standardabweichung), <sup>3</sup>n = 11

M = Magen, D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = hinteres Jejunumdrittel, Cae = Caecum

#### 4.3.2.2 D- und L-Laktat

Die Laktatgehalte zeigten sowohl zwischen allen drei Gruppen als auch Darmlokalisationen starke tierindividuelle Schwankungen, die sich deutlich in den hohen Standardabweichungen widerspiegeln (Tabelle 40).

Die D- und L-Laktatgehalte im Magen waren in der Gruppe A im Mittel etwas höher als die der Versuchsgruppen, jedoch nicht signifikant. Die D-Laktat-Gehalte in den Lokalisationen D2 und D3 lagen bei allen Tieren unterhalb der Nachweisgrenze des Testkits. Auch der Gehalt an L-Laktat war in D2 in allen Gruppen äußerst gering und es zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Abschnitt D3 war in der Kontrollgruppe numerisch eine geringere Menge an L-Laktat nachweisbar als in den Versuchsgruppen, wobei auch dieser Unterschied nicht signifikant war. In den Digesta-Proben des Caecums waren große

tierindividuelle Unterschiede zu sehen. Dabei war ein numerisch höherer Laktatgehalt in der Gruppe C zu erkennen.

**Tabelle 40:** Anteil des D- und L-Laktats (mmol/kg Digesta (uS)) der Digesta-Proben der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

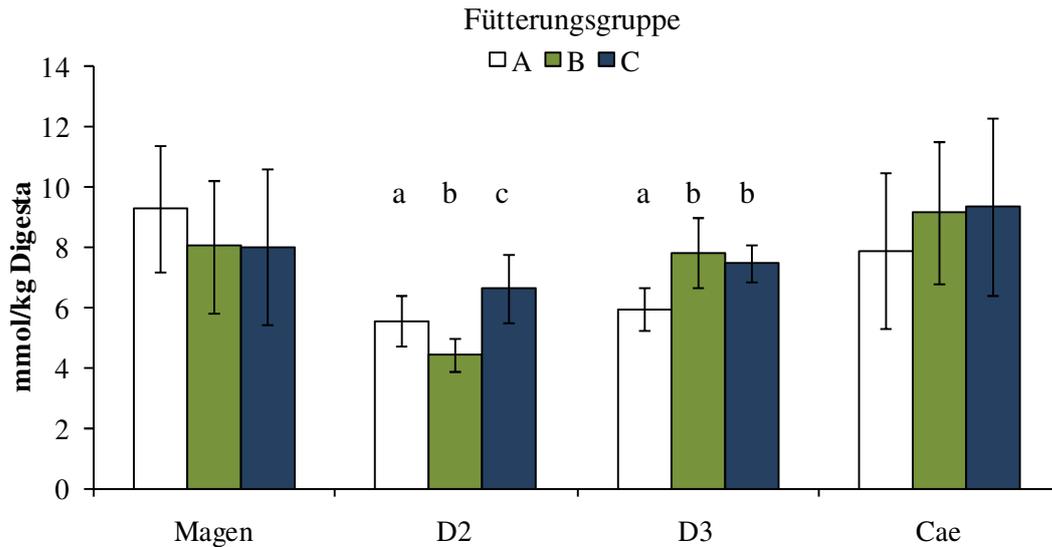
		Gruppe		
		A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
Magen	D-Laktat	6,76 <sup>2</sup> (±6,40)	5,73 (±7,23)	5,18 (±4,95)
	L-Laktat	8,47 (±4,45)	6,55 (±3,80)	6,67 (±2,43)
D2	L-Laktat	0,80 (±0,33)	0,80 (±0,21)	0,71 (±0,20)
D3	L-Laktat	9,93 (±6,36)	13,2 <sup>3</sup> (±7,34)	14,2 (±4,95)
Caecum	D-Laktat	1,78 (±1,80)	1,80 (±2,99)	5,00 (±5,47)
	L-Laktat	2,71 (±2,60)	2,00 (±3,09)	5,04 (±5,08)

<sup>1</sup>Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup>arithmetisches Mittel (± Standardabweichung); <sup>3</sup>n = 11  
D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = hinteres Jejunumdrittel

#### 4.3.2.3 Ammonium

Die Ammoniumgehalte in den Digesta-Proben des Magens und des Caecums zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Es fiel jedoch auf, dass, ähnlich wie bei den anderen bakteriellen Metaboliten (kurzkettige Fettsäuren und Laktat), der mittlere Gehalt an Ammonium im Magen in der Kontrollgruppe numerisch höher lag als in den Versuchsgruppen. In D2 waren in der Gruppe C signifikant höhere Ammoniumgehalte nachweisbar als in Gruppe A (p = 0,020) und Gruppe B (p < 0,001), wobei die Ammoniummengen in der Gruppe B zusätzlich signifikant kleiner waren als in der Kontrollgruppe (p = 0,013). In D3 war dagegen in der Kontrollgruppe A hoch signifikant weniger Ammonium als in den Gruppen B (p < 0,001) und C (p < 0,001) nachzuweisen.

Die Ammoniumgehalte der Digesta der verschiedenen Lokalisationen sind in der Abbildung 17 zusammengefasst.



**Abbildung 17:** Ammoniumgehalt (mmol/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

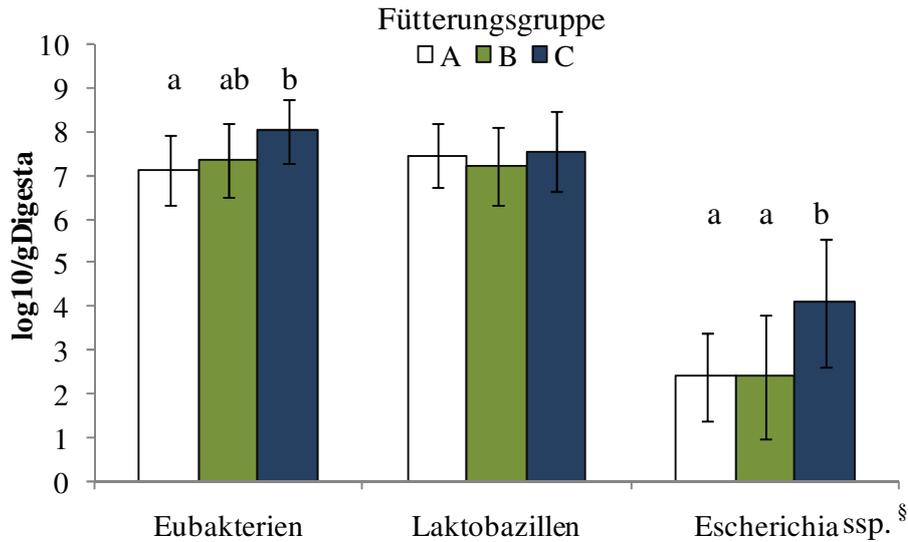
D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = distales Jejunumdrittel

Dargestellt sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung. Die unterschiedlichen Indizes (a, b) zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) an.

#### **4.3.3 Quantifizierung der Eubakterien, Laktobazillen und *Escherichia ssp.* in der Magendigesta mittels qPCR**

Es wurden mittels qPCR die Konzentration der Eubakterien, Laktobazillen und *Escherichia ssp.* in den Digesta-Proben des Magens ermittelt.

Bei der Bestimmung der Eubakterienkonzentration wurde ein signifikant höherer Gehalt in der Gruppe C im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen ( $p = 0,034$ ). Die Anzahl der Laktobazillen im Magen zeigte keinen Unterschied zwischen den drei Fütterungsgruppen. Bei der Messung der *Escherichia ssp.* lagen in der Kontrollgruppe nur 2 Tiere und in der Gruppe B nur 1 Tier über dem Detektionslimit, wogegen in Gruppe C für 11 Tiere Daten oberhalb der Detektionsgrenze ermittelt wurden. Um diese Ergebnisse statistisch auswerten zu können, wurde für alle nicht detektierbaren Daten der Wert  $\log_{10}/g$  Digesta mit 2 festgelegt, da sich die Detektionsgrenze bei einem Wert von  $2,5 \log_{10}/g$  Digesta befand. Unter Berücksichtigung dieser Werte ergab sich eine signifikant höhere Konzentration an *Escherichia ssp.* in der Gruppe C im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,009$ ) und zur Gruppe B ( $p = 0,010$ ). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 18 zusammengefasst.



**Abbildung 18:** Eubakterien, Laktobazillen und *Escherichia spp.* (log<sub>10</sub>/g Digesta (uS)) in der Digesta des Magens, gemessen mittels qPCR

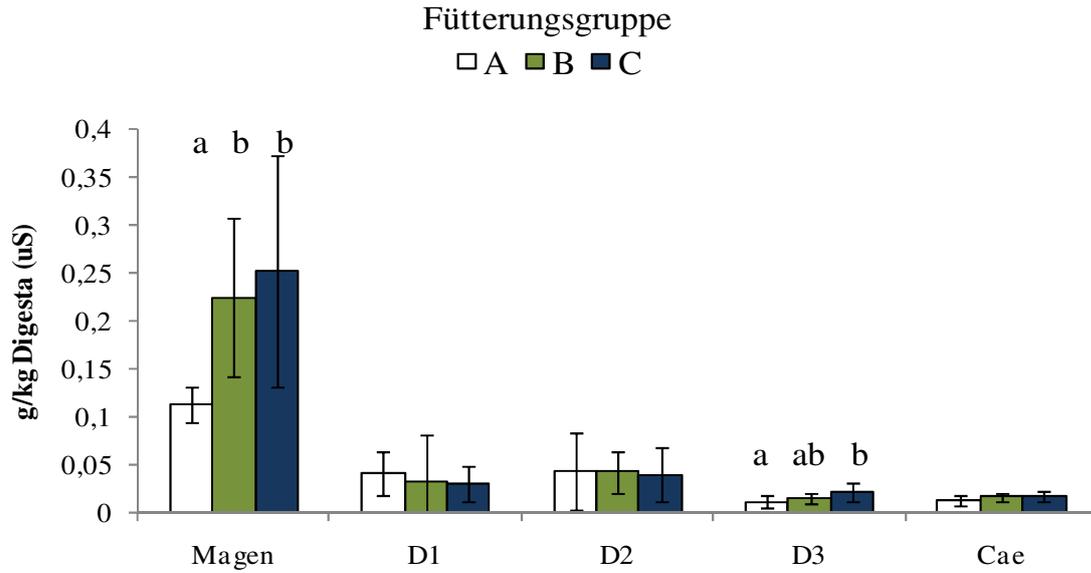
Dargestellt sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung. Die unterschiedlichen Indizes (a, b) zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) an.

§ = Keine statistisch eindeutige Analyse möglich, da in Gruppe A und B der größte Teil der Analysen unter der Detektionsgrenze lag. Für die hier aufgeführte statistische Analyse wurde den nicht detektierbaren Daten der Wert  $\log_{10} = 2$  zugeschrieben.

#### **4.4 Gaschromatographische Analysen der mittel- und langkettigen Fettsäuren**

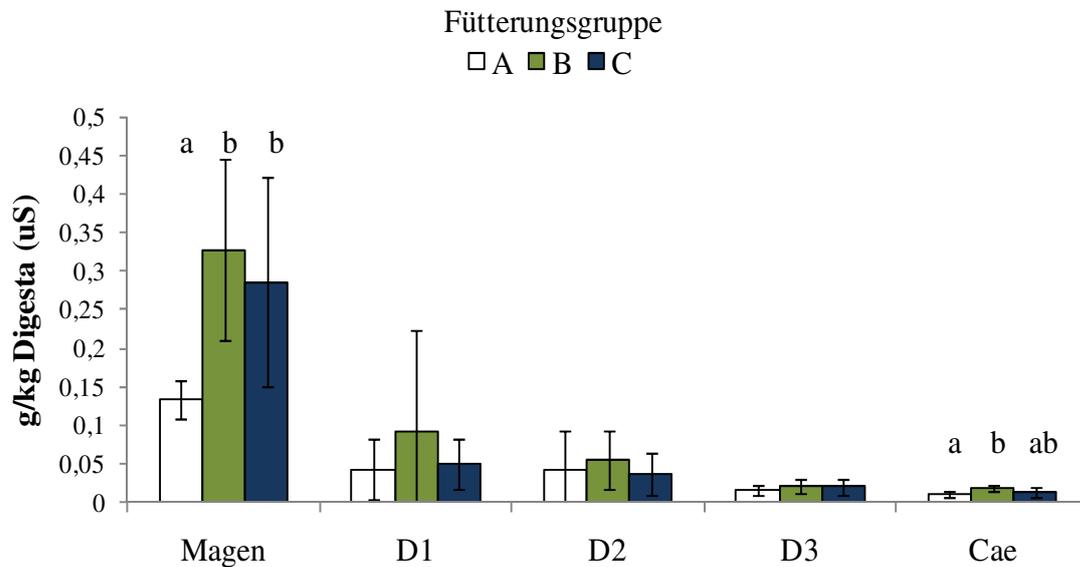
##### **4.4.1 Capryl- und Caprinsäure in der Digesta**

Die den Versuchsgruppen über das Futter zugeführten mittelkettigen Fettsäuren Caprylsäure (C8:0) und Caprinsäure (C10:0) waren in der Digesta des Magens deutlich stärker in den Versuchsgruppen präsent. Es waren in Bezug zur Kontrollgruppe sowohl in der Gruppe B als auch in der Gruppe C mehr Caprylsäure (A zu B:  $p = 0,008$ ; A zu C:  $p = 0,001$ ) und Caprinsäure (A zu B:  $p < 0,001$ ; A zu C:  $p = 0,003$ ) nachweisbar. Die Gehalte beider Fettsäuren im proximalen und mittleren Jejunum waren nicht signifikant unterschiedlich. Im distalen Jejunum konnte hingegen bei Gruppe C ein höherer Gehalt an Caprylsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,009$ ) und in Bezug auf Gruppe B ein tendenziell höherer Gehalt ( $p = 0,091$ ) nachgewiesen werden. Im Caecum zeigte sich dagegen in der Gruppe B im Vergleich zur Kontrollgruppe ein höherer Gehalt an Caprinsäure ( $p = 0,006$ ). Die Caprylsäure war in diesem Darmabschnitt in Gruppe C tendenziell höher als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,080$ ). Die mittleren Gehalte für Capryl- und Caprinsäure sind in den Abbildungen 19 und 20 für die verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts zusammengefasst.



**Abbildung 19:** Caprylsäure (C8:0) (g/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

D1 = proximales Jejunumdrittel, D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = distales Jejunumdrittel, Cae = Caecum  
Dargestellt sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung. Die unterschiedlichen Indizes (a, b) zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) an.



**Abbildung 20:** Caprinsäure (C10:0) (g/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

D1 = proximales Jejunumdrittel, D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = distales Jejunumdrittel, Cae = Caecum  
Dargestellt sind das arithmetische Mittel und die Standardabweichung. Die unterschiedlichen Indizes (a, b) zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$ ) an.

#### **4.4.2 Langkettige Fettsäuren in der Digesta**

Bei der Bestimmung der langkettigen Fettsäuren fielen im proximalen und distalen Jejunum signifikante Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen auf (Tabelle 41). Im proximalen Jejunum war die Palmitinsäurekonzentration (C16:0) bei Gruppe C geringer als in Gruppe B ( $p = 0,043$ ). Im distalen Jejunum war die Linolensäurekonzentration (C18:3) in der Gruppe B ( $p < 0,001$ ) und in der Gruppe C ( $p = 0,006$ ) niedriger als in der Kontrollgruppe A. Die anderen untersuchten langkettigen Fettsäuren zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen.

**Tabelle 41:** Langkettige Fettsäuren (g/kg Digesta (uS)) in der Digesta der verschiedenen Lokalisationen des GI-Trakts

			Gruppe				
			A		B		C
M	C12:0	8 <sup>1</sup>	1,53 <sup>2</sup> (±0,38)	8	1,48 (±0,28)	7	1,36 (±0,40)
	C14:0	8	0,50 (±0,13)	8	0,48 (±0,10)	7	0,45 (±0,14)
	C16:0	8	1,79 (±0,42)	8	1,81 (±0,34)	7	1,75 (±0,45)
	C18:0	8	1,10 (±0,30)	8	1,10 (±0,22)	7	1,06 (±0,32)
	C18:1	8	2,11 (±0,50)	8	2,20 (±0,41)	7	2,09 (±0,51)
	C18:2	8	4,30 (±0,92)	8	4,50 (±0,88)	7	4,27 (±0,90)
	C18:3	8	0,58 (±0,14)	8	0,60 (±0,14)	7	0,57 (±0,13)
D1	C12:0	7	0,24 (±0,31)	3	0,16 (±0,23)	5	0,09 (±0,10)
	C14:0	7	0,09 (±0,11)	3	0,05 (±0,07)	5	0,04 (±0,04)
	C16:0	7	0,48 <sup>ab</sup> (±0,47)	3	0,48 <sup>a</sup> (±0,53)	6	0,23 <sup>b</sup> (±0,25)
	C18:0	7	0,33 (±0,32)	3	0,30 (±0,33)	6	0,16 (±0,17)
	C18:1	7	0,53 (±0,57)	3	0,44 (±0,50)	6	0,23 (±0,26)
	C18:2	7	1,07 (±1,18)	3	0,89 (±1,05)	6	0,46 (±0,52)
	C18:3	7	0,13 (±0,16)	3	0,10 (±0,14)	5	0,06 (±0,06)
D2	C12:0	9	0,32 (±0,27)	8	0,27 (±0,13)	9	0,18 (±0,05)
	C14:0	9	0,14 (±0,10)	8	0,12 (±0,06)	9	0,09 (±0,02)
	C16:0	9	0,96 (±0,88)	8	0,72 (±0,29)	9	0,58 (±0,07)
	C18:0	9	0,65 (±0,57)	8	0,48 (±0,20)	9	0,39 (±0,05)
	C18:1	9	0,68 (±0,53)	8	0,54 (±0,22)	9	0,46 (±0,11)
	C18:2	9	1,45 (±1,23)	8	1,17 (±0,45)	9	0,96 (±0,20)
	C18:3	9	0,20 (±0,18)	8	0,16 (±0,06)	9	0,12 (±0,04)
D3	C12:0	12	0,18 (±0,08)	12	0,14 (±0,06)	12	0,14 (±0,06)
	C14:0	12	0,11 (±0,05)	12	0,11 (±0,04)	12	0,10 (±0,03)
	C16:0	12	0,78 (±0,22)	12	0,80 (±0,23)	12	0,79 (±0,22)
	C18:0	12	1,03 (±1,52)	12	0,61 (±0,18)	12	0,58 (±0,18)
	C18:1	12	0,46 (±0,18)	12	0,37 (±0,10)	12	0,41 (±0,11)
	C18:2	12	0,87 (±0,32)	12	0,73 (±0,19)	12	0,84 (±0,23)
	C18:3	12	0,18 <sup>a</sup> (±0,05)	12	0,09 <sup>b</sup> (±0,03)	12	0,12 <sup>b</sup> (±0,05)

<sup>1</sup>= Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = arithmetisches Mittel (± Standardabweichung);

M = Magen, D1 = proximales Jejunumdrittel, D2 = mittleres Jejunumdrittel, D3 = distales Jejunumdrittel

Die unterschiedlichen Indizes (a, b) zeigen signifikante Unterschiede (p < 0,05) an.

Laurinsäure (C12:0), Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1), Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3)

## **4.5 Immunologische Parameter**

### **4.5.1 Differentialblutbild und hämatologische Untersuchungen**

Die Blutparameter zeigten sowohl zu Beginn als auch zum Ende des Fütterungsversuches keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Auffällig waren jedoch die tierindividuellen Unterschiede innerhalb der einzelnen Gruppen, die sich in den großen Standardabweichungen widerspiegeln (Tabelle 42). In der zweiten Versuchsreihe wiesen die Ferkel in allen drei Gruppen eine Anämie auf, die durch eine verringerte Erythrozytenkonzentration, einem gesenktem Hämatokritwert und einem erniedrigtem Hämoglobingehalt des Blutes gekennzeichnet war.

Tabelle 42: Differentialblutbild und hämatologische Untersuchung

	Versuchsbeginn (Tag des Einstellens)			Versuchsende (Tötungstag)			
	Gruppe			Gruppe			
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)	A (n = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)	
Lymphozyten	%	38,3 <sup>2</sup> (±11,6)	39,6 (±10,1)	37,6 (±13,0)	50,8 (±13,0)	40,0 (±12,9)	43,8 (±10,6)
Lymphozyten	10 <sup>9</sup> /l	4,37 (±1,79)	4,84 (±1,37)	5,11 (±2,80)	6,66 (±2,17)	6,58 (±2,78)	7,68 (±2,40)
Monozyten	%	2,45 (±0,82)	4,09 (±2,26)	4,09 (±2,43)	4,83 (±1,80)	4,27 (±2,00)	4,75 (±1,82)
Monozyten	10 <sup>9</sup> /l	0,29 (±0,16)	0,53 (±0,34)	0,51 (±0,27)	0,68 (±0,30)	0,66 (±0,33)	0,83 (±0,34)
Segmentkernige Granulozyten	%	55,3 (±11,6)	51,9 (±11,0)	54,1 (±12,3)	40,8 (±12,3)	50,3 (±12,0)	48,3 (±10,6)
Segmentkernige Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	6,96 (±3,58)	6,70 (±2,79)	7,81 (±4,57)	5,97 (±3,24)	8,78 (±6,11)	8,83 (±3,50)
Stabkernige Granulozyten	%	0,82 (±0,75)	0,73 (±0,65)	1,27 (±1,01)	0,58 (±0,67)	1,36 (±1,63)	0,83 (±0,72)
Stabkernige Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	0,11 (±0,10)	0,10 (±0,10)	0,21 (±0,28)	0,09 (±0,12)	0,33 (±0,66)	0,16 (±0,14)
Eosinophile Granulozyten	%	2,36 (±1,69)	2,91 (±0,94)	2,18 (±1,25)	2,75 (±1,42)	3,91 (±3,59)	2,17 (±1,11)
Eosinophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	0,26 (±0,14)	0,36 (±0,16)	0,29 (±0,18)	0,34 (±0,15)	0,52 (±0,24)	0,42 (±0,27)
Basophile Granulozyten	%	0,82 (±0,87)	0,82 (±0,75)	0,73 (±0,91)	0,17 (±0,39)	0,18 (±0,41)	0,25 (±0,45)
Basophile Granulozyten	10 <sup>9</sup> /l	0,12 (±0,20)	0,10 (±0,11)	0,11 (±0,18)	0,03 (±0,06)	0,03 (±0,07)	0,04 (±0,08)
Erythrozyten	10 <sup>12</sup> /l	5,18 (±0,78)	5,13 (±0,63)	5,27 (±0,78)	5,15 (±0,78)	4,94 (±0,66)	5,01 (±0,84)
Hämatokrit	l/l	0,34 (±0,02)	0,34 (±0,03)	0,35 (±0,02)	0,28 (±0,05)	0,26 (±0,03)	0,28 (±0,05)
Hämoglobin	g/l	107 (±10,7)	104 (±10,3)	110 (±8,62)	89,6 (±13,8)	85,7 (±9,54)	88,2 (±14,7)
Thrombozyten	10 <sup>9</sup> /l	372 (±145)	454 (±140)	412 (±122)	236 (±138)	206 (±105)	186 (±90,0)
Leukozyten	10 <sup>9</sup> /l	12,6 (±5,67)	12,6 (±3,54)	14,1 (±6,57)	13,8 (±5,02)	16,9 (±8,16)	17,9 (±4,56)

<sup>1</sup> = Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = arithmetisches Mittel (± Standardabweichung)

#### **4.5.2 Phäotypisierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)**

##### CD4- und CD8-Expression

Bei der Betrachtung der CD4- und CD8-Expression fielen deutliche tierindividuelle Unterschiede auf. Den größten Anteil der durch CD4- und CD8-markierten Lymphozyten innerhalb der PBMC-Population stellte in dem Zeitraum um den 48. Lebenstag der Ferkel die CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellpopulation (zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen) dar. Der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen (T-Helferzellen) und der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Fraktion (Gedächtnis-T-Helferzellen) war deutlich geringer (Tabelle 43).

Es zeigte sich in der Gruppe B eine tendenziell höhere relative Anzahl von CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen im Vergleich zur Gruppe C ( $p = 0,065$ ). Ansonsten konnten keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen festgestellt werden.

**Tabelle 43:** Relativer Anteil der CD4- und CD8-positiven-Lymphozyten (%) des peripheren Bluts der Ferkel am Tötungstag

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	<b>8,61<sup>2</sup></b> (1,40-17,6)	<b>12,1</b> (4,92-24,9)	<b>7,59</b> (2,03-25,2)
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	<b>26,4</b> (5,89-42,7)	<b>26,9</b> (10,1-46,9)	<b>22,0</b> (13,2-46,6)
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	<b>5,35</b> (0,82-7,98)	<b>5,06</b> (1,58-15,6)	<b>5,40</b> (1,63-10,1)

<sup>1</sup> = Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = Median (Minimum-Maximum)

##### MHC II- und CD21- Expression

Den größten Anteil der durch MHC II- und CD21-markierten Zellpopulationen der PBMCs nahm die MHC II<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>-Fraktion (antigenpräsentierende Zellen) ein. Fast alle CD21-positiven Zellen zeigten zusätzlich eine MHC II-Expression (MHC II<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>, reife B-Zellen) (Tabelle 44).

Auch bei diesen Zellpopulationen lagen starke tierindividuelle Schwankungen vor. In der CD21- und MHC II-Expression konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen ermittelt werden.

**Tabelle 44:** Relativer Anteil der CD21- und MHC II-positiven Zellpopulationen (%) des peripheren Bluts der Ferkel am Tötungstag

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
MHC II <sup>+</sup> CD21 <sup>-</sup>	<b>29,7<sup>2</sup></b> (12,6-50,1)	<b>31,4</b> (22,7-46,8)	<b>33,8</b> (27,5-46,0)
MHC II <sup>-</sup> CD21 <sup>+</sup>	<b>0,01</b> (0,00-0,07)	<b>0,00</b> (0,00-0,05)	<b>0,00</b> (0,00-0,07)
MHC II <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	<b>10,3</b> (1,32-19,5)	<b>8,72</b> (4,76-23,0)	<b>9,25</b> (3,93-21,5)

<sup>1</sup> = Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = Median (Minimum-Maximum)

### **4.5.3 Phänotypisierung der mononukleären Zellen der Mesenteriallymphknoten**

#### CD4- und CD8-Expression

Im Gegensatz zur CD4- und CD8-Expression im peripheren Blut zeigte sich in den Mesenteriallymphknoten ein deutlich höherer relativer Anteil CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-Zellen, die den größten Anteil der markierten T-Lymphozyten ausmachten. Der relative Anteil der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellen war im Mesenteriallymphknoten deutlich geringer als im peripheren Blut, wohingegen der relative Anteil der CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Zellpopulation geringfügig höher als im Blut war.

Auch in den Mesenteriallymphknoten machten sich starke Streuungen bemerkbar und es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor (Tabelle 45).

**Tabelle 45:** Relativer Anteil der CD4- und CD8-Lymphozyten (%) der Mesenteriallymphknoten der Ferkel am Tötungstag

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	<b>20,1<sup>2</sup></b> (8,21-28,8)	<b>22,6</b> (14,8-28,5)	<b>21,5</b> (11,3-35,6)
CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	<b>10,6</b> (5,27-15,0)	<b>11,5</b> (5,33-19,8)	<b>9,96</b> (0,34-15,1)
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	<b>7,05</b> (3,15-13,9)	<b>7,38</b> (3,95-9,85)	<b>6,98<sup>3</sup></b> (1,41-10,7)

<sup>1</sup> = Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = Median (Minimum-Maximum), <sup>3</sup>n = 11

#### MHC II- und CD21-Expression

Trotz starker tierindividueller Streuung der Expressionsdaten zeigte sich ein hoher relativer Anteil MHC II<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>-Lymphozyten in den Mesenteriallymphknoten. Dieser war zudem deutlich höher als der im peripheren Blut. Eine etwas kleinere Fraktion bildeten die MHC II<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>-Zellen, die aber nur geringfügig unter dem Anteil des peripheren Blutes lagen. Fast alle CD21-positiven Zellen waren auch MHC II-positiv (Tabelle 46). Ein durch die Fütterung bedingter Unterschied konnte nicht festgestellt werden.

**Tabelle 46:** Relativer Anteil der CD21- und MHC II-positiven Zellpopulationen (%) der Mesenteriallymphknoten der Ferkel am Tötungstag

	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
MHC II <sup>+</sup> CD21 <sup>-</sup>	<b>26,3<sup>2</sup></b> (11,6-45,1)	<b>27,0</b> (19,4-34,0)	<b>27,8</b> (17,8-40,1)
MHC II <sup>-</sup> CD21 <sup>+</sup>	<b>0,00</b> (0,00-0,44)	<b>0,01</b> (0,00-0,63)	<b>0,12</b> (0,00-0,85)
MHC II <sup>+</sup> CD21 <sup>+</sup>	<b>38,2</b> (14,9-67,5)	<b>40,5</b> (29,1-50,8)	<b>38,0</b> (17,6-50,0)

<sup>1</sup> = Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = Median (Minimum-Maximum)

#### **4.5.4 Lymphozytenproliferation**

Die Stimulation der Lymphozyten des peripheren Bluts mittels Con A und LPS ergab für den Gesamtversuch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen. Bei der Stimulation mit Con A wurde ein tendenziell höherer Stimulationsindex in der Gruppe C im Vergleich zur Kontrollgruppe A festgestellt ( $p = 0,073$ ). Con A bewirkt hauptsächlich eine Stimulation der T-Zellen, wohingegen das LPS die Stimulation der B-Zellen bewirken sollte. Die Stimulationsindizes für den Gesamtversuch sind in der Tabelle 47 zusammengefasst.

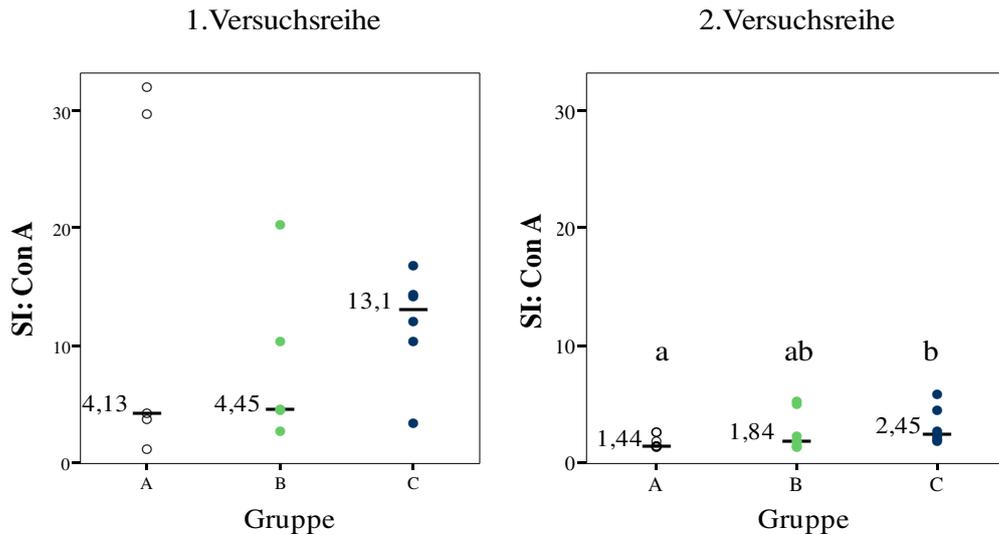
Auffallend war die sehr große Streuung der Werte, wobei zusätzlich ein deutlicher Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsreihen auftrat. In der zweiten Versuchsreihe zeigte sich bei der Con A-Stimulierung ein signifikant höherer Stimulationsindex in der Gruppe C als in Gruppe A ( $p = 0,045$ ). Darüber hinaus lagen innerhalb der einzelnen Versuchsreihen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor, jedoch waren die Stimulationsindizes beim ersten Versuchsdurchgang deutlich höher als beim zweiten Versuchsdurchgang.

Die Stimulationsindizes, die sich bei der Stimulierung mit LPS ergaben, lagen zum großen Teil unter 1, was dadurch begründet ist, dass einige Kontrollproben (ohne Mitogenbehandlung) mehr proliferierte Zellen aufwiesen als die gleichen Proben nach der Stimulation mit LPS. Dieses Phänomen trat bei allen Tieren der zweiten Versuchsreihe und bei je einem Tier jeder Gruppe des ersten Versuchsdurchganges auf. Der Vergleich der Stimulationsindizes der Gruppen ist für beide Versuchsreihen und beide Mitogene in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

**Tabelle 47:** Verhältnis des Anteils der proliferierten Zellen nach Stimulation mit Con A bzw. LPS zu den proliferierten Zellen ohne Stimulierung (SI)

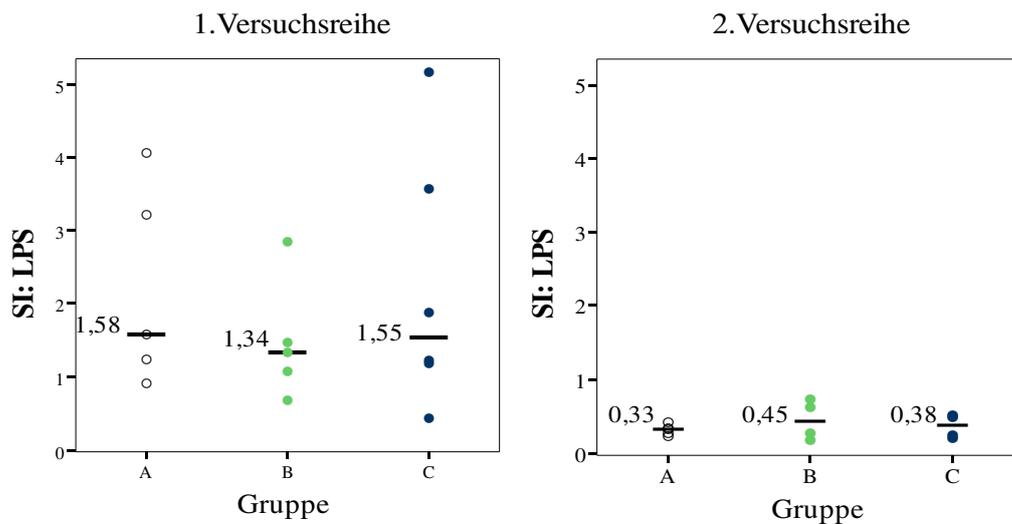
	Gruppe		
	A (n <sup>1</sup> = 12)	B (n = 12)	C (n = 12)
SI: ConA	<b>2,23</b> <sup>2</sup> (1,17-32,1)	<b>3,51</b> (1,31-20,2)	<b>5,11</b> (1,80-16,8)
SI: LPS	<b>0,66</b> <sup>3</sup> (0,24-4,07)	<b>0,74</b> <sup>4</sup> (0,18-2,85)	<b>0,86</b> <sup>3</sup> (0,21-5,16)

<sup>1</sup> = Anzahl der gültigen Fälle, <sup>2</sup> = Median (Minimum-Maximum); <sup>3</sup>n = 10; <sup>4</sup>n = 9



**Abbildung 21:** Con A-Stimulationsindex der Blutlymphozyten am letzten Versuchstag der beiden Versuchsreihen

Es sind die Einzelwerte mit dazugehörigem Gruppenmedian für beide Versuchsreihen dargestellt. Für beide Versuchsreihen wurden die gleichen Achsendarstellungen gewählt, um die Unterschiede der Stimulationsindizes zu verdeutlichen. Die unterschiedlichen Indizes (a, b) zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) an.

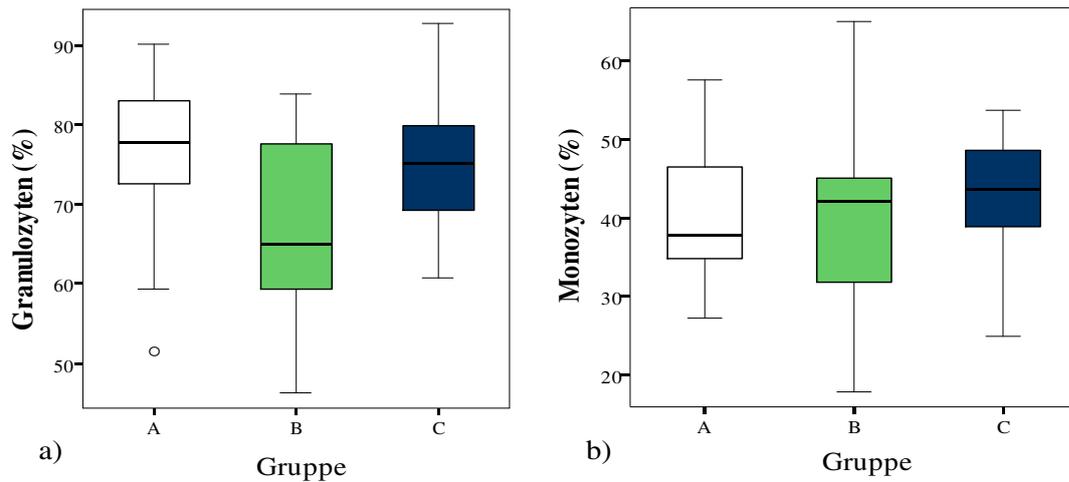


**Abbildung 22:** LPS-Stimulationsindex der Blutlymphozyten am letzten Versuchstag der beiden Versuchsreihen

Es sind die Einzelwerte mit dazugehörigem Gruppenmedian für beide Versuchsreihen dargestellt. Für beide Versuchsreihen wurden die gleichen Achsendarstellungen gewählt, um die Unterschiede der Stimulationsindizes zu verdeutlichen.

#### **4.5.5 Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten des peripheren Bluts**

Der Anteil der phagozytierenden Granulozyten war in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Gruppe B tendenziell höher ( $p = 0,073$ ). Ansonsten konnte für die phagozytierenden Granulozyten und Monozyten kein fütterungsbedingter Unterschied festgestellt werden. Erneut fiel eine hohe tierindividuelle Streuung der Daten auf (Abbildung 23).

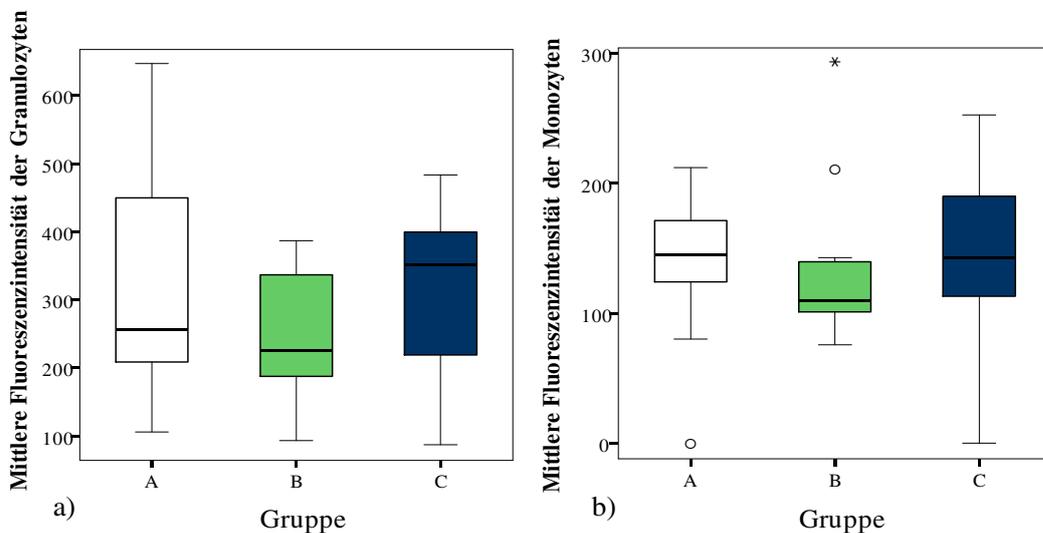


**Abbildung 23:** Prozentualer Anteil der phagozytierenden Granulozyten (a) und Monozyten (b) im Blut am letzten Versuchstag

Dargestellt sind der Median, oberes und unteres Quartil und größter und kleinster Wert (ohne Ausreißer), o = Ausreißer (Werte, die zwischen dem 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand liegen)

Bei der mittleren Fluoreszenzintensität handelt es sich um eine dimensionslose Größe, welche die Zahl der aufgenommenen Bakterien pro Zelle ausdrückt.

Auch hier zeigte sich eine sehr hohe Streuung der Werte, sodass die Daten als Median, Minimum und Maximum dargestellt werden. Fütterungsbedingte Unterschiede konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 24).

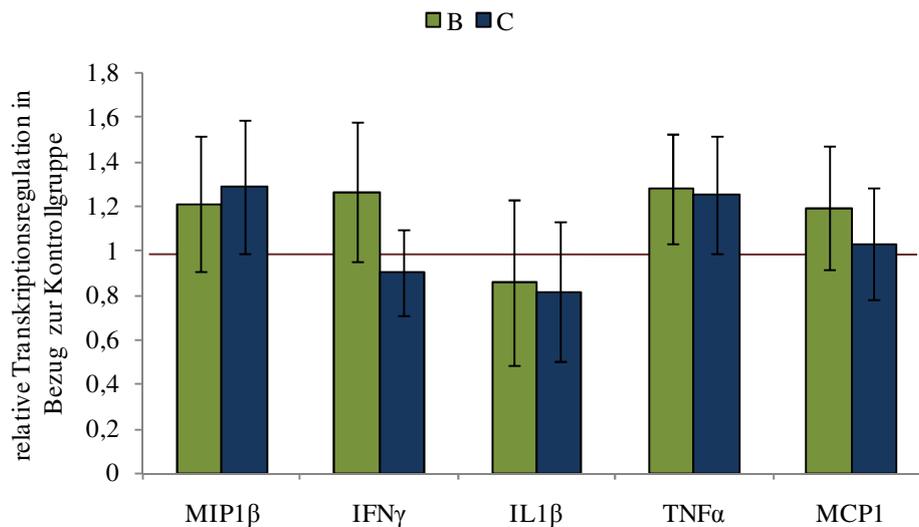


**Abbildung 24:** Mittlere Fluoreszenzintensität der phagozytierenden Granulozyten (a) und Monozyten (b) im Blut am letzten Versuchstag

Dargestellt sind der Median, oberes und unteres Quartil und größter und kleinster Wert (ohne Ausreißer), o = Ausreißer (Werte, die zwischen dem 1,5fachen und 3fachen Interquartilsabstand liegen), \* = Extremwert (Werte, die oberhalb des 3fachen Interquartilabstands liegen)

#### 4.5.6 Messung der mRNA-Expression der Zytokine MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und MCP1 im Ileumgewebe

Am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité wurde die Transkriptregulation der Zytokine IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MIP1 $\beta$  und MCP1 im Ileumgewebe auf Ebene der mRNA gemessen. Die mit der Software REST ermittelte relative Regulation der Transkripte zeigte keine signifikanten Unterschiede der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 25).



**Abbildung 25:** Änderung der mRNA-Konzentration von MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und MCP1 im Ileumgewebe der Versuchsgruppen relativ zur Kontrollgruppe

Dargestellt sind das arithmetische Mittel und der Standardfehler von den 6 Ferkeln der Versuchsgruppen der zweiten Versuchsreihe. Das arithmetische Mittel der Kontrollgruppe wurde als Bezug zu den Versuchsgruppen mit 1 festgelegt. Die Ergebnisse wurden auf das housekeeping-gene *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH) normalisiert.

## 5. Diskussion

### **5.1 Hintergrund und Ziel der Arbeit**

Ferkel sind in der Zeit nach dem Absetzen zahlreichen Veränderungen (Umgebungs- und Gruppenwechsel, Futterumstellung) ausgesetzt, wodurch ein hohes Risiko für gastrointestinale Erkrankungen und damit einhergehenden Leistungseinbußen besteht. Einen möglichen Ansatz zur Verbesserung der Situation stellt der Einsatz von mittelkettigen Fettsäuren (mkFs) im Ferkelaufzuchtfutter dar. In vielen *in vitro*-Untersuchungen konnte eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden, die bisher allerdings nur in wenigen *in vivo*-Studien überprüft wurde. Darüber hinaus werden den mkFs auch positive Eigenschaften auf verdauungsphysiologische und immunologische Parameter zugesprochen, die sich ebenfalls nur auf wenige *in vivo*-Untersuchungen stützen.

Ziel dieser Arbeit war es, anhand zweier Produkte, die mkFs in freier oder in gecoateter Form enthielten, die Einflüsse auf Absatzferkel zu überprüfen. Dabei wurden verdauungsphysiologische Gesichtspunkte näher betrachtet und Effekte der mkFs auf die Mikrobiota in verschiedenen Lokalisationen des Gastrointestinaltrakts untersucht. Außerdem wurde eine mögliche Beeinflussung des Immunsystems überprüft. In dieser Arbeit sollte zusätzlich ermittelt werden, ob ein Coating Einfluss auf die Absorptionsrate der mkFs hat und ob sich daraus andere verdauungsphysiologische, bakterielle und immunologische Effekte ergeben.

### **5.2 Diskussion der Versuchsbedingungen und des Studiendesigns**

Der Fütterungsversuch wurde am Versuchsgut des BfR durchgeführt. Aufgrund der räumlichen Gegebenheiten im Versuchsgut konnten nur 2 Gruppen in völlig identischen Flatdecks gehalten werden. Eine Gruppe musste zusätzlich in zwei kleinere Gruppen zu je 3 Tieren aufgeteilt werden. Die sonstigen Bedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) waren für alle Ferkel gleich, da sich die Flatdecks in einem Stallgebäude nebeneinander befanden.

Die Einmischung der Produkte fand am Institut für Tierernährung statt. Die Produkte wurden von der Firma Vitamex N. V. bereitgestellt und in den durch den Hersteller angegebenen Mengen in das Ferkelaufzuchtfutter eingemischt.

Zu Beginn des Versuchs hatten einige Ferkel Probleme mit der Aufnahme des geschroteten Futters und mussten durch das Anfeuchten des Futters am ersten Versuchstag angefüttert werden. Danach fraßen sie selbstständig.

Aus räumlichen Gründen musste der Versuch in zwei Durchläufen durchgeführt werden. Um äußerliche klimatische Veränderungen so gering wie möglich zu halten, wurden die beiden Versuchsdurchgänge in kurzem Abstand hintereinander durchgeführt. Es wurden pro Gruppe insgesamt 12 Tiere untersucht. Aussagen über Leistungsdaten sind mit dieser Tierzahl nur eingeschränkt möglich und lagen nicht im Fokus der Studie.

## **5.3 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.3.1 Effekte der mittelkettigen Fettsäuren auf verdauungsphysiologische Faktoren**

Die **Gesundheitsbewertung** fand anhand eines festgelegten Bewertungsschemas statt (s. Anhang Tabelle 48). Es zeigten sich während der zwei Versuchsreihen keine gravierenden gesundheitlichen Auffälligkeiten und es wurde kein Durchfall beobachtet. Ein Unterschied zwischen den Gruppen wurde nicht festgestellt.

Die **Lebendmasseentwicklung** wurde durch die Futterzusätze nicht wesentlich beeinflusst. Am Ende der Versuchszeit lag eine durchschnittliche Lebendmasse von 9,25 ( $\pm$  2,3) kg in der Kontrollgruppe, von 8,79 ( $\pm$ 1,63) kg in Gruppe B und 9,00 ( $\pm$ 1,74) kg in der Gruppe C vor. Schon zu Beginn des Versuchs lag eine große Streuung der Lebendmassen vor, die bis zum Versuchsende erhalten blieb, sodass die durchschnittliche Betrachtung nur wenig Aussagekraft besitzt. Da die Untersuchung der Lebendmasseentwicklung jedoch über einen für alle Ferkel gleichlangen Fütterungszeitraum verlief und die Ferkel anhand ihres Reifegrades und ihrer Körpermasse gleichmäßig auf die drei Gruppen verteilt wurden, ist eine eingeschränkte Beurteilung der Leistungsparameter möglich. Die Ferkel waren vor Versuchsbeginn nicht an Festfutteraufnahme gewöhnt, sodass einige Ferkel in den ersten zwei Tagen Probleme mit der Futteraufnahme zeigten. In der ersten Versuchswoche konnte eine Verringerung bzw. Stagnation der Lebendmasse der Ferkel beobachtet werden. Dieses ist auch in praxi typisch für die Zeit nach dem Absetzen (Le Dividich und Sève, 2000). Da der Fütterungsversuch aber nur über 25 Tage lief und die erste Versuchswoche als Adaptationsphase keine leistungsbezogene Aussage zulässt, blieb nur eine geringe Zeitspanne zur Betrachtung der Einflüsse der mkFs auf zootechnische Daten.

Bei der **Futteraufnahme** wurden keine statistisch abzusichernden Gruppenunterschiede sichtbar. Die Futteraufnahme konnte nur für die Gesamtgruppen gemessen werden, sodass die Einzeltierfutteraufnahme nur rechnerisch aus dem Gesamtgruppenwert ermittelt werden konnte. Es zeigte sich, dass im Mittel die Futteraufnahme der beiden Versuchsgruppen, insbesondere der Gruppe mit den gecoateten mkFs, über der der Kontrollgruppe lag. Dies spiegelt sich auch im ermittelten **Futteraufwand** wider, der in den Versuchsgruppen über dem der Kontrollgruppe lag. Erst in den letzten Tagen des Versuchs erreichte der Futteraufwand für alle Gruppen vergleichbare Werte. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe nahmen die Ferkel der beiden Versuchsgruppen vom ersten Tag an das Futter gut auf. Möglicherweise hatte der Geruch der eingemischten Produkte eine positive Wirkung auf das Fressverhalten der Ferkel. In früheren Studien wurde beim Einsatz von mkFs eine verminderte Futteraufnahme beobachtet, die mit einer leicht verringerten Körpermassezunahme einherging (Jenkins et al., 1985; Cera et al., 1989). Decuypere *et al.* (2003) sehen in dem Geruch und Geschmack der freien Fettsäuren einen Grund für eine abnehmende Futteraufnahme. Derartige Akzeptanzprobleme traten in der vorliegenden Arbeit nicht auf, woraus geschlossen werden kann, dass sowohl der Zusatz eines Aromastoffes als auch das Coating zu einer verbesserten Aufnahme der mkFs führen kann. Die gesteigerte Futteraufnahme spiegelte sich jedoch nicht in einer höheren Lebendmassezunahme wider, was in einem höheren Futteraufwand in den Versuchsgruppen resultierte. Der Einsatz von mittelkettigen Triglyceriden (mkTg) mit Lipase bewirkte eine gesteigerte Futteraufnahme, die

sich jedoch auch in einer besseren täglichen Zunahme und einem geringeren Futteraufwand niederschlug (Dierick et al., 2002b). Dieselben Autoren fanden auch beim Einsatz der Cuphea-Saat eine gesteigerte Zunahme der Lebendmasse (Dierick et al., 2003). Bei Hühnern wurde dagegen eine geringere Futteraufnahme und Lebendmassezunahme nachgewiesen, die mit einer durch mkFs stimulierten Sekretion von Cholecystokinin, dem eine Sättigungswirkung zugesprochen wird, in Zusammenhang gebracht wurden (Mabayo et al., 1992). Untersuchungen beim Menschen wiesen jedoch nur einen geringen Einfluss der mkFs auf die Cholecystokininsekretion nach (Symersky et al., 2002).

Auffällig ist die höhere mittlere **scheinbare praecaecale Verdaulichkeit** einiger Nährstoffe in beiden mkFs-gefütterten Versuchsgruppen. Diese ist für die Parameter Rohasche, Kalzium und Phosphor zwar nur numerisch höher als die der Kontrollgruppe, jedoch ist die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit des Rohproteins in der Gruppe C signifikant ( $p = 0,028$ ) und in der Gruppe B tendenziell ( $p = 0,063$ ) höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die hohe scheinbare Phosphor-Verdaulichkeit in allen Gruppen (ca. 55 bis 60 %) ist vermutlich durch den Zusatz einer Phytase im eingesetzten Ferkelaufzuchtfutter zu erklären. In mehreren Studien konnte eine Verbesserung der scheinbaren Fettverdaulichkeit durch mkFs ermittelt werden (Cera et al., 1990; Li et al., 1990; Odle et al., 1991). Die im Vergleich zu lkFs deutlich verbesserte Fettverdaulichkeit der mkFs beruht auf der Tatsache, dass diese nicht in Chylomikronen eingebaut werden müssen, sondern direkt im Magen und vorderen Dünndarm absorbiert und über das Portalvenenblut zu Leber transportiert werden (Bach und Babayan, 1982). Dies konnte sowohl beim Einsatz von Milch, der mkTg zugesetzt worden war, bei früh geborenen Kindern (Roy et al., 1975) als auch bei der Fütterung von mkTg an neonatale Ferkel (Odle et al., 1991) und Absetzferkel (Cera et al., 1990) festgestellt werden. In Studien von Cera *et al.* (1989; 1990) konnte beim Einsatz von Fettsäuren aus Kokosnussöl und mkTg im Vergleich zu Fettsäuren aus Maiskeimöl, Talg oder Sojaöl eine verbesserte Stickstoffretention bei Absetzferkeln ermittelt werden. Auch der Einsatz von mkTg in Babynahrung bewirkte in mehreren Untersuchungen eine verbesserte Stickstoffretention im Gegensatz zu energetisch gleichwertigen langkettigen Fettsäuren (Tantibhedhyangkul und Hashim, 1975). Der diesem Phänomen unterliegende Mechanismus durch den die mkFs in der Lage sind, die Stickstoffretention zu beeinflussen, konnte in diesen Studien jedoch nicht geklärt werden.

Diese Beeinflussung der Verdauungsleistung steht möglicherweise mit Effekten der mkFs auf die Darmmorphologie im Zusammenhang, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht eingehender untersucht wurden. Bedingt durch zahlreiche Stressfaktoren, denen Ferkel durch das Absetzen ausgesetzt sind, kommt es zu Veränderungen der Darmmorphologie. Diese sind häufig von Villusatrophie und Kryptenzellhyperplasie gekennzeichnet. Malabsorption und erhöhte Anfälligkeit für gastrointestinale Infekte sind mögliche Folgen (Cera et al., 1988). In einigen *in vivo*-Untersuchungen wiesen mkFs eine Beeinflussung der Darmarchitektur auf (Dierick et al., 2002b; 2003). Ihr Einsatz in der Fütterung von Absetzferkeln ging mit einer Steigerung der Villushöhe und einer Senkung der Kryptentiefe einher, woraus eine Vergrößerung der Absorptionsfläche resultierte (Li et al., 1990; Dierick et al., 2002b). Möglicherweise bedingt die vergrößerte Oberfläche eine verbesserte Verdauungsleistung. Eine Vergrößerung der Darmoberfläche ist beim Einsatz von mkFs hauptsächlich im proximalen Dünndarm nachweisbar (Galluser et al., 1993). Dort liegen die mkFs in größeren Mengen im

Lumen des Darmes vor bzw. es werden größere Mengen absorbiert (Galluser et al., 1993; Jenkins und Thompson, 1993). Die von den Enterozyten absorbierten mkFs werden nicht vollständig in das Blut weitertransportiert, sondern zum Teil in den Enterozyten metabolisiert. In Colon-Enterozyten des Schweines konnte eine mkFs:CoA-Ligase nachgewiesen werden. Freie Fettsäuren können in Enterozyten erst energetisch genutzt werden, wenn diese vor der  $\beta$ -Oxidation zu einem Thioester des CoA umgewandelt wurden. Dies wird durch eine CoA-Ligase katalysiert. Durch den Nachweis der mkFs:CoA-Ligase, die spezifisch für mkFs ist, besteht ein Hinweis, dass die mkFs eine Rolle im Energiehaushalt der Enterozyten spielen (Vessey, 2001). Die verbesserte Energieversorgung der Enterozyten könnte eine protektive Wirkung gegen Villusatrophie erklären.

Möglicherweise lagern sich die mkFs in die Membran der Enterozyten ein und beeinflussen so ihre Absorptionsleistung. Ratten wiesen nach mkFs-Fütterung jedoch keine Veränderung der Fettzusammensetzung der Mikrovillimembran im proximalen Jejunum auf (Galluser et al., 1993).

Anhand von Zellkulturversuchen mit der humanen Colonkarzinomzelllinie Caco2 wurde ferner festgestellt, dass mkFs die Permeabilität von Schleimhäuten für hydrophile Substanzen erhöhen (Lindmark et al., 1995). Dies wird auf eine Beeinflussung sowohl der Proteine ZO-1 und Occludin in den Tight Junctions als auch des Phospholipase C-abhängigen Inositoltrisphosphat/Diacylglycerol Signalwegs zurückgeführt (Lindmark et al., 1998). Diese Effekte auf die epitheliale Permeabilität wurden jedoch bisher beim Schwein noch nicht untersucht.

Die Versorgung der Enterozyten durch die mkFs vermindert möglicherweise auch die Menge an abgeschilferten Epithel im Darm, welches bei der scheinbaren Verdaulichkeit auch als Rohprotein miterfasst wird. Ob der signifikante Unterschied der scheinbaren Rohproteinverdaulichkeit auf eine verbesserte Absorption von Futterproteinen, auf eine geringere Zellabschilferung, oder eine geringere Sekretion von endogenen Proteinen (Verdauungsenzyme, Mukus) im Darm zurückzuführen ist, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden. Ein Einfluss auf das Darmepithel ist anzunehmen und sollte in zukünftigen Untersuchungen näher beleuchtet werden.

Hinweise auf eine verbesserte scheinbare Kalziumverdaulichkeit konnten auch Innis *et al.* (1993) anhand eines erhöhten Kalziumgehaltes im Serum bei Saugferkeln nach der Verfütterung von mkTg im Vergleich zu lkFs feststellen. Devlin *et al.* (1996) zeigten, dass mkFs zusätzlich eine vermehrte Expression von CabP9k auf mRNA-Ebene hervorrufen. Bei CabP9k handelt es sich um ein im Zytosol der Enterozyten vorliegendes Protein, das Kalzium bindet und somit für dessen Aufnahme von Bedeutung ist. Die Kalziumabsorption wurde aber nicht parallel zur CabP9k-Expression gemessen, sodass ein Zusammenhang nur vermutet werden kann.

Die Frage, ob mkFs eine positive Wirkung auf verdauungsphysiologische Parameter haben, kann für die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit anhand der eigenen Daten positiv beantwortet werden. Allerdings sind dazu absichernde Studien erforderlich.

### **5.3.2 Antibakterielle Wirkung der mittelkettigen Fettsäuren und Effekte des Coatings**

Aufgrund der schnellen Absorption von ungeschützt mkFs im GI-Trakt geht man davon aus, dass die antibakteriellen Effekte nur im proximalen Teil des GI-Trakts zum Tragen kommen. Um die Absorption im vorderen GI-Trakt zu verzögern und um die Wirkkonzentration der mkFs in distalere Bereiche des Darmes zu erhöhen, wurde ein Produkt hergestellt, in welchem die mkFs in durch pflanzliche Fette gecoateter Form vorliegen.

Mittels kultureller Untersuchungen und der Betrachtung von bakteriellen Metaboliten sollte v.a. in distalere Bereiche des Darmes nach einem Effekt des Coatings gesucht werden.

Die **kulturelle Keimzahlbestimmung** wurde in der Digesta des distalen Jejunums (D3) und des Caecums durchgeführt. Um einen Überblick über die dortige Darmflora zu gewinnen, wurde mittels Plate-Count-Agar bzw. Columbia-Blutagar die aerobe bzw. anaerobe Gesamtkeimzahl bestimmt. Für die differenzierte Betrachtung von Bakterienspezies wurde der MacConkey-Agar als Selektivmedium für coliforme Keime genutzt. Die Digesta des distalen Jejunums der Versuchsgruppen wies im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere Anzahl coliformer Keime auf (Gruppe B:  $p = 0,027$ ; Gruppe C:  $p = 0,002$ ). Dagegen konnten in der Digesta des Caecums keine Unterschiede im Bezug auf die coliformen Keime zwischen den drei Fütterungsgruppen festgestellt werden. Die aerobe und anaerobe Gesamtkeimzahl wiesen in beiden Darmabschnitten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den Einsatz der mkFs sowohl in freier als auch in gecoateter Form in distalen Darmabschnitten keine antibakteriellen Effekte bewirkt werden konnten. Bisherige *in vivo*-Untersuchungen befassten sich ausschließlich mit der Beeinflussung der mikrobiellen Darmflora durch mkFs im Magen und Duodenum, da in diesen Abschnitten eine ausreichende Konzentration erwartet wurde (Dierick et al., 2002b; 2003). Bei einer Konzentration von 0,30 g C8:0+C10:0 in 100 g Digesta (uS) konnte in diesen Abschnitten des GI-Trakts eine signifikante Reduktion der bakteriellen Gesamtkeimzahl und der *E. coli*-Konzentration festgestellt werden (Decuypere und Dierick, 2003). Zuvor durchgeführte *in vitro*-Untersuchungen hatten ergeben, dass eine Konzentration von 0,35 g C8:0+C10:0 pro 100 g Inkubationsmedium für eine signifikante Reduktion der anaeroben Gesamtkeimzahl und von *E. coli* benötigt wird (Dierick et al., 2002a). Mit derartigen Konzentrationen wurde aufgrund der schnellen Absorption der mkFs im Duodenum ab dem mittleren Dünndarm nicht gerechnet, sodass in diesen Studien von einer Keimzahluntersuchung in distalere Darmabschnitten abgesehen wurden. Die Absorption der mkFs in vorhergegangenen Darmabschnitten und der damit einhergehenden geringen Konzentration in den distalen Bereichen des GI-Trakts ist wahrscheinlich auch der Grund für die nicht nachweisbaren antibakterielle Effekte in der Gruppe B, welcher frei vorliegende mkFs gefüttert wurde. Mit dem Einsatz der gecoateten mkFs sollte die rasche Absorption verhindert werden. Mit einem Coating aus pflanzlichen Fetten konnten schon erfolgreich organische Säuren am Magen vorbeigeschleust und ihre Freisetzung im mittleren und hinteren Dünndarm ermöglicht werden (Claus et al., 2007; Piva et al., 2007). Anhand der kulturellen Keimzahlbestimmung konnte allerdings in dieser Arbeit kein Einfluss durch das Coating der mkFs nachgewiesen werden. Es liegen bisher keine Arbeiten über das Verhalten und die Wirkung der mkFs im Milieu des distalen Jejunums und des Caecums vor, sodass neben der

Annahme, dass eine zu geringe Konzentration der mkFs in diesen Abschnitten des GI-Trakts vorlag, möglicherweise auch das dort vorherrschende Milieu (pH-Wert) einen negativen Einfluss auf die Wirksamkeit der mkFs hatte. Dies sollte sowohl bei der Betrachtung der bakteriellen Metaboliten als auch der Untersuchung der mkFs-Konzentrationen der Digesta näher beleuchtet werden.

Durch die Betrachtung der **bakteriellen Metaboliten** wurde versucht, einen Eindruck der Einflüsse der mkFs im Verlauf des GI-Trakts zu gewinnen, da sie als Indikatoren für bakterielle Stoffwechselaktivität dienen. Es wurden die Konzentrationen der kurzkettigen Fettsäuren, Laktat und Ammonium in der Digesta bestimmt.

**Kurzkettige Fettsäuren** (kkFs) entstehen durch mikrobielle Fermentation von Kohlenhydraten und Proteinen. Welche Fermentationsvorgänge stattfinden und welche Endprodukte dabei entstehen, hängt sowohl von der Zusammensetzung der mikrobiellen Population als auch der Menge und Art der verdaulichen Substanzen in der Digesta ab. Die im distalen Jejunum beginnende Anreicherung der für den Organismus unverdaulichen Substanzen und die abnehmende Fließrate der Digesta führen zu einer verstärkten mikrobiellen Aktivität. Dadurch sind im Bereich des Caecums und des proximalen Colons die höchsten Konzentrationen der kkFs zu finden (Imoto und Namioka, 1978). Das Schwein bezieht ca. 20 bis 30 % des Energiebedarfes aus der Metabolisierung der aus unverdaulichen Substanzen umgewandelten kkFs (Bergman, 1990). Unverdauliche Kohlenhydrate stellen das wichtigste Substrat der mikrobiellen Fermentation dar. Dabei entstehen zum größten Teil die Fettsäuren Essigsäure, Propionsäure und Buttersäure. Acetat stellt dabei meist den Hauptanteil der Gesamtmenge der kkFs dar. Es wird vermehrt bei rohfaserreicher Fütterung produziert und gelangt nach der Absorption über das Blut in periphere Gewebe, die sich durch Oxidation des Acetats mit Energie versorgen können. Propionat, das vermehrt bei stärkereicher Fütterung gebildet wird, gelangt über die Pfortader zur Leber und wird in der Glukoneogenese energiebringend genutzt (Bergman, 1990). Butyrat wird dagegen v.a. im intestinalen Epithel oxidiert (Imoto und Namioka, 1978). Neben der energetischen Versorgung haben kkFs auch eine stimulierende Wirkung auf die epitheliale Darmzellproliferation (Sakata, 1987), spielen eine wichtige Rolle bei der Wasser- und Natriumabsorption, beeinflussen die Darmmotilität und bewirken außerdem eine Absenkung des pH-Werts innerhalb des Darms, was der Ansiedlung pathogener Bakterien entgegenwirkt (Lallès et al., 2007). Neben dem Kohlenhydratabbau kommt es jedoch auch zu proteolytischen Prozessen, woraus vermehrt die verzweigten Fettsäuren iso-Buttersäure und iso-Valeriansäure entstehen. Ein erhöhter Anteil dieser verzweigten Fettsäuren spricht für eine vermehrte Nutzung von Proteinen. Zusätzlich zu diesen Fettsäuren werden beim Proteinabbau auch potentiell toxische Substanzen wie Ammoniak, Amine, flüchtige Phenole und Indole gebildet (Lallès et al., 2007).

Bei der Betrachtung der Gesamtkonzentration der kkFs im Verlauf des GI-Trakts waren keine fütterungsbedingten Gruppenunterschiede festzustellen. Die Konzentrationen waren, wie erwartet, im Magen und Dünndarm gering und stiegen im Caecum an, wo sie mit durchschnittlich 130 mmol/kg in einem für das Ferkel typischen Bereich liegen (Bach Knudsen et al., 1991). Dierick *et al.* (2004) konnten beim kombinierten Einsatz von mkTg und Lipase bei Absetzern im Caecum eine höhere Konzentration der kkFs im Vergleich zur

Kontrollgruppe nachweisen, wobei der Anteil des Acetats erhöht und der Anteil des Propionats und des Valerats gesenkt war. Butyrat blieb vom Einsatz der mkFs unbeeinflusst. Ein Einfluss auf die Zusammensetzung der einzelnen kkFs konnte für die Digesta des Caecums in dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden. Jedoch zeigten sich in den vorangehenden Darmabschnitten gewisse Verteilungsänderungen der einzelnen Fettsäuren. Im mittleren Jejunum fand sich tendenziell ( $p = 0,095$ ) weniger Propionsäure in der Gruppe B im Vergleich zur Kontrollgruppe und im distalen Jejunum wurde in der Gruppe C tendenziell mehr Essigsäure als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,074$ ) und tendenziell weniger Propionsäure im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p = 0,086$ ) und der Gruppe B ( $p = 0,096$ ) nachgewiesen. Auch zeigte sich für beide Versuchsgruppen eine statistisch nicht abzusichernde Abnahme beider Formen der Butter- und Valeriansäure im distalen Jejunum. Insgesamt kann in der Gruppe C eine Spektrumverschiebung in Richtung Acetat-bildender Bakterien bzw. Stoffwechselprozesse angenommen werden, was die Ergebnisse von Dierick *et al.* (2004) unterstützt. Aufgrund der Fütterung mit demselben Ferkelaufzuchtfutter können Unterschiede, hervorgerufen durch unterschiedliches Nährstoffangebot, vermutlich ausgeschlossen werden. Die Verschiebungen der Fettsäurenverhältnisse geben daher einen Hinweis auf Einflüsse der beiden Zusätze auf die Darmflora. Allerdings waren sie in keinem Fall signifikant.

**Laktat** ist das wichtigste Endprodukt der Milchsäurebakterien (Sakata *et al.*, 1999). Es weist eine Wirkung gegenüber potentiell pathogenen Mikroorganismen auf, führt darüber hinaus aufgrund einer gewissen pH-Wert-senkenden Eigenschaft zu einer verbesserten Kalzium-, Eisen- und Phosphoresorption im Darm (Tang *et al.*, 2007). Außerdem kann es vom Wirt über die Glukoneogenese zusätzlich als Energieträger genutzt werden. Die Laktatbildung hängt v.a. vom Nahrungsangebot und der Zahl der Milchsäurebakterien ab. Es wird aus leicht fermentierbaren Kohlenhydraten gebildet, wobei auch die Art der Kohlenhydrate einen Einfluss auf die Aktivität der laktatproduzierenden Mikroorganismen hat. Bei der Betrachtung der Laktatkonzentration der Digesta können daher keine direkten Rückschlüsse auf die Anzahl der Milchsäurebakterien gezogen werden, da alleine die gesteigerte Aktivität einer gleichbleibenden Anzahl an Bakterien zu höheren Konzentrationen führen kann.

Dierick *et al.* (2004) konnten eine Senkung der Laktatkonzentration im proximalen und distalen Jejunum von Ferkeln durch den Einsatz von mkTg und extern zugeführter Lipase erreichen. Der Einsatz von mkFs in der vorliegenden Arbeit konnte keinen signifikanten Einfluss auf die Laktatkonzentration in den verschiedenen Bereichen des GI-Trakts erzielen. Deutliche tierindividuelle Schwankungen weisen erneut darauf hin, dass die Einflüsse der Umwelt und des Individuums stärker waren als die der zugesetzten mkFs. D-Laktat war im mittleren und distalen Jejunum unterhalb des Detektionsbereiches. Numerisch war der Gehalt an D- und L-Laktat im Magen in der Kontrollgruppe höher als in den Versuchsgruppen, dagegen wiesen die Digesta des distalen Jejunums numerisch eine höhere L-Laktatkonzentration in den Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Möglicherweise spiegelt sich in diesen Werten einerseits eine gewisse, durch den mkFs-Zusatz hervorgerufene Senkung des Bakteriengehaltes im Magen wider. Andererseits bestätigt der Anstieg im distalen Jejunum die kulturell erhobenen höheren Koloniezahlen der Bakterien in den mkFs-gefütterten Versuchsgruppen. Aufgrund der hohen Streuung der Einzeltierwerte und der Tatsache, dass der Laktatgehalt nicht proportional zur Bakterienmenge zu sehen ist, sind solche Rückschlüsse jedoch lediglich Vermutungen und

müssen überprüft werden. Es ist auch möglich, dass die eingesetzten mkFs nur die Stoffwechsellleistung der Laktatbildner im Magen senkten und keine Senkung der Bakterienzahl bewirkten. Im Zusammenhang mit einer gewünschten pH-Absenkung im Magen, die sich auch förderlich auf die Wirksamkeit der mkFs auswirkt, muss die Absenkung der Laktatkonzentration des Magens eher kritisch betrachtet werden.

Um weitere Einblicke in die Stoffwechselsituation der Darmflora zu erlangen, wurde die **Ammonium**konzentration in der Digesta bestimmt. Bei Ammoniak handelt es sich um ein toxisches Stoffwechselprodukt, das von proteolytischen Bakterien wie *E. coli* (Dierick et al., 1986a) und anderen fakultativ anaeroben Keimen durch die Degradation von Aminosäuren und anderen Stickstoffverbindungen (z.B. Harnstoff) gebildet wird. Ammoniak wirkt zytotoxisch, indem es in die Nukleinsäuresynthese eingreift (Visek, 1978) und die Verwertung anderer energiereicher Metaboliten wie z.B. Butyrat hemmt (Darcy-Vrillon et al., 1996). Die Ammoniakkonzentration im Darmlumen wird durch die Freisetzung stickstoffhaltiger Vorstufen, durch die Resorption und durch die Wiederverwendung für die Synthese stickstoffhaltiger Verbindungen (hauptsächlich mikrobielle Proteinsynthese) beeinflusst (Engelhardt und Breves, 2005). Bei physiologischem pH-Wert liegt Ammoniak jedoch als Ammonium vor ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{pK}_s = 9,25$ ). Bei einem pH-Wert von 5,5 bis 7,0 liegt weniger als 1 % als Ammoniak vor, welches aufgrund seiner Lipidlöslichkeit via Diffusion sehr schnell passiv resorbiert wird. Aufgrund der geringen Blut-Ammoniakkonzentration herrscht ein großes Konzentrationsgefälle zwischen Darmlumen und Blut, sodass durch die stetige Einstellung des Ammonium/Ammoniak-Gleichgewichts im Darmlumen kontinuierlich geringe Mengen von Ammoniak resorbiert werden. Ammonium wird aufgrund der geringen Lipidlöslichkeit nicht passiv resorbiert, jedoch wird vermutet, dass es über Kaliumkanäle der apikalen Membran von Epithelzellen aufgenommen wird (Engelhardt und Breves, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde mittels einer Ammoniumelektrode (Mettler Toledo GmbH, Gießen, Deutschland) ausschließlich der Ammoniumgehalt der Digesta bestimmt. Die Ammoniakkonzentration konnte mit der eingesetzten Elektrode nicht erfasst werden. Die Messung der Ammoniumkonzentration in der Digesta soll ein Eindruck der Intensität der mikrobiellen Umsetzung von Stickstoffverbindungen vermitteln. Jedoch muss eine Absenkung der Ammoniumkonzentration kritisch betrachtet werden, da eine Reduktion sowohl durch eine verminderte Proteolyse aufgrund einer Senkung der Bakterienkonzentration (v. a. *E. coli*) bzw. Verlagerung der Mikroflora zu nicht-proteolytischen Bakterien (z.B. Laktobazillen) als auch durch eine erhöhte Verwertung des vorhandenen Ammoniums für die mikrobielle Proteinbiosynthese bzw. durch vermehrte Resorption zustande kommen kann.

Wie schon bei der Betrachtung der anderen bakteriellen Metaboliten tendenziell ersichtlich, jedoch aufgrund der großen tierindividuellen Streuung ohne signifikante Ausprägung, zeigte sich bei der Ammoniumkonzentration in deutlicherer Weise. Im Magen wurde erneut eine sehr hohe Streubreite detektiert, sodass auch hier keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. Numerisch fand sich aber eine höhere Ammoniumkonzentration in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Versuchsgruppen, die beide sehr ähnliche Gehalte an Ammonium im Magen aufwiesen. Anhand einer *in vitro*-Untersuchung mit Pansensaft, welcher mit mkFs versetzt wurde, zeigten Hristov *et al.* (2004), dass der Einsatz von Caprin- und Laurinsäure schon bei Konzentrationen von 0,0625 % (wt/vol) eine Reduktion von Ammoniak und

gleichzeitig einen Anstieg der Konzentration der freien Aminosäuren und der lösliche Proteine bewirkte. Die Autoren merkten jedoch kritisch an, dass eine Übertragung dieser *in vitro*-Ergebnisse auf *in vivo*-Situationen schwierig ist, da die Wirkung der Fettsäuren durch ihre Adsorption an Futterpartikel im Pansensaft vermutlich deutlich vermindert wird. Im Magen des Schweines liegen im Gegensatz zum Pansen nur eine geringe Anzahl von Bakterien und eine geringe Fermentationsrate vor. Deutliche Effekte der mkFs, wie sie anhand des Pansensafts ermittelt wurden, sind somit nicht zu erwarten. Dies zeigte sich schon in früheren Untersuchungen mit antibakteriell wirksamen Substanzen, wie Virginiamycin, das zwar im Ileum eine Absenkung der Ammoniakkonzentration durch die Senkung der Bakterienkonzentration bewirken konnte, dies jedoch im Duodenum aufgrund der dort vorherrschenden geringen Bakterienkonzentration nicht erreichte (Dierick et al., 1986a).

Im mittleren Jejunum zeigte sich für beide Gruppen eine konträre Entwicklung. In der Gruppe B lag die Ammoniumkonzentration signifikant ( $p = 0,013$ ) unter der Konzentration der Kontrollgruppe, wohingegen sich in der Gruppe C signifikant höhere Konzentrationen im Vergleich zur Gruppe B ( $p < 0,001$ ) und zur Kontrollgruppe ( $p = 0,020$ ) finden ließen. Für die Gruppe B kam es im distalen Jejunum zu einer Veränderung. Hier zeigte sich eine in Bezug zur Kontrollgruppe signifikante Erhöhung der Ammoniumkonzentration ( $p < 0,001$ ). Auch in Gruppe C war diese erhöht ( $p < 0,001$ ). Im Caecum wiesen die beiden Versuchsgruppen numerisch einen höheren Ammoniumgehalt auf, jedoch war dies nicht abzusichern, da hier eine große Streubreite der Einzelwerte vorlag.

Die Konzentrationsverläufe der bakteriellen Metaboliten, die nur bei der Betrachtung der Ammoniumkonzentration fütterungsbedingte Effekte aufwiesen, legen nahe, dass ein durch die mkFs hervorgerufener antibakterieller Effekt im Magen und proximalen bis mittleren Dünndarmbereich beim Einsatz der freien Form nicht auszuschließen ist. Die gecoateten mkFs lassen jedoch keine Hinweise auf antibakterielle Effekte im proximalen GI-Trakt erkennen. Diese Unterschiede zwischen freien und gecoateten mkFs im proximalen GI-Trakt lassen vermuten, dass der Coatingprozess bzw. dabei eingesetzte Substanzen einen Einfluss auf die verarbeiteten mkFs haben könnten, der ihre Wirksamkeit im Vergleich zur frei eingesetzten Form deutlich mindert. Bei einem Coating mit pflanzlichen Fetten ist aufgrund ihres Verdaus durch die Pankreaslipase mit einer Freisetzung der wirksamen Substanzen im mittlere Jejunum zu rechnen (Piva et al., 2007). Eine Freisetzung der mkFs, die mit einer antibakteriellen Wirkung einhergeht, kann in der vorliegenden Arbeit anhand der kulturellen Keimzahlbestimmung und der bakteriellen Metaboliten nicht nachvollzogen werden. Diese Vermutungen stützen sich allerdings nur auf den Vergleich der in dieser Arbeit vorliegenden Fütterungsgruppen, da Studien über das Wirkverhalten der mkFs im Milieu des mittleren und hinterem Jejunums fehlen. Ab dem distalen Jejunum geben sowohl die kulturelle Lebendkeimzahlbestimmung als auch die bakteriellen Metaboliten keinen Hinweis auf antibakterielle Effekte beider Produkte. Die Betrachtung der Ammoniumgehalte und der kulturellen Lebendkeimzahlbestimmung weisen im Gegenteil auf eine vermehrte bakterielle Besiedlung im Bereich des distalen Jejunums der Versuchsgruppen hin. Die Ammoniumkonzentration in distalen Bereichen des GI-Trakts des Schweines wurde bisher im Zusammenhang mit mkFs nicht näher untersucht, da beim Fütterungseinsatz ungeschützter mkFs aufgrund der geringen Konzentrationen in diesen Bereichen nicht mit Effekten gerechnet wurde (Decuyper und Dierick, 2003). Untersuchungen der Faeces präruminanter

Kälber zeigten nach der Fütterung von mkTg keine Unterschiede der Ammoniakkonzentration (Sato et al., 2004). In dieser Studie wurde nicht die Konzentration der mkFs in der Faeces bzw. im Dickdarm gemessen. Es ist aber davon auszugehen, dass dort vermutlich eine zu geringe Konzentration der mkFs vorlag.

Um einen vermuteten antibakteriellen Effekt im Magen nachzuweisen, wurde mittels der **quantitativen PCR** der Gehalt an Eubakterien, Laktobazillen und *Escherichia ssp.* bestimmt. Die Anzahl der Eubakterien war im Magen in der Gruppe C höher als in der Kontrollgruppe ( $p = 0,034$ ), auch in der Gruppe B war keine Absenkung der Eubakterien festzustellen. Für die Laktobazillen konnte kein fütterungsbedingter Einfluss festgestellt werden, was im Zusammenhang mit den erhobenen Laktatkonzentrationen die Vermutung bekräftigt, dass die mkFs in diesem Fütterungsansatz keine antibakterielle Wirkung zeigten, sondern eine Senkung der Stoffwechselaktivität der Laktatbildner bewirkten. Die Bestimmung der *Escherichia ssp.* im Magen mittels der qPCR gestaltete sich schwierig, da in der Kontrollgruppe und der Gruppe B die Konzentration an *Escherichia ssp.* unterhalb der Detektionsgrenze lag. Für einen Überblick wurde für diese Tiere ein Wert von  $\log_{10} = 2$  pro g Digesta festgesetzt, der als Detektionsgrenze angenommen wurde. Da in der Gruppe C für fast alle Tiere eine zum Teil weit über der Detektionsgrenze liegende *Escherichia ssp.*-Konzentration vorgefunden wurde, kann man in Bezug zu den beiden anderen Gruppen von einer erhöhten Keimzahl ausgehen (Kontrollgruppe:  $p = 0,009$ ; Gruppe B:  $p = 0,010$ ). Aufgrund der überwiegend aeroben Verhältnisse im Magen und im proximalen Dünndarm ist dort nur mit einer geringen Konzentration dieser Bakteriengruppen zu rechnen, was sich in der Kontrollgruppe und der Gruppe B deutlich zeigte. Aufgrund der nicht detektierbaren Keimzahl kann nicht gesagt werden, ob die frei eingesetzten mkFs eine zusätzliche Senkung der *Escherichia ssp.*-Konzentration bewirkten. Da die anderen Bakteriengruppen nicht durch die mkFs beeinflusst wurden, ist dies aber unwahrscheinlich.

Mittels der qPCR konnte somit für diese betrachteten Keimpopulationen keine antibakterielle Beeinflussung durch den Einsatz der mkFs nachgewiesen werden. Dies steht den Ergebnissen der *in vivo*-Untersuchungen von Dierick *et al.* (2002b), welche mkTg in Kombination mit einer Lipase einsetzten, entgegen. Dort konnte anhand der kulturellen Keimzahlbestimmung in der Digesta des Magens eine signifikante Reduktion der aeroben Gesamtkeimzahl und *E. coli* nachgewiesen werden. Die Anzahl der Laktobazillen lag numerisch unterhalb der Anzahl der Kontrollgruppe. Beim Einsatz von Cuphea-Saat, die eine hohe Konzentration von Caprinsäure enthält, wieder in Kombination mit einer Lipase, konnte dagegen keine Reduktion der Gesamtkeimzahl, der Coliformen und der Laktobazillen in der Digesta des Magens nachgewiesen werden (Dierick et al., 2003). Möglicherweise spielt sowohl das Fettsäureverhältnis von Capryl- und Caprinsäure zueinander als auch das Vorliegen von Monoglyceriden eine Rolle bei der Entfaltung der antibakteriellen Wirksamkeit. Durch den Verdau der mkTg durch die Lipase werden im Magen Monoglyceride frei, denen in einigen *in vitro*-Untersuchungen eine deutlichere antibakterielle Wirkung zugesprochen wurde als den mkFs (Kabara et al., 1972; Petschow et al., 1998; Sprong et al., 1999). Dies könnte ein Grund für die differierenden Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu der Arbeit von Dierick *et al.* (2002b) sein. Die geringe antibakterielle Wirkung der freiwerdenden Monoglyceriden und mkFs der Cuphea-Saat begründen die Autoren mit der geringen

Konzentration von Caprylsäure der Cuphea-Saat, der sie ein höheres antibakterielles Potential zuschreiben als der Caprinsäure (Dierick et al., 2003). Diese Annahme deckt sich allerdings nicht mit den Ergebnissen einiger *in vitro*-Untersuchungen, die mit gleicher Konzentration beider mkFs eine deutlich höhere antibakterielle Wirkung mit der Caprinsäure erzielen konnten (Kabara et al., 1972; Sprong et al., 2001). Ob die Unterschiede im Fettsäureverhältnis oder dem Vorhandensein von Monoglyceriden begründet sind, lässt sich anhand der wenigen Studien nicht abschließend beurteilen.

Warum es in der vorliegenden Arbeit zu einer Erhöhung der *Escherichia ssp.*-Konzentration in der Magendigesta der Gruppe C kam, bleibt jedoch unklar.

Es war in dieser Arbeit somit nicht möglich, durch mikro- und molekularbiologische Betrachtung einen Effekt der eingesetzten mkFs auf die gastrointestinale Mikrobiota nachzuweisen. Neben den Einflüssen des eingesetzten Coatings, der vorliegenden Fettsäureverhältnisse und der differierenden Wirkungseffizienz der Monoglyceride im Vergleich zu freien Fettsäuren kristallisierten sich zwei Annahmen heraus:

- a) die eingesetzte Konzentration der mkFs war zu gering, um messbare Effekte zu erhalten  
bzw.
- b) der Magen-pH-Wert lag aufgrund der Säurebindungskapazität des Futters postprandial oberhalb des pKs-Wertes der mkFs, so dass diese in dissoziierter Form vorlagen und ihre antibakterielle Wirkung nicht entfalten konnten.

Um die in der Digesta vorliegende mkFs-Konzentration und darüber hinaus die Effektivität des Coatings zu analysieren, wurde der Gehalt der mkFs gaschromatographisch bestimmt. Es konnte im Magen ein signifikant höherer Gehalt der Capryl- und Caprinsäure in den beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die mittleren Konzentrationen von C8:0 und C10:0 betragen in der Gruppe B 0,225 g/kg Digesta (uS) respektive 0,328 g/kg Digesta (uS) und in der Gruppe C 0,252 g/kg Digesta (uS) respektive 0,286 g/kg Digesta (uS). Demgegenüber lag in der Kontrollgruppe die mittlere Konzentration von C8:0 bei 0,113 g/kg Digesta (uS) und von C10:0 bei 0,134 g/kg Digesta (uS). Nach Herstellerangaben (unveröffentlichte Daten) wird bei einer Konzentration von 0,25 g/kg Digesta (uS) je Fettsäure eine antibakterielle Wirkung erzielt. Somit lagen die Konzentrationen im Magen im anvisierten Bereich, was jedoch nicht zum gewünschten Effekt führte. Andere Studien fanden eine signifikante Reduktion der Keimzahlen erst bei Konzentrationen von 3,5 g mkFs in 1 kg Digesta (Dierick et al., 2002b). Diese Ergebnisse wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* verifiziert (Dierick et al., 2002a; 2002b).

Die Betrachtung der **Konzentrationsverläufe beider Fettsäuren** im GI-Trakt zeigte eine starke Abnahme im Übergang vom Magen zum proximalen Dünndarm. Dies entspricht dem typischen Absorptionsverhalten der mkFs, die sowohl im Magen (Aw und Grigor, 1980; Hamosh et al., 1989) als auch im proximalen Dünndarm effizient absorbiert werden (Traul et al., 2000). Da sich dieses Verhalten in beiden Versuchsgruppen in ähnlicher Weise präsentierte, kann kein schützender Einfluss des Coatings nachgewiesen werden. Die Konzentrationen der Fettsäuren näherten sich schon im proximalen Dünndarm in allen drei Fütterungsgruppen einander an. Für die Caprinsäure zeigte sich zwar in der Gruppe B ein

numerisch höherer Wert, es lag aber eine große Variationsbreite der Einzeltierwerte vor. Außerdem müssen die Daten des proximalen Dünndarms kritisch betrachtet werden, da hier nur von wenigen Tieren Digesta gewonnen werden konnte und diese zum Teil stark mit Gallensäuren durchsetzt war. Zwar finden sich im distalen Dünndarm der Gruppe C im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ( $p = 0,006$ ) und bezogen auf Gruppe B tendenziell ( $p = 0,091$ ) höhere Konzentrationen der Caprylsäure, die auch im Caecum in der Gruppe C verglichen zur Kontrollgruppe noch tendenziell erhöht waren ( $p = 0,080$ ), die Werte liegen jedoch unter einer antibakteriell wirksamen Konzentration. In ähnlicher Weise ist auch die auf die Kontrollgruppe bezogene erhöhte ( $p = 0,006$ ) Konzentration der Caprinsäure im Caecum in der Gruppe B zu interpretieren. Schon in der Futterrationsration war der Anteil der Caprylsäure in der Gruppe C am höchsten und in der Gruppe B der Gehalt an Caprinsäure. So haben vermutlich höhere Anfangskonzentrationen einen stärkeren Einfluss auf die Mengen im distalen Bereich des GI-Trakts als das Coating. Bezüglich der Herstellung des gecoateten Produkts wurde durch den Hersteller die Vermutung geäußert, dass die mkFs sich während des Coatingverfahrens mit der Matrix aus pflanzlichen Fetten verbunden haben könnten. Dies könnte bedeuten, dass die schützende Wirkung der langkettigen Fette der Matrix aufgehoben wurde und die mkFs dieses Produkts in ähnlicher Weise wie die ungecoateten mkFs freigesetzt und dementsprechend in gleicher Weise absorbiert wurden. Die gemessenen Konzentrationen der beiden Gruppen im Verlauf des GI-Trakts sprechen für eine solche Vermutung.

Die Tatsache, dass die Fettsäuren im Magen keine antibakterielle Wirkung zeigten, erklärt sich möglicherweise durch ihr Vorliegen in dissoziierter Form. Auch wenn der genaue Wirkmechanismus der mkFs nicht vollständig aufgeklärt ist, wird anhand vieler Untersuchungen davon ausgegangen, dass sie in undissoziierter Form in die Bakterien eindringen, in ihrem Inneren dissoziieren und durch die daraus folgende pH-Wert-Senkung im Zytoplasma wirken (Eklund, 1983; Hsiao und Siebert, 1999; Dierick et al., 2002b). Der durchschnittliche **pH-Wert** der Magendigesta lag in der Kontrollgruppe bei 4,93, in der Gruppe B bei 4,82 und in der Gruppe C bei 5,13. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass die Ferkel 3 Stunden nach der Fütterung getötet wurden, denn postprandial werden relativ hohe Werte beim Ferkel gemessen (Dierick et al., 2002a). Es ist zu vermuten, dass aufgrund des bei 4,9 liegenden pKa mehr als die Hälfte der zugeführten Fettsäuren im dissoziierten Zustand vorlagen. Erst in der undissoziierten, fettlöslichen Form ist es den freien Fettsäuren möglich, via Diffusion durch die Zellwand aus Peptidoglykanen in das Zytoplasma der Bakterien zu gelangen. Viele Untersuchungen weisen deshalb auf eine Wirkungssteigerung der mkFs bei pH-Senkung hin (Sprong et al., 2001; Sun et al., 2002). Dies mag auch ein Grund dafür sein, weshalb in anderen *in vivo*-Untersuchungen, in denen mittelkettige Triglyceride mit einer exogen zugefügten Lipase gefüttert wurden, höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten, um eine antibakterielle Wirkung zu erzielen. Hierbei wurde ein pH-Milieu im Wirkungsoptimum der Lipase gewählt, das bei pH 5 bis 8 liegt (Dierick et al., 2002b). Grundsätzlich war es in diesen Studien möglich, dem Organismus höhere Konzentrationen der mkFs zuzuführen, da sie in Triglyceridform vorlagen und damit die Futteraversion der Ferkel, die bei zu hohen Konzentrationen der freien mkFs auftritt, vermieden werden konnte. Durch die postprandial eintretende pH-Wert-Erhöhung, bedingt durch die Säurebindungskapazität des Futters, wurde im Magen ein geeignetes Milieu für die zugefügte

Lipase erreicht, sodass dort größere Mengen an mkFs freigesetzt wurden (Dierick et al., 2002b). Die eingesetzten Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit beruhen auf den Angaben des Herstellers. Durch die geringe Konzentration dürfte jedoch der Einfluss des pH-Werts und damit die Balance zwischen undissoziiert und dissoziiert vorliegenden mkFs eine entscheidendere Rolle spielen.

In dieser Arbeit wurde der Inhalt des gesamten Magens auf pH-Wert und Wirkung der mkFs untersucht. Der Schweinemagen setzt sich anatomisch aus zwei Bereichen zusammen, der *pars glandularis*, in der die Magensäure sezerniert wird und der *pars non-glandularis*. Es ist anzunehmen, dass im Bereich der *pars glandularis* ein deutlich niedrigerer pH-Wert vorherrscht und der Großteil der mkFs in undissoziierter Form vorliegt. Inwieweit in diesem Bereich ein durch die mkFs hervorgerufener antibakterieller Effekt eintrat, der nicht allein auf die pH-Wertsenkung zurückzuführen ist, kann hier nicht beurteilt werden und müsste in weiteren Versuchen separat untersucht werden. Für den homogenisierten Inhalt des gesamten Magens konnte dieser erwartete Effekt jedoch nicht gezeigt werden.

In diesem Zusammenhang muss auch überlegt werden, ob ein Verbringen der mkFs mit Hilfe eines gecoateten Produkts in distalere Bereiche des GI-Trakts hilfreich ist. Im Dünndarm liegt ein pH-Wert von 6 bis 7 vor, sodass die mkFs in dissoziierter Form vorliegen und somit nur eine geringe Wirksamkeit aufweisen. Daraus ergibt sich, dass der antibakterielle Einsatz der mkFs vornehmlich auf den Magen beschränkt sein dürfte. Hierbei ist zu überlegen, ob eine Ansäuerung des Mageninhaltes die Wirksamkeit der mkFs verbessern würde. Dies könnte durch Kombination mit anderen Futterzusätzen, z.B. organischen Säuren, erreicht werden.

### **5.3.3 Effekte der mittelkettigen Fettsäuren auf immunologische Parameter**

Die Frage, ob die Fütterung von mkFs eine Beeinflussung des Immunsystems des Ferkels mit sich bringt, wurde auf mehreren Ebenen beantwortet. Die hämatologische Untersuchung und die Analyse des Differentialblutbildes wurden zu Beginn und am Ende der Fütterungszeit durchgeführt. Ob mkFs eine Veränderung der Verhältnisse der T-Zell-Subpopulationen, der B-Zellen und der MHC II-positiven Zellen im peripheren Blut und den Mesenteriallymphknoten bewirken, wurde anhand ihres Phänotyps durchflusszytometrisch untersucht. Funktionell wurde der Einfluss der mkFs auf die Proliferationsleistung der Lymphozyten des peripheren Bluts und die Phagozytoseleistung der Granulozyten und Monozyten des Bluts betrachtet. Darüber hinaus wurde in der zweiten Versuchsreihe die Transkription verschiedener Zytokine im Ileumgewebe untersucht, um eine mögliche lokale Beeinflussung des Immunsystems zu erfassen.

Anhand der zu Beginn und gegen Ende durchgeführten **Blutuntersuchungen** konnten keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen festgestellt werden. Umwelteinflüsse und tierindividuelle Faktoren hatten vermutlich einen größeren Einfluss als der Einsatz der mkFs. Die Streuung der Blutparameter war zudem hoch. Zu Beginn des Versuchs war in allen Gruppen eine geringgradige Erhöhung der segmentkernigen Granulozyten zu bemerken, die sich evtl. auf den Transport zurückführen lässt. Ausschließlich am Ende der Versuchszeit wiesen alle Ferkel unabhängig ihrer Gruppenzugehörigkeit eine normozytäre, normochrome Anämie auf, die sich aber nicht in einem dazugehörigen klinischen Erscheinungsbild

ausdrückte. Weiterführende Untersuchungen waren nach Bekanntwerden der Anämie nicht mehr möglich, sodass ihre Ursache nicht geklärt werden konnte.

Die **Durchflusszytometrie** ermöglicht die Identifizierung und Zuordnung von Zellen anhand ihrer morphologischen und antigenen Eigenschaften. Mit dieser Methode können Immunzellen phänotypisch charakterisiert und deren jeweiliger Anteil im peripheren Blut oder in Geweben bestimmt werden. Es sollte untersucht werden, inwieweit die mkFs direkt oder indirekt durch ihre Wirkung im Darmlumen als immunmodulierende Substanzen wirksam werden und ob dies sich im relativen Anteil der Immunzellen in den Mesenteriallymphknoten und im peripheren Blut widerspiegelt. In dieser Arbeit wurden monoklonale Antikörper (mAK) gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 sowie CD21 und MHC II zur Markierung der Subpopulationen eingesetzt und zusammen in einem Ansatz untersucht. Die Kombination der mAk gegen CD4 und CD8 sollte einen Überblick über die relativen Anteile der T-Helferzellen, der zytotoxischen T-Zellen zusammen mit NK-Zellen und der doppelpositiven Gedächtnis-T-Helferzellen (DP-Zellen) geben. Dabei konnten sowohl in den Lymphknoten als auch im Blut sehr hohe individuelle Schwankungen festgestellt werden. Im Blut lag in allen drei Gruppen ein durchschnittlicher relativer Anteil von 24-25 % an zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen, ca. 10 % T-Helferzellen und 5-6 % DP-Zellen vor. Lediglich in der Gruppe C konnte im Vergleich zur Gruppe B eine tendenziell ( $p = 0,065$ ) geringere relative Anzahl der T-Helferzellen nachgewiesen werden. In den jejunalen Mesenteriallymphknoten zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Hier lagen die T-Helferzellen im Durchschnitt mit ca. 21 %, die zytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen mit 10 % und die DP-Zellen mit 7 % an der Gesamtheit der Lymphozyten vor.

Die Kombination der mAk CD21 und MHC II wurde für die Betrachtung der antigenpräsentierenden Zellen und der B-Zellen genutzt. CD21 stellt einen Rezeptor für die Komplementkomponente C3d (CR2) und einen Korezeptor für B-Zellen dar. Er wird auf reifen B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen exprimiert (Janeway und Travers, 2002). Reife B-Zellen erscheinen CD21- und MHC II-positiv. Die MHC II-positiven Zellen umfassen eine große Gruppe verschiedener Zelltypen, denen die Antigenpräsentation mittels dieses Oberflächenmoleküls gegenüber den T-Helferzellen gemein ist. Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen tragen das MHC II-Molekül auf ihrer Oberfläche, es ist aber auch auf reifen B-Zellen und einem Teil der CD8-positiven und DP-T-Zellen zu finden (Lunney und Pescovitz, 1987; Gerner et al., 2008). Daraus erklärt sich auch der große Anteil dieser so markierten Zellpopulation, die im Blut durchschnittlich 31-35 % und in den Mesenteriallymphknoten durchschnittlich 28 % ausmachte. Der relative Anteil an reifen B-Zellen war mit ca. 10 % im peripheren Blut deutlich geringer als im Mesenteriallymphknoten mit durchschnittlichen 28 %. Dabei zeigten sich erneut sehr hohe individuelle Schwankungen. Obwohl sich zahlreiche Studien mit der phänotypischen Untersuchung porciner Lymphozyten beschäftigen, liegen keine Referenzdaten für Ferkel dieser Altersklasse vor. Ausgehend von einer gruppenvergleichenden Betrachtung kann festgestellt werden, dass für den Einsatz der mkFs im Futter kein Einfluss auf die relative Anzahl der hier untersuchten Zellpopulationen nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der eingesetzten niedrigen mkFs-Konzentration im Futter, der hohen Absorptionsrate und des direkten Transports über die Portalvene zur Leber ist zu erwarten, dass nur eine geringe Konzentration der mkFs die jejunalen Mesenteriallymphknoten und auch das periphere Blut erreicht. Weder direkte noch indirekte

Effekte der mkFs, beispielsweise durch eine veränderte Immunantwort infolge Senkung der Bakterienkonzentration im Darmlumen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden.

Fettsäuren haben einen Einfluss auf die Expression von MHC II-Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (Udey et al., 1991). Auf dieser Grundlage untersuchten Tzuzuki *et al.* (2006) an dendritischen Zellen, die aus Ratten isoliert wurden, die Effekte von mkFs und lkFs. Sie gingen davon aus, dass besonders die dendritischen Zellen durch den direkten Kontakt mit den im Futter enthaltenen Fettsäuren in ihrer immunologischen Funktion beeinflusst werden. Da dieser Zelltypus zudem als antigenpräsentierende Zelle immunologische Vorgänge modulieren kann, könnten Fettsäuren über die Beeinflussung dendritischer Zellen einen weiterreichenden immunologischen Effekt haben. Für lkFs wurde eine Reduktion der MHC II-Expression nachgewiesen, jedoch fanden sich keinerlei Einflüsse durch den Einsatz von mkFs auf die dendritischen Zellen. Es wird vermutet, dass es aufgrund der längeren Kohlenstoffkette der langkettigen Fettsäuren zu Interaktionen mit der MHC II-Molekülstruktur kommt und so nach Induktion der Reifung der dendritischen Zellen eine Verminderung der Antigenpräsentation verursacht wird (Tzuzuki et al., 2006). Diese Vermutung legt nahe, dass mkFs im direkten Zellkontakt aufgrund ihrer geringeren Molekülgröße nur geringe immunmodulatorische Wirkung haben.

Die **Lymphozytenproliferation** dient als eine etablierte *ex vivo*-Methode zur Einschätzung der Immunkompetenz. Das Prinzip beruht darauf, dass die antigenspezifischen Lymphozyten, die im Körper in geringer Anzahl vorliegen, sich vermehren müssen, bevor sie zu funktionalen Effektorzellen ausdifferenzieren. Erst durch diese Vermehrung steht eine ausreichende Zellzahl für die verschiedenen funktionellen Aufgaben zur Verfügung (Janeway und Travers, 2002). Polyklonalen Mitogenen, wie dem Lektin Con A, ist es im Gegensatz zu anderen Antigenen möglich, bei Lymphozyten unterschiedlicher klonaler Herkunft und Spezifität eine Mitose auszulösen. Die ausgelöste Lymphozytenproliferation entspricht im Prinzip der durch andere Proteinantigene induzierten Zellvermehrung, sodass anhand der Mitogene ein Rückschluss auf die Lymphozytenreaktion möglich ist. In den meisten Fällen wird der Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin in die zelluläre DNA als Maß für das Zellwachstum herangezogen (Janeway und Travers, 2002). In dieser Arbeit wurde BrdU, das in die DNA der proliferierten Zellen eingebaut wird, als Marker genutzt. Eine spätere Detektion erfolgte durch Markierung mit einem anti-BrdU-mAK und einer Quantifizierung im FACS.

Es wurden die Mitogene Concanavalin A (Con A) und Lipopolysaccharid (LPS) O111 eingesetzt. Con A gehört zu der Gruppe der Lektine und stellt ein typisches T-Zell-Mitogen dar. Dagegen wurde das LPS, ein Bestandteil der äußeren Membran der Zellwand gramnegativer Bakterien, als B-Zell-Mitogen eingesetzt. Dargestellt wurde die funktionelle Proliferationsleistung als Stimulationsindex, der das Verhältnis der Proliferationsrate der Zellen mit Mitogenkontakt zur Proliferationsrate der Zellen ohne Kontakt zu dem jeweiligen Mitogen beschreibt.

Die Fütterung der mkFs zeigte im Gesamtversuch keinen signifikanten Einfluss auf den Stimulationsindex. Lediglich durch die Con A-Stimulation konnte in der Gruppe C im Vergleich zur Kontrollgruppe ein tendenziell ( $p = 0,073$ ) höherer Stimulationsindex nachgewiesen werden. Neben einer hohen tierindividuellen Streuung konnte zusätzlich eine große Variation der Stimulationsindizes zwischen den beiden Versuchsreihen festgestellt

werden. Sowohl durch Con A als auch durch LPS konnten in der ersten Versuchsreihe deutlich höhere Stimulationsindizes erreicht werden als in der zweiten Versuchsreihe. Im zweiten Versuchsdurchgang zeigte sich der Stimulationsindex ausgelöst durch Con A in der Gruppe C signifikant ( $p = 0,045$ ) erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auffallend war in der zweiten Versuchsreihe der unter 1 liegende Stimulationsindex für das LPS, was bedeutet, dass es in den unbehandelten Proben zu einer stärkeren Proliferation der mononukleären Zellen kam als durch die Behandlung mit LPS.

Die große Streuung der Stimulationsindizes lässt darauf schließen, dass Einflussfaktoren seitens der Umwelt und des Tieres stärker ausgeprägt waren als die der unterschiedlichen Fütterung. Jedoch scheint das gecoatete mkFs-Produkt einen gewissen förderlichen Einfluss auf die Proliferation der T-Lymphozyten zu haben. Ob dies durch eine verbesserte Absorption der mkFs durch Bestandteile des Coatings, das aus pflanzlichem Fettmaterial bestand, hervorgerufen wurde, ist unklar. Da der Einsatz der ungeschützten mkFs, wie in Gruppe B, zu keiner Steigerung der Proliferation führte, ist ein direkter Einfluss der mkFs eher unwahrscheinlich. Es muss davon ausgegangen werden, dass nur minimale Konzentrationen der mkFs im peripheren Blut zirkulierten, da nur eine geringe Konzentration im Futter eingesetzt wurde und der größte Teil der absorbierten mkFs über das Portalvenenblut zur Leber transportiert und dort metabolisiert wird (Marten et al., 2006). Deshalb ist nur mit einer sehr geringen mkFs-Exposition der peripheren Lymphozyten zu rechnen, die keine funktionelle Beeinflussung mit sich bringen dürfte. Die Möglichkeit, dass bei der Absorption von Fettsäuren eine lokale Beeinflussung der intestinalen Lymphozyten stattfindet, konnten Miura *et al.* (1993) für Ölsäure im Darm von Ratten nachweisen. Nach Absorption der Ölsäure konnte ein vermehrter Transport der Lymphozyten in die intestinale Lymphe und eine Steigerung der mitogeninduzierten Proliferationsleistung der intestinalen Lymphozyten festgestellt werden. Dies konnte für Caprylsäure jedoch nicht nachgewiesen werden, sodass vermutet wurde, dass die Lipoproteine, die bei der Absorption der lkFs gebildet werden, für diese Effekte verantwortlich sein könnten. Die Steigerung der Proliferationsleistung der Lymphozyten wird von Cuthbert *et al.* (1986) in einer möglichen Interaktion zwischen Lipoproteinen und intestinalen Lymphozyten gesehen. Goppelt *et al.* (1985) vermuten dagegen, dass sich die Lipoproteine in die Phospholipidmembran der Lymphozyten einbauen und so ihre Proliferationsfähigkeit fördern. Da weder eine Chylomikronenbildung nach der Absorption der mkFs stattfindet noch der Einbau der mkFs in Form von Lipoproteinen in die Phospholipidmembran der Lymphozyten beobachtet wurde, ist eine Beeinflussung ihrer Proliferationsleistung mittels mkFs unwahrscheinlich und die in Gruppe C erreichte Steigerung der Proliferationsleistung nach Con A-Stimulation vermutlich durch Bestandteile des Coatings, eventuell durch die lkFs, bedingt.

Die beträchtlichen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsreihen lassen sich nur schwer erklären. Die Bedingungen wurden in beiden Zeiträumen konstant gehalten, sodass durch Einflüsse der Haltung und Fütterung nur minimale Unterschiede zu erwarten waren. Es lagen geringe Variationen bei der Zellgewinnung und dem Proliferationsansatz vor, wie z.B. unterschiedliche Raumtemperatur und Arbeitsgeschwindigkeit, die jedoch nur geringe Abweichungen erklären könnten. Möglicherweise lag bei den Ferkeln, die für den zweiten Versuchsansatz genutzt wurden, schon zu Beginn eine andere immunologische Grundsituation vor, als bei den Ferkeln der ersten Versuchsreihe.

Eine Besonderheit stellte die geringe Proliferationsleistung der Zellen infolge der LPS-Stimulation dar. Dies zeigte sich besonders drastisch im zweiten Versuchsdurchgang, bei dem eine geringere Proliferation nach LPS-Exposition nachzuweisen war als in unstimulierten Zellen. Eine proliferative Wirkung des LPS von *E. coli* O111 im Schwein wurde von Fenwick *et al.* (1986) beschrieben. Vorab konnte bei 21 Tage alten Ferkeln, denen im Zuge anderer Untersuchungen am Institut für Tierernährung Blut entnommen wurde, nur eine geringe Proliferation durch die beiden LPS-Typen O55 und O111 ermittelt werden. Aus dem Blut eines 6 Wochen alten Ferkels aus der Schweineklinik der FU Berlin gelang es mit den beiden LPS-Typen, eine deutliche Proliferation der mononukleären Zellen zu erzielen. Über Vorerkrankungen und mögliche Kontakte mit erkrankten Ferkeln lagen keine Informationen vor. LPS bewirkt eine Proliferation und Differenzierung von B-Lymphozyten (Binns, 1982). Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung von CD14<sup>+</sup>-Zellen (Monozyten, Makrophagen) und der Sekretion von TNF $\alpha$  und anderen Zytokinen (Beutler und Rietschel, 2003). Die Makrophagen und ihre Zytokinsekretion scheinen eine wichtige Rolle bei der B-Lymphozytenproliferation zu spielen (Fenwick und Osburn, 1986). Zur Isolation der Lymphozyten aus dem peripheren Blut wurde in dieser Arbeit eine Aufreinigung über Ficoll genutzt, d.h. dass die Lymphozyten in relativ reiner Form in dem Proliferationsansatz vorlagen und daher möglicherweise eine zu geringe Anzahl Zytokin-sezernierender Phagozyten in den Ansätzen vorhanden war. Dies mag dazu geführt haben, dass diese Form der B-Lymphozyten-Stimulation nicht voll ausgeprägt war. Im Vollblut würden die physiologischen Verhältnisse besser simuliert, jedoch konnten durch die Aufreinigung über Ficoll einheitlichere Bedingungen hergestellt werden, da die Konzentration der eingesetzten Lymphozyten durch vorheriges Auszählen in allen Ansätzen fast identisch eingestellt war.

Die *ex vivo*-Untersuchung der **Phagozytoseleistung** der Granulozyten und Monozyten wurde mit dem Testkit Phagotest<sup>®</sup> untersucht, welches in der Humanmedizin zur klinischen Diagnostik eingesetzt wird. Dabei wurde sowohl die Anzahl der phagozytierenden Granulozyten und Monozyten als auch die Phagozytoseleistung (Anzahl der pro Zelle phagozytierten Bakterien) betrachtet. Erneut zeigten sich, wie auch bei den anderen immunologischen Parametern, starke tierindividuelle Unterschiede. Tendenziell konnte in der Gruppe B im Vergleich zur Kontrollgruppe eine geringere Anzahl an phagozytierenden Granulozyten ermittelt werden ( $p = 0,073$ ). Ansonsten fiel sowohl bei der Anzahl der phagozytierenden Monozyten als auch bei der Phagozytoseleistung beider Zellpopulationen kein signifikanter fütterungsbedingter Einfluss auf. Jedoch schien auch die Phagozytoseleistung in der Gruppe B numerisch etwas geringgradiger ausgeprägt zu sein als in den beiden anderen Gruppen.

Für Ferkel gibt es bisher keine Referenzdaten der Phagozytoseleistung. Daher kann nicht beurteilt werden, ob sich die in dieser Arbeit erhobenen Daten in einem dem Alter entsprechenden Bereich befinden. Die Aussagen des Phagotests<sup>®</sup> beziehen sich deshalb nur auf einen Vergleich zwischen den einzelnen Fütterungsgruppen. Aufgrund der sehr breiten Streuung der Daten kann davon ausgegangen werden, dass Einflüsse der Umwelt und des einzelnen Tiers einen stärkeren Einfluss auf die Phagozyten hatten als der Einsatz der mkFs. Die Tatsache, dass der Anteil der phagozytierenden Granulozyten in der Gruppe B tendenziell und die Zahl der phagozytierten Bakterien pro Zelle numerisch geringer war, lässt vermuten, dass mkFs eine Phagozytose-mindernde Wirkung haben. Diese spiegelt sich jedoch nicht in der Gruppe C wider, was möglicherweise an einer veränderten Absorption der mkFs in das

Blut oder an Substanzen des Coatings liegen könnte. Im Vergleich zu langkettigen ungesättigten Fettsäuren ist bisher noch sehr wenig über die Wirkung von gesättigten Fettsäuren auf porcine Neutrophile bekannt. In vielen Studien wurde überwiegend die Beeinflussung des  $O_2^-$ -erzeugenden Systems der Neutrophilen durch Fettsäuren untersucht. Dabei zeigte sich, dass gesättigte Fettsäuren ein guter Stimulus für die  $O_2^-$ -Erzeugung in porcinen Neutrophilen sind, wobei die Capryl- und Caprinsäure im Vergleich zu den längerkettigen ungesättigten Fettsäuren geringere Effekte zeigten (Tanaka et al., 1988). Bellinati-Pires *et al.* (1993) wiesen dagegen einen direkten Einfluss von mkTg auf den Metabolismus humaner Neutrophiler nach. Die eingesetzten mkTg bewirkten sowohl eine Senkung des prozentualen Anteils phagozytischer Neutrophiler als auch eine reduzierte Anzahl aufgenommener Bakterien pro Phagozyt. Somit wurde ein ähnlicher Befund, wie er sich in der Gruppe B zeigte, erhoben. Jedoch war die Konzentration der eingesetzten Triglyceride mit 20 mg pro ml Inkubationslösung (entspricht ungefähr 110 mM) sehr hoch. Zusätzlich fanden Bellinati-Pires *et al.* (1992) in diesen Versuchsansätzen heraus, dass die Inkubation humaner Neutrophiler mit mkTg zu einer verringerten Chemotaxis und zufälligen Migration führte. Zusätzlich löste die Inkubation der Neutrophilen mit mkTg ohne weitere Stimulation durch LPS eine Nitroblautetrazolium (NBT)-Reduktion aus, welche als Maß für den oxidativen Metabolismus der Neutrophilen steht. Dies wurde nach Inkubation mit lkTg nicht beobachtet (Bellinati-Pires et al., 1993). Die Autoren sehen daher mkTg als potentielle Promotoren für Gewebsinsulte, die durch vermehrte ungerichtete Freisetzung freier Radikale bedingt sind. Dies konnten Wanten *et al.* (2002), die die Wirkung verschiedener ungesättigter Fettsäuren auf isolierte humane Neutrophile in Konzentrationen von 1 bis 10 mM untersuchten, nicht bestätigen. Sie konnten durch den Einsatz der langkettigen Fettsäuren, aber nicht durch die Capryl- und Caprinsäure, eine Induzierung der Radikalproduktion feststellen. Dies lässt eine dosisabhängige Wirkung der mkTgs auf die Neutrophilen vermuten. Da sich diese Untersuchungen alle auf den Einsatz in der parenteralen Ernährung beziehen, waren die Neutrophilen den Triglyceriden und nicht nur den freien Fettsäuren ausgesetzt und zusätzlich mit sehr hohen Konzentrationen konfrontiert. Beides war bei der Verfütterung von mkFs nicht der Fall, sodass von signifikanten Einflüssen der absorbierten mkFs auf Phagozyten des peripheren Bluts nicht auszugehen ist.

Für die zweite Versuchsreihe wurde zusätzlich die **Zytokinexpression auf mRNA-Ebene** für die Zytokine  $IFN\gamma$ ,  $IL1\beta$  und  $TNF\alpha$  und die Chemokine  $MIP1\beta$  und  $MCP1$  im Ileumgewebe gemessen. Dabei muss die Heterogenität der entnommenen Gewebestücke kritisch betrachtet werden, die einen Vergleich der untersuchten Proben und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erschwert. Das Ileumgewebe wurde aufgrund der dort vorherrschenden hohen Dichte immunologischer Zellen ausgesucht, sodass mögliche Effekte der mkFs deutlicher nachweisbar sind. Da mit einer raschen Absorption der frei vorliegenden mkFs im proximalen GI-Trakt gerechnet wurde, wurde die Hypothese aufgestellt, dass zumindest bei der Gruppe C, in der die gecoateten mkFs ihren Einsatz fanden, eine Beeinflussung der Zytokinexpression vorliegen könnte. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch in keiner der beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nur numerisch waren gewisse Unterschiede zur Kontrollgruppe sichtbar, die aufgrund der großen Streubreite und der geringen Tierzahl nur vorsichtig interpretierbar sind.

**IL1 $\beta$**  und **TNF $\alpha$**  repräsentieren zwei proinflammatorische Zytokine, die beide hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen freigesetzt werden (Murtaugh, 1994). Lokal bewirken sie eine Aktivierung des Gefäßendothels und eine Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität, sodass es zu einem verstärkten Einstrom von IgG, Komplement und Zellen in das Gewebe und einer erhöhten Flüssigkeitsableitung zu den Lymphknoten kommt (Janeway und Travers, 2002). IL1 $\beta$  bewirkt im Knochenmark eine vermehrte Freisetzung von neutrophilen Granulozyten. TNF $\alpha$  führt zu einer Stimulation der Phagozytoseleistung der Makrophagen und fördert die Migrationsfähigkeit neutrophiler Granulozyten. Darüber hinaus spielt TNF $\alpha$  eine Rolle bei der Bildung von Akutphase-Proteinen in der Leber (Werdan et al., 2005).

Die Ergebnisse der Messung der beiden Zytokine waren in dieser Arbeit konträr. Im Mittel wurde weniger IL1 $\beta$  in den beiden mkFs-Fütterungsgruppen als in der Kontrollgruppe exprimiert. Dagegen zeigte sich in diesen Gruppen für TNF $\alpha$  eine numerisch höhere Expression auf der Ebene der mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Beobachtungen konnten nicht statistisch abgesichert werden. Andoh *et al.* (2000) konnten mit einer Konzentration von 5 mmol/l Caprylsäure in einer fetalen intestinalen Epithelzelllinie eine proinflammatorische Wirkung nachweisen, die sich in einer IL1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierten IL8-Sekretion und einer durch IL1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -induzierte Nuclear Factor(NF)- $\kappa$ B Aktivierung äußerte. Jedoch war die proinflammatorische Wirkung der Caprylsäure im Vergleich zu der ebenso untersuchten langkettigen Ölsäure gering ausgeprägt. Der parenterale Einsatz von Mixturen aus mkTg und lkTg bewirkt dagegen eine signifikante Senkung von TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$  im Blut, was durch die höhere Konzentration der Fettsäuren begründet ist (Reimund et al., 2004; Buenestado et al., 2006). Wohl aufgrund der in dieser Arbeit vorliegenden geringen Konzentration der mkFs im Bereich des Ileum zeigten sich die IL1 $\beta$ - und TNF $\alpha$ -Expressionen unbeeinflusst.

Bei **IFN $\gamma$**  handelt es sich auch um einen Mediator inflammatorischer Prozesse. Es wird von aktivierten NK-Zellen, T<sub>H</sub>1-Zellen und zytotoxischen T-Zellen sezerniert. IFN $\gamma$  dient wiederum als potenter Stimulator der MHC II-Expression in humanen und porcinen Endothelzellen. In Monozyten und Makrophagen induziert IFN $\gamma$  die TNF $\alpha$ -Sekretion, die Freisetzung reaktiven Sauerstoffs und fördert die LPS-induzierte IL1 $\beta$ -Sekretion (Braun et al., 2004).

Für das IFN $\gamma$  zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden mkFs-Fütterungsgruppen, der nicht statistisch abzusichern war. Die Gruppe B zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine höhere IFN $\gamma$ -Expression, wogegen diese in der Gruppe C mit den gecoateten mkFs unter der der Kontrollgruppe lag. *In vitro*-Versuche an IEL von Mäusen, in denen Caprylsäure zugesetzt worden war, wiesen nach der Stimulation mit anti-CD3 keine Veränderung der IFN $\gamma$ -Sekretion auf (Hara et al., 2003). Es konnte aber in dem gleichen Versuchsansatz eine Senkung der IFN $\gamma$ -Sekretion durch den Einsatz von lkFs erreicht werden.

**MIP1 $\beta$**  (engl. macrophage inflammatory protein 1 beta) und **MCPI** (engl. monocyte chemoattractant protein 1) gehören zu der Gruppe der CC-Chemokine, die sich von anderen Chemokinen durch ihr zwei direkt hintereinander auftretenden Cysteine am Amino-Terminus unterscheiden. Sie werden von Makrophagen, NK-Zellen, Fibroblasten, Mastzellen und T-Zellen exprimiert sowie sezerniert und wirken als Lockstoffe für Monozyten, aktivierte T-Lymphozyten, basophile und eosinophile Zellen (Solomon et al., 2003; Modi et al., 2006).

Beide Chemokine spielen mittels Makrophagen-Rekrutierung auch eine wichtige Rolle bei granulomatösen inflammatorischen Prozessen, wie sie bei Ferkeln nach einer Infektion mit porcinem Circovirus 2 anzutreffen sind (Kim und Chae, 2004).

MIP1 $\beta$  wurde in beiden Versuchsgruppen etwas höher exprimiert als in der Kontrollgruppe. Dagegen zeigte sich für MCP1 lediglich in der Gruppe B eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Gruppe C, die eine fast identische MCP1-Expression wie die Kontrollgruppe aufwies. Statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor. Hohe Konzentrationen dieser Chemokine und die dadurch ausgelöste stark erhöhte Makrophagen-Rekrutierung stehen in Zusammenhang mit Gewebsschädigung (Kim und Chae, 2004), jedoch wurden in diesem Versuch keine derartig hohen Konzentrationen erreicht.

Die allgemeinen Einflüsse der mkFs auf die Zytokinexpression im Darm des Ferkels wurden bisher nicht näher untersucht. Untersuchungen an Ratten, die über Sondenfütterung mkTg oral zugeführt bekamen, zeigten nach LPS-Injektionen eine geringere Expression der proinflammatorischen Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-18, MIP2, MCP1, IFN $\gamma$ ). Die mit mkTg gefütterte Rattengruppe zeigte im Vergleich zu einer lkTg-gefütterten Gruppe eine erhöhte IL6-Expression im Ileumgewebe. IL6 moduliert im Darm die IgA-Sekretion. Nach der LPS-Injektion war die IgA-Sekretion in der mkTg-Gruppe signifikant höher als in jener, die mit lkTg gefüttert worden war (Kono et al., 2004). Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die mkFs nicht nur über ihre antibakterielle Wirkung, sondern auch direkt durch Beeinflussung der Zytokinexpression eine Wirkung auf das Immunsystem haben könnten. In dieser Studie wurde aber eine höhere Konzentration der mkFs (5 g/kg Futter) eingesetzt und durch eine LPS-Injektion ein zusätzlicher massiver Stimulus gesetzt. Die Ferkel im vorliegenden Versuch waren weder einer erhöhten LPS-Exposition ausgesetzt, noch wiesen sie gastrointestinale Erkrankungen auf, sodass keine durch äußere Umstände verstärkte Zytokinfreisetzung im Darm deutlichere Unterschiede provozieren konnte. Darüber hinaus wurde die Messung der Zytokine im Ileumgewebe durchgeführt, wo aufgrund der schnellen Absorption von mkFs nur noch sehr geringe Konzentrationen vorlagen. Um eine immunmodulierende Wirkung der mkFs auf die Zytokinexpression nachzuweisen, bedarf es möglicherweise einer Stimulierung des Immunsystems z.B. mittels einer Inokulation des GI-Trakts mit einem Pathogen. Dabei könnte beurteilt werden, ob die durch den Stimulus induzierte Zytokinexpression durch die Fütterung von mkFs beeinflusst wird.

Obwohl in der Digesta des distalen Jejunums in der Gruppe C die höchste Konzentration coliformer Bakterien gefunden wurde, hatte dies keinen Einfluss auf die Zytokinexpression im Ileumgewebe, in dem sich nur numerische Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisen ließen. Mögliche Gründe für fehlende immunmodulatorische Effekte der mkFs in der vorliegenden Studie sind, neben einer möglichen fehlenden Wirkung der mkFs, im methodischen Bereich zu suchen. Eine höhere Dosierung der Fettsäuren sowie der Versuch einer Stimulierung der Zytokinfreisetzung z.B. mittels eines Infektionsversuchs wären mögliche Ansätze.

#### **5.4 Schlussfolgerung und Ausblick**

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die mkFs in der hier eingesetzten Form im Fütterungsversuch keine antibakteriellen Effekte im Darmtrakt aufwiesen. Dies hing möglicherweise mit dem durch die Säurebindungskapazität des Futters bedingten postprandial erhöhten pH-Wert im Magen zusammen. Bei einem pH-Wert um 5 lag ein Großteil der eingesetzten mkFs in dissoziierter Form vor, sodass ihre antibakterielle Wirksamkeit vermutlich reduziert war. Ab dem vorderen Dünndarmbereich gründet sich die nicht zu beobachtende Wirksamkeit auf einer zu geringen Konzentration der mkFs im Lumen des Darms, die durch die rasche Absorption im Magen und im proximalen Jejunum bedingt sein könnte. Auch die Verwendung gecoateter mkFs konnte diese Absorptionskinetik nicht signifikant beeinflussen. Die immunologischen Daten wiesen keine Beeinflussung durch die eingesetzten mkFs auf. Allerdings ergaben sich Hinweise auf eine erhöhte Verdauungsleistung in Form einer verbesserten praecaecalen scheinbaren Rohproteinverdaulichkeit.

Neben dem Einsatz höherer Konzentrationen der beiden mkFs sollte weiterhin die Zusammensetzung der mkFs-Produkte überdacht werden. In dieser Studie kamen nur die Capryl- und Caprinsäure als freie mkFs zum Einsatz. Viele *in vitro*-Studien zeigen jedoch die ausgeprägtesten antibakteriellen Effekte gegen gramnegative und grampositive Keime beim Einsatz von Laurinsäure und den Monoglyceriden Monocaprin und Monolaurin (Kabara et al., 1972; Bergsson et al., 1998; Petschow et al., 1998; Sprong et al., 2001; Van Immerseel et al., 2004). Da außerdem das pH-Milieu Einfluss auf die antibakterielle Wirksamkeit der mkFs hat, wäre bei Senkung des Magen-pH-Werts durch Zusätze wie organischen Säuren möglicherweise eine Wirkungssteigerung zu erwarten. Damit könnte erreicht werden, dass ein größerer Anteil der mkFs in undissoziierter und damit wirksamer Form vorliegt und so auch geringere Konzentrationen effektiv sind. In diesem Zusammenhang sollte auch der Einfluss des Dissoziationsgrades der mkFs auf einen möglichen direkten und von mikrobiellen Einflüssen unabhängigen Effekt auf das Immunsystem des Darms betrachtet werden. Die vorliegende Arbeit konnte keine Modulation der untersuchten immunologischen Parameter durch mkFs nachweisen. Es wäre sinnvoll, die Darmabschnitte, die mit einer höheren Konzentration der mkFs in Kontakt kommen, auf immunologische Veränderungen zu untersuchen, da für andere Spezies bereits Effekte ermittelt wurden (Kono et al., 2004).

## Zusammenfassung

### Susanne Buchheit: **Untersuchungen zum Einsatz von mittelkettigen Fettsäuren in der Fütterung von Absetzferkeln**

Mittelkettige Fettsäuren (mkFs) können antibakteriell wirken. Die vorliegende Studie wurde zur Evaluierung möglicher Effekte auf die Darmflora und das Immunsystem bei Absetzferkeln durch den Einsatz der mkFs in der Fütterung durchgeführt. Zudem sollte die Anwendung von frei vorliegenden und gecoateten mkFs verglichen werden.

Zu diesem Zweck wurde ein Fütterungsversuch mit drei Fütterungsgruppen mit je 2 mal 6 abgesetzten Ferkeln, aufgeteilt auf zwei Versuchsdurchgänge, durchgeführt. Die Kontrollgruppe erhielt ein Standard-Ferkelaufzuchtfutter und die Versuchsgruppe B eine Mischung dieses Ferkelaufzuchtfeeders mit 0,3 % eines Produkts, das die beiden mkFs Capryl- und Caprinsäure in freier Form in Kombination mit Aromastoffen enthielt. Die Versuchsgruppe C erhielt eine Mischung, in der dieses Produkt in gecoateter Form vorlag. Nach einer Fütterungsphase von 25 bis 27 Tagen wurden am 26., 27. und 28. Versuchstag je 2 Ferkel jeder Gruppe getötet. Ihnen wurde Blut, Mesenteriallymphknoten und Ileumgewebe entnommen. Zusätzlich wurde die Digesta des Magens, des vorderen, mittleren und hinteren Jejunums, des Caecums und des Colons gewonnen. Neben zootechnischen Daten (Gesundheitszustand, Lebendmasse, Futteraufnahme) wurden verdauungsphysiologische Parameter anhand der scheinbaren praecaecalen Verdaulichkeit von Rohnährstoffen, dem pH-Wert und der Trockensubstanz der Digesta untersucht. Die Freisetzung der gecoateten mkFs wurde durch die Messung der mkFs-Konzentrationen in den verschiedenen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts geprüft. Einflüsse der mkFs auf die intestinale Mikrobiota wurden im hinteren Jejunum und Caecum anhand der kulturellen Keimzahlbestimmung für aerobe, anaerobe und coliforme Bakterien überprüft. In der Magendigesta wurde die Konzentration von Laktobazillen, Eubakterien und *Escherichia ssp.* mittels qPCR beurteilt. Zusätzlich wurden bakterielle Metaboliten (kurzkettige Fettsäuren, Laktat- und Ammoniumkonzentration) bestimmt. Die immunmodulatorische Wirkung der mkFs wurde anhand der Phagozytoseleistung der Blut-Neutrophilen mittels Phagotest<sup>®</sup>, der durchflusszytometrischen Bestimmung der relativen Anteile der CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>-, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten und der MHC<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>-, MHC<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>-, MHC<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>-Zellen im Blut sowie den Mesenteriallymphknoten und der Proliferationsleistung der peripheren Blutlymphozyten nach Con A- und LPS-Stimulation beurteilt. Im Ileumgewebe wurde mittels der qPCR die Expression der Zytokine MIP1 $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und MCP1 auf mRNA-Ebene bestimmt.

Der Gesundheitsstatus und die Lebendmassezunahme der Ferkel wurden nicht beeinflusst. Die scheinbare praecaecale Verdaulichkeit des Rohproteins war beim Einsatz der gecoateten mkFs von 63,9 ( $\pm$ 5,33) % (Kontrollgruppe) auf 72,1 ( $\pm$ 8,85) % erhöht. In der Magendigesta der beiden Versuchsgruppen konnte eine signifikant höhere mkFs-Konzentration nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf des Gastrointestinaltrakts zeigte sich eine Konzentrationsabnahme unter das als wirksam erachtete Niveau. Es wurde dabei kein Unterschied zwischen den frei eingesetzten und den gecoateten mkFs festgestellt. Die kulturelle Lebendkeimzahlbestimmung ergab im hinteren Jejunum eine signifikant höhere

Koloniezahl der coliformen Bakterien in den Versuchsgruppen ( $p \leq 0,05$ ). Die Ammoniumkonzentrationen waren in diesem Abschnitt für diese Gruppen signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ ). Für Laktat und die kurzkettigen Fettsäuren konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Die mittels qPCR erfassten Keimzahlen der Magendigesta waren in der mit gecoateten mkFs gefütterten Gruppe für die Eubakterien ( $p \leq 0,05$ ) und für die *Escherichia ssp.* ( $p \leq 0,01$ ) erhöht. Die immunologischen Parameter zeigten keine signifikante Beeinflussung durch den Einsatz der mkFs.

Der Einsatz der beiden mkFs-enthaltenden Produkte wies im Rahmen dieser Studie keine Beeinflussung der untersuchten Mikrobiota und der mikrobiellen Stoffwechselprodukte im Gastrointestinaltrakt auf. Das eingesetzte Coating konnte die rasche Absorption der mkFs nicht beeinflussen. Es wird angenommen, dass sowohl die in dieser Studie eingesetzten Konzentrationen der mkFs zu gering waren als auch der hohe pH-Wert der Magendigesta die Wirksamkeit der mkFs negativ beeinflusste. Daher sollten in weiteren Studien höhere Konzentrationen bzw. Kombinationen mit z.B. organischen Säuren eingesetzt werden, um die möglichen positiven Effekte der mkFs als Zusatz zur Ration des Absetzferkels zu überprüfen.

## Summary

Susanne Buchheit: **Medium-chain fatty acids as feed additives in weaned piglets**

The antibacterial effects of medium-chain fatty acids (mcfa) are described in the literature. In this study, mcfa were fed to weaned piglets as dietary supplement in order to evaluate the effects on intestinal microbiota and immune system. Two different forms of mcfa were compared, free mcfa and coated mcfa.

The animals were divided in three treatment groups with 12 animals each. Two experiments were carried out under identical conditions with 6 animals per group. The control group A was provided a standard piglet diet, group B was additionally supplemented with 0.3% (w/w) of a commercial product containing the free forms of caprylic and capric acid and flavouring compounds. Group C was offered a supplement of 0.3% (w/w) of the coated forms of the acids. After a feeding period of 25 to 27 days, two animals per group were sacrificed. Blood and tissue samples of the mesenterial lymph nodes and small intestine were taken; the digesta of the stomach, of the jejunum, the caecum and the colon were collected. Apparent precaecal digestibility of crude nutrients, change of pH-value and dried matter weight of the digesta were measured. Impact of mcfa on the gut flora was determined by viable count of total aerobe, total anaerobe and coliform bacteria in the digesta of distal jejunum and caecum. Bacteria in the stomach digesta were detected by qPCR, thus determining the number of lactic acid bacteria, eubacteria and *Escherichia spp.*. The digesta samples were also tested for a broad variety of bacterial metabolites such as scfa, lactate and ammonium. The potential of immunomodulation of mcfa was evaluated by considering different parameters, as there are: determination of phagocytic activity of isolated blood-neutrophils by Phagotest<sup>®</sup>, flow cytometric measuring of the relative proportion of CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-lymphocytes and MHC<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>-, MHC<sup>+</sup>CD21<sup>-</sup>-, MHC<sup>+</sup>CD21<sup>+</sup>-cells in the blood and in the mesenterial lymph nodes, and proliferative activity of peripheral blood lymphocytes after stimulation with Con A and LPS. The ileum tissue samples were tested for possible changes in cytokine mRNA expression of MIP1beta, IL1beta, IFN gamma, TNF alpha and MCP1 by qPCR.

Health status and weight gain of the piglets were not affected. A slight increase of apparent precaecal digestibility of crude protein from 63,9 (±5,33) % in the control group to 72,1 (±8,85) % was observed in group C. A significantly higher concentration of mcfa was detected in the stomach samples of both experimental groups. The concentrations dropped rapidly to a non-active level during the passage through the digestive tract. The free form and the coated form of mcfa showed no difference. The determination of bacteria by cultural analysis revealed a significant increase of coliform bacteria in the distal jejunum of the experimental groups ( $p \leq 0,05$ ). In this intestinal segment also the ammonium concentration was found to be significantly increased ( $p \leq 0,05$ ). There have been no difference in lactate and short-chain fatty acid concentrations among the groups. The average counts for eubacteria and *Escherichia ssp.* were determined by qPCR in the stomach digesta and found to be increased in the group supplemented with the coated product ( $p \leq 0,05$  and  $p \leq 0,01$ , respectively). Immunological parameters were not changed due to the application of mcfa.

Within this trial, both mcfa-containing products could not effect the microbiota and the bacterial metabolities in the gastrointestinal tract. Coating of mcfa could not prevent their fast absorption during the gastrointestinal passage. Probably the concentrations used in this study were to low and out of the effective range. Secondly, the pH-value of the stomach might have a negative influence on the mcfa-derived effects. For further studies, an increase of dietary mcfa-concentrations, probably in combination with an organic acid, would be indicated to get more pronounced positive effects.

## Zitierte Literatur

Verordnung zum Schutz landwirtschaftlicher Nutztiere und anderer zur Erzeugung tierischer Produkte gehaltener Tiere bei ihrer Haltung (Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung - TierSchNutztV) vom 22. August 2006 (BGBl. I S. 2043), geändert durch die Verordnung vom 30. November 2006 (BGBl. I S. 2759)

Allee, G. L., Romsos, D. R., Leveille, G. A., Baker, D. H. (1972):  
Metabolic consequences of dietary medium-chain triglycerides in the pig.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **139**: 422-427

Altherr, B. J. H. (2005):  
Untersuchungen zum Einfluss von *Bacillus cereus* var. *toyoi* auf die zelluläre Immunität des Schweines.  
Freie Universität Berlin, Diss.

Anderson, D. B., McCracken, V. J., Aminov, R. I., Simpson, J. M., Mackie, R. I., Verstegen, M. W. A., Gaskins, H. R. (1999):  
Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine.  
Pig News and Information **20**: 115N-122N

Andoh, A., Takaya, H., Araki, Y., Tsujikawa, T., Fujiyama, Y., Bamba, T. (2000):  
Medium- and long-chain fatty acids differentially modulate interleukin-8 secretion in human fetal intestinal epithelial cells.  
J. Nutr. **130**: 2636-2640

Anonym (1984):  
Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren nach §35 LMBG. Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30°C in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Tropfplatten-Verfahren. L06.00/19.,

Appleyard, G. D., Wilkie, B. N. (1998):  
Characterization of porcine CD5 and CD5+ B cells.  
Clin. Exp. Immunol. **111**: 225-230

Aw, T. Y., Grigor, M. R. (1980):  
Digestion and absorption of milk triacylglycerols in 14-day-old suckling rats.  
J. Nutr. **110**: 2133-2140

Azain, M. J. (1993):  
Effects of adding medium-chain triglycerides to sow diets during late gestation and early lactation on litter performance.  
J. Anim. Sci. **71**: 3011-3019

Bach, A. C., Babayan, V. K. (1982):  
Medium-chain triglycerides: an update.  
Am. J. Clin. Nutr. **36**: 950-962

- Bach Knudsen, K. E., Jensen, B. B., Andersen, J. O., Hansen, I. (1991):  
Gastrointestinal implications in pigs of wheat and oat fractions. 2. Microbial activity in the gastrointestinal tract.  
*Br. J. Nutr.* **65**: 233-248
- Bellinati-Pires, R., Waitzberg, D. L., Salgado, M. M., Carneiro-Sampaio, M. M. (1992):  
Effect of medium- and long-chain triglycerides on human neutrophil migration.  
*Braz. J. Med. Biol. Res.* **25**: 369-373
- Bellinati-Pires, R., Waitzberg, D. L., Salgado, M. M., Carneiro-Sampaio, M. M. (1993):  
Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions: evaluation of phagocytosis, bacterial killing, and oxidative activity.  
*J. Leukoc. Biol.* **53**: 404-410
- Bennell, M. A., Husband, A. J. (1981):  
Route of lymphocyte migration in pigs. I. Lymphocyte circulation in gut-associated lymphoid tissue.  
*Immunology* **42**: 469-474
- Bergman, E. N. (1990):  
Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.  
*Physiol. Rev.* **70**: 567-590
- Bergner, H., Sommer, A. (1994):  
[Use of free fatty acids in animal nutrition].  
*Arch. Tierernähr.* **46**: 217-236
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Karlsson, S. M., Steingrimsson, O., Thormar, H. (1998):  
In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **42**: 2290-2294
- Bergsson, G., Steingrimsson, O., Thormar, H. (1999):  
In vitro susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* to fatty acids and monoglycerides.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 2790-2792
- Bergsson, G., Steingrimsson, O., Thormar, H. (2002):  
Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*.  
*Int. J. Antimicrob. Agents* **20**: 258-262
- Bertschinger, H. U., Bachmann, M., Mettler, C., Pospischil, A., Schraner, E. M., Stamm, M., Sydler, T., Wild, P. (1990):  
Adhesive fimbriae produced in vivo by *Escherichia coli* O139:K12(B):H1 associated with enterotoxaemia in pigs.  
*Vet. Microbiol.* **25**: 267-281
- Beutler, B., Rietschel, E. T. (2003):  
Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin.  
*Nat. Rev. Immunol.* **3**: 169-176

- Bianchi, A. T., van der Heijden, P. J. (1994):  
Antigen presenting cells and B-cells in the pig.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**: 63-68
- Binns, R. M. (1982):  
Organisation of the lymphoreticular system and lymphocyte markers in the pig.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **3**: 95-146
- Braun, F., Hosseini, M., Wieland, E., Sattler, B., Muller, A. R., Fandrich, F., Kremer, B., Ringe, B. (2004):  
Kinetics and localization of interleukin-2, interleukin-6, heat shock protein 70, and interferon gamma during intestinal-reperfusion injury.  
*Transplant. Proc.* **36**: 267-269
- Brodersen, R., Bijlsma, F., Gori, K., Jensen, K. T., Chen, W., Dominguez, J., Haverson, K., Moore, P. F., Saalmuller, A., Sachs, D., Slierendrecht, W. J., Stokes, C., Vainio, O., Zuckermann, F., Aasted, B. (1998):  
Analysis of the immunological cross reactivities of 213 well characterized monoclonal antibodies with specificities against various leucocyte surface antigens of human and 11 animal species.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **64**: 1-13
- Brooks, P. H., Moran, C. A., Beal, J. D., Demeckova, V., Campbell, A. (2001):  
Liquid feeding for the young piglet.  
In: *The Weaner Pig: Nutrition and Management*. Hrsg. M. A. Varley und J. Wiseman, Wallingford: CAB International. S. 153-178.
- Buenestado, A., Cortijo, J., Sanz, M. J., Naim-Abu-Nabah, Y., Martinez-Losa, M., Mata, M., Issekutz, A. C., Marti-Bonmati, E., Morcillo, E. J. (2006):  
Olive oil-based lipid emulsion's neutral effects on neutrophil functions and leukocyte-endothelial cell interactions.  
*J. Parenter. Enteral Nutr.* **30**: 286-296
- Canas-Rodriguez, A., Smith, H. W. (1966):  
The identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits.  
*Biochem. J.* **100**: 79-82
- Cera, K. R., Mahan, D. C., Cross, R. F., Reinhart, G. A., Whitmoyer, R. E. (1988):  
Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine.  
*J. Anim. Sci.* **66**: 574-584
- Cera, K. R., Mahan, D. C., Reinhart, G. A. (1989):  
Apparent fat digestibilities and performance responses of postweaning swine fed diets supplemented with coconut oil, corn oil and tallow  
*J. Anim. Sci.* **67**: 2040-2047
- Cera, K. R., Mahan, D. C., Reinhart, G. A. (1989):  
Postweaning Swine Performance and Serum Profile Responses to Supplemental Medium-Chain Free Fatty Acids and Tallow.  
*J. Anim. Sci.* **67**: 2048-2055

- Cera, K. R., Mahan, D. C., Reinhart, G. A. (1990):  
Evaluation of various extracted vegetable oils, roasted soybeans, medium-chain triglyceride and an animal-vegetable fat blend for postweaning swine.  
*J. Anim. Sci.* **68**: 2756-2765
- Cherrington, C. A., Hinton, M., Mead, G. C., Chopra, I. (1991):  
Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications.  
*Adv. Microb. Physiol.* **32**: 87-108
- Claus, R., Günther, D., Letzguß, H. (2007):  
Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig.  
*J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **91**: 312-318
- Coates, M. E. (1980):  
The gut microflora and growth.  
In: *Growth in Animals*. Hrsg. T. Lawrence, Boston MA: Butterworths. S. 175-180.
- Collignon, P. (2004):  
Antibiotic growth promoters.  
*J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 272; author reply 276-278
- Cuthbert, J. A., Lipsky, P. E. (1986):  
Promotion of human T lymphocyte activation and proliferation by fatty acids in low density and high density lipoproteins.  
*J. Biol. Chem.* **261**: 3620-3627
- Czernichow, B., Galluser, M., Cui, S. Q., Gosse, F., Raul, F. (1996):  
Comparison of enteral or parenteral administration of medium chain triglycerides on intestinal mucosa in adult rats.  
*Nutr. Res.* **16**: 797-804
- Darcy-Vrillon, B., Cherbuy, C., Morel, M. T., Durand, M., Duee, P. H. (1996):  
Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes: modulation by NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.  
*Mol. Cell. Biochem.* **156**: 145-151
- De Rodas, B., Maxwell, C. (1990):  
The effect of fat source and medium-chain triglyceride level on performance of the early-weaning pig.  
*Anim. Sci. Res. Rep.*: 278-287
- Decuypere, J. A., Dierick, N. A. (2003):  
The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to in-feed antibiotics in piglets: concept, possibilities and limitations. An overview.  
*Nutr. Res. Rev.* **16**: 193-209

Denham, S., Shimizu, M., Bianchi, A. T., Zwart, R. J., Carr, M. M., Parkhouse, R. M. (1994):  
Monoclonal antibodies recognising differentiation antigens on porcine B cells.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**: 259-267

Denham, S., Zwart, R. J., Whittall, J. T., Pampusch, M., Corteyn, A. H., Bianchi, A. T.,  
Murtaugh, M. P., Parkhouse, R. M., Tlaskalova, H., Sinkora, J., Sinkora, M., Rehakova, Z.  
(1998):  
Monoclonal antibodies putatively identifying porcine B cells.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **60**: 317-328

Devlin, A., Innis, S. M., Wall, K., Krisinger, J. (1996):  
Effect of medium-chain triglycerides on calbindin-D9k expression in the intestine.  
*Lipids* **31**: 547-549

Dierick, N., Michiels, J., Van Nevel, C. (2004):  
Effect of medium chain fatty acids and benzoic acid, as alternatives for antibiotics, on growth  
and some gut parameters in piglets.  
*Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **69**: 187-190

Dierick, N. A., Decuypere, J. A., Degeyter, I. (2003):  
The combined use of whole Cuphea seeds containing medium chain fatty acids and an  
exogenous lipase in piglet nutrition.  
*Arch. Tierernähr.* **57**: 49-63

Dierick, N. A., Decuypere, J. A., Molly, K., van Beek, E., Vanderbeke, E. (2002a):  
The combined use of triacylglycerols containing medium-chain fatty acids (MCFAs) and  
exogenous lipolytic enzymes as an alternative for nutritional antibiotics in piglet nutrition I. In  
vitro screening of the release of MCFAs from selected fat sources by selected exogenous  
lipolytic enzymes under simulated pig gastric conditions and their effects on the gut flora of  
piglets.  
*Livest. Prod. Sci.* **75**: 129-142

Dierick, N. A., Decuypere, J. A., Molly, K., van Beek, E., Vanderbeke, E. (2002b):  
The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium chain fatty acids (MCFAs)  
and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition.  
II. In vivo release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and  
exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance  
*Livest. Prod. Sci.* **76**: 1-16

Dierick, N. A., Vervaeke, I., Decuypere, J. A., Henderickx, H. K. (1986a):  
Influence of the gut flora and of some growth-promoting feed additives on nitrogen  
metabolism in pigs. I. Studies in vitro.  
*Livest. Prod. Sci.* **14**: 161-176

Dierick, N. A., Vervaeke, I., Decuypere, J. A., Henderickx, H. K. (1986b):  
Influence of the gut flora and of some growth-promoting feed additives on nitrogen  
metabolism in pigs. II. Studies in vivo.  
*Livest. Prod. Sci.* **14**: 177-193

Dove, C. R. (1993):

The effect of adding copper and various fat sources to the diets of weanling swine on growth performance and serum fatty acid profiles.

J. Anim. Sci. **71**: 2187-2192

Dreau, D., Lallès, J. P. (1999):

Contribution to the study of gut hypersensitivity reactions to soybean proteins in preruminant calves and early-weaned piglets.

Livest. Prod. Sci. **60**: 209-218

Eklund, T. (1983):

The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels.

J. Appl. Bacteriol. **54**: 383-389

Engelhardt, W., Breves, G. (2005):

Physiologie der Haustiere

Enke Verlag, Stuttgart

Fakler, T., Sohn, K., Maxwell, C. (1992):

Effect of protein and fat source on performance in early weaned pigs.

Oklahoma Agriculture Experimental Station Research Report: 366-372

Fay, J. P., Farias, R. N. (1975):

The inhibitory action of fatty acids on the growth of *Escherichia coli*.

J. Gen. Microbiol. **91**: 233-240

Fenwick, B. W., Osburn, B. I. (1986):

Immune responses to the lipopolysaccharides and capsular polysaccharides of *Haemophilus pleuropneumoniae* in convalescent and immunized pigs.

Infect. Immun. **54**: 575-582

Freese, E., Sheu, C. W., Galliers, E. (1973):

Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives.

Nature **241**: 321-325

Freitag, M. (1999):

Leistungsförderer: Chancen, Risiken und Alternativen.

top agrar **1**: 6-9

Galluser, M., Czernichow, B., Dreyfus, H., Gosse, F., Guerold, B., Kachelhoffer, J., Doffoel, M., Raul, F. (1993):

Comparison of different lipid substrates on intestinal adaptation in the rat.

Gut **34**: 1069-1074

Gaskins, H. R., Collier, C. T., Anderson, D. B. (2002):

Antibiotics as growth promotants: mode of action.

Anim. Biotechnol. **13**: 29-42

- Gatlin, L. A., Odle, J., Soede, J., Hansen, J. A. (2002):  
Dietary medium- or long-chain triglycerides improve body condition of lean-genotype sows and increase suckling pig growth.  
*J. Anim. Sci.* **80**: 38-44
- Gerner, W., Kaser, T., Saalmuller, A. (2008):  
Porcine T lymphocytes and NK cells-An update.  
*Dev. Comp. Immunol.* **33**: 310-320
- Goppelt, M., Kohler, L., Resch, K. (1985):  
Functional role of lipid metabolism in activated T-lymphocytes.  
*Biochim. Biophys. Acta* **833**: 463-472
- Greenberger, N. J., Franks, J. J., Isselbacher, K. J. (1965):  
Metabolism of 1c14 octanoic and 1c14 palmitic acid by rat intestinal slices.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **120**: 468-472
- Grippa, E., Valla, R., Battinelli, L., Mazzanti, G., Saso, L., Silvestrini, B. (1999):  
Inhibition of *Candida rugosa* lipase by berberine and structurally related alkaloids, evaluated by high-performance liquid chromatography.  
*Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 1557-1562
- Guillot, E., Vaugelade, P., Lemarchal, P., Rerat, A. (1993):  
Intestinal absorption and liver uptake of medium-chain fatty acids in non-anaesthetized pigs.  
*Br. J. Nutr.* **69**: 431-442
- Hamosh, M., Bitman, J., Liao, T. H., Mehta, N. R., Buczek, R. J., Wood, D. L., Grylack, L. J., Hamosh, P. (1989):  
Gastric lipolysis and fat absorption in preterm infants: effect of medium-chain triglyceride or long-chain triglyceride-containing formulas.  
*Pediatrics* **83**: 86-92
- Hara, Y., Miura, S., Komoto, S., Inamura, T., Koseki, S., Watanabe, C., Hokari, R., Tsuzuki, Y., Ogino, T., Nagata, H., Hachimura, S., Kaminogawa, S., Ishii, H. (2003):  
Exposure to fatty acids modulates interferon production by intraepithelial lymphocytes.  
*Immunol. Lett.* **86**: 139-148
- Heinritz, K., Gindele, H. R., Reiner, G., Schnurrbusch, U. (2006):  
*Schweinekrankheiten 1. Auflage*  
UTB, Stuttgart
- Hof, H., Müller, L., Dörries, R. (2000):  
*Mikrobiologie Duale Reihe*  
Thieme Stuttgart
- Hristov, A. N., Ivan, M., McAllister, T. A. (2004):  
In vitro effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barley-based diet.  
*J. Anim. Sci.* **82**: 2693-2704

- Hsiao, C. P., Siebert, K. J. (1999):  
Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria.  
*Int. J. Food Microbiol.* **47**: 189-201
- Iba, T., Yagi, Y., Kidokoro, A., Ohno, Y., Kaneshiro, Y., Akiyama, T. (1998):  
Total parenteral nutrition supplemented with medium-chain triacylglycerols prevents atrophy  
of the intestinal mucosa in septic rats.  
*Nutrition* **14**: 667-671
- Ikeda, Y., Okamura-Ikeda, K., Tanaka, K. (1985):  
Purification and characterization of short-chain, medium-chain, and long-chain acyl-CoA  
dehydrogenases from rat liver mitochondria. Isolation of the holo- and apoenzymes and  
conversion of the apoenzyme to the holoenzyme.  
*J. Biol. Chem.* **260**: 1311-1325
- Imoto, S., Namioka, S. (1978):  
VFA metabolism in the pig.  
*J. Anim. Sci.* **47**: 479-487
- Innis, S. M., Quinlan, P., Diersen-Schade, D. (1993):  
Saturated fatty acid chain length and positional distribution in infant formula: effects on  
growth and plasma lipids and ketones in piglets.  
*Am. J. Clin. Nutr.* **57**: 382-390
- Isaacs, C. E. (2001):  
The antimicrobial function of milk lipids.  
*Adv. Nutr. Res.* **10**: 271-285
- Isaacs, C. E., Kashyap, S., Heird, W. C., Thormar, H. (1990):  
Antiviral and antibacterial lipids in human milk and infant formula feeds.  
*Arch. Dis. Child.* **65**: 861-864
- Isaacs, C. E., Litov, R. E., Thormar, H. (1995):  
Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk.  
*J. Nutr. Biochem.* **6**: 362-366
- Isaacs, C. E., Thormar, H., Pessolano, T. (1986):  
Membrane-disruptive effect of human milk: inactivation of enveloped viruses.  
*J. Infect. Dis.* **154**: 966-971
- Janeway, C. A., Travers, P. (2002):  
*Immunologie*  
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- Jean-KuoBin, Chiang-ShuHsing (1999):  
Increased survival of neonatal pigs by supplementing medium-chain triglycerides in late-  
gestating sow diets.  
*Anim. Feed Sci. Technol.* **76**: 241-250

Jenkins, A. P., Thompson, R. P. (1993):

Does the fatty acid profile of dietary fat influence its trophic effect on the small intestinal mucosa?

Gut **34**: 358-364

Jenkins, K. J., Kramer, J. K., Sauer, F. D., Emmons, D. B. (1985):

Influence of triglycerides and free fatty acids in milk replacers on calf performance, blood plasma, and adipose lipids.

J Dairy Sci **68**: 669-680

Jeukendrup, A. E., Aldred, S. (2004):

Fat supplementation, health, and endurance performance.

Nutrition **20**: 678-688

Jungi, T. W. (2000):

Klinische Veterinärimmunologie

Enke Verlag, Stuttgart

Kabara, J. J., Swieczkowski, D. M., Conley, A. J., Truant, J. P. (1972):

Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents.

Antimicrob. Agents. Chemother. **2**: 23-28

Kamphues, J. (1984):

Neue Erkenntnisse zur nutritiv bedingten Diarrhoe der Absetzferkel.

Prakt. Tierarzt **65**: 1116-1122

Kanai, K., Kondo, E. (1979):

Antibacterial and cytotoxic aspects of long-chain fatty acids as cell surface events: selected topics.

Jpn. J. Med. Sci. Biol. **32**: 135-174

Kim, J., Chae, C. (2004):

Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 in porcine circovirus 2-induced granulomatous inflammation.

J. Comp. Pathol. **131**: 121-126

Klär, I. (2008):

Einfluss der Verfütterung des Probiotiums *E.faecium* NCIMB 10415 im frühen postnatalen Stadium auf die Zusammensetzung und Stoffwechselaktivität der gastrointestinalen Mikrobiota bei Ferkeln.

Freie Universität Berlin, Diss.

König, H. E., Liebich, H.-G. (2005):

Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis 3. Auflage Schattauer, Stuttgart

Kono, H., Fujii, H., Asakawa, M., Maki, A., Amemiya, H., Hirai, Y., Matsuda, M., Yamamoto, M. (2004):

Medium-chain triglycerides enhance secretory IgA expression in rat intestine after administration of endotoxin.

Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. **286**: G1081-1089

- Lai, H., Chen, W. (2000):  
Effects of medium-chain and long-chain triacylglycerols in pediatric surgical patients.  
*Nutrition* **16**: 401-406
- Lallès, J. P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C. R. (2007):  
Nutritional management of gut health in pigs around weaning.  
*Proc. Nutr. Soc.* **66**: 260-268
- Le Dividich, J., Sève, B. (2000):  
Effects of underfeeding during the weaning period on growth, metabolism, and hormonal adjustments in the piglet.  
*Domest. Anim. Endocrinol.* **19**: 63-74
- Li, D. F., Thaler, R. C., Nelssen, J. L., Harmon, D. L., Allee, G. L., Weeden, T. L. (1990):  
Effect of fat sources and combinations on starter pig performance, nutrient digestibility and intestinal morphology.  
*J. Anim. Sci.* **68**: 3694-3704
- Lin, C. L., Chiang, S. H., Lee, H. F. (1995):  
Causes of reduced survival of neonatal pigs by medium-chain triglycerides: blood metabolite and behavioral activity approaches.  
*J. Anim. Sci.* **73**: 2019-2025
- Lindmark, T., Kimura, Y., Artursson, P. (1998):  
Absorption enhancement through intracellular regulation of tight junction permeability by medium chain fatty acids in Caco-2 cells.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**: 362-369
- Lindmark, T., Nikkila, T., Artursson, P. (1995):  
Mechanisms of absorption enhancement by medium chain fatty acids in intestinal epithelial Caco-2 cell monolayers.  
*J. Pharmacol. Exp. Ther.* **275**: 958-964
- Lunney, J. K., Pescovitz, M. D. (1987):  
Phenotypic and functional characterization of pig lymphocyte populations.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **17**: 135-144
- Lyons, S. R., Griffen, A. L., Leys, E. J. (2000):  
Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria.  
*J. Clin. Microbiol.* **38**: 2362-2365
- Mabayo, R. T., Furuse, M., Murai, A., Okumura, J. (1994):  
Interactions between medium-chain and long-chain triacylglycerols in lipid and energy metabolism in growing chicks.  
*Lipids* **29**: 139-144
- Mabayo, R. T., Furuse, M., Yang, S. I., Okumura, J. (1992):  
Medium-chain triacylglycerols enhance release of cholecystokinin in chicks.  
*J. Nutr.* **122**: 1702-1705

- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttila, T., Palva, A. (2003):  
Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected faecal bacteria.  
*Microbiology* **149**: 269-277
- Marten, B., M., P., J., S. (2006):  
Medium-chain triglycerides.  
*Int. Dairy J.* **16**: 1374-1382
- Mateu, E., Martin, M. (2000):  
Antimicrobial resistance in enteric porcine *Escherichia coli* strains in Spain.  
*Vet. Rec.* **146**: 703-705
- Mateu, E., Martin, M. (2001):  
Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well?  
*J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **48**: 569-581
- McCracken, B. A., Gaskins, H. R., Ruwe-Kaiser, P. J., Klasing, K. C., Jewell, D. E. (1995):  
Diet-dependent and diet-independent metabolic responses underlie growth stasis of pigs at weaning.  
*J. Nutr.* **125**: 2838-2845
- 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
- Miura, S., Imaeda, H., Shiozaki, H., Ohkubo, N., Tashiro, H., Serizawa, H., Tsuchiya, M., Tso, P. (1993):  
Increased proliferative response of lymphocytes from intestinal lymph during long chain fatty acid absorption.  
*Immunology* **78**: 142-146
- Modi, W. S., Lautenberger, J., An, P., Scott, K., Goedert, J. J., Kirk, G. D., Buchbinder, S., Phair, J., Donfield, S., O'Brien, S. J., Winkler, C. (2006):  
Genetic variation in the CCL18-CCL3-CCL4 chemokine gene cluster influences HIV Type 1 transmission and AIDS disease progression.  
*Am. J. Hum. Genet.* **79**: 120-128
- Molbak, K. (2004):  
Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences.  
*J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* **51**: 364-369
- Moxley, R. A. (2000):  
Edema disease.  
*Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **16**: 175-185
- Murtaugh, M. P. (1994):  
Porcine cytokines.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**: 37-44

Naumann, C., Bassler, C. (2004):

Die chemische Untersuchung von Futtermitteln 3. Aufl., 5. Ergänzungslieferung 2004  
VDLUFA-Verlag, Darmstadt

Newcomb, M. D., Harmon, D. L., Nelssen, J. L., Thulin, A. J., Allee, G. L. (1991):

Effect of energy source fed to sows during late gestation on neonatal blood metabolite homeostasis, energy stores and composition.

J. Anim. Sci. **69**: 230-236

Newport, M. J., Storry, J. E., Tuckley, B. (1979):

Artificial rearing of pigs. 7. Medium chain triglycerides as a dietary source of energy and their effect on live-weight gain, feed:gain ratio, carcass composition and blood lipids.

Br. J. Nutr. **41**: 85-93

Odle, J. (1997):

New insights into the utilization of medium-chain triglycerides by the neonate: observations from a piglet model.

J. Nutr. **127**: 1061-1067

Odle, J. (1999):

Medium-chain triglycerides: a unique energy source for neonatal pigs.

Pig News and Information **20**: 25N-32N

Odle, J., Benevenga, N. J., Crenshaw, T. D. (1991):

Utilization of medium-chain triglycerides by neonatal piglets: chain length of even- and odd-carbon fatty acids and apparent digestion/absorption and hepatic metabolism.

J. Nutr. **121**: 605-614

Pabst, R. (1987):

The anatomical basis for the immune function of the gut.

Anat. Embryol. (Berl) **176**: 135-144

Pescovitz, M. D., Aasted, B., Canals, A., Dominguez, J., Vizcaino, J. S., Pospisil, R.,

Trebichavsky, I., Salmon, H., Valpotic, I., Davis, W. C., al., e. (1994):

Analysis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD4 antigen.

Vet. Immunol. Immunopathol. **43**: 233-236

Pescovitz, M. D., Sakopoulos, A. G., Gaddy, J. A., Husmann, R. J., Zuckermann, F. A. (1994):

Porcine peripheral blood CD4+/CD8+ dual expressing T-cells.

Vet. Immunol. Immunopathol. **43**: 53-62

Petschow, B. W., Batema, R. P., Ford, L. L. (1996):

Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids.

Antimicrob. Agents Chemother. **40**: 302-306

Petschow, B. W., Batema, R. P., Talbott, R. D., Ford, L. L. (1998):

Impact of medium-chain monoglycerides on intestinal colonisation by *Vibrio cholerae* or enterotoxigenic *Escherichia coli*.

J. Med. Microbiol. **47**: 383-389

- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., Dempfle, L. (2002):  
Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.  
*Nucleic Acids Res.* **30**: e36
- Phillips, I. (2007):  
Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health.  
*Int. J. Antimicrob. Agents* **30**: 101-107
- Phillips, I. (2008):  
Withdrawal of growth-promoting antibiotics: comments on Commentary.  
*Int. J. Antimicrob. Agents* **31**: 82-83
- Pie, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., Oswald, I. P. (2004):  
Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets.  
*J. Nutr.* **134**: 641-647
- Piva, A., Anfossi, P., Meola, E., Pietri, A., Panciroli, A., Bertuzzi, T., Formigoni, A. (1997):  
Effect of microcapsulation on absorption processes in pig.  
*Livest. Prod. Sci.* **51**: 53-61
- Piva, A., Pizzamiglio, V., Morlacchini, M., Tedeschi, M., Piva, G. (2007):  
Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine.  
*J. Anim. Sci.* **85**: 486-493
- Pluske, J. R., Hampson, D. J., Williams, I. H. (1997):  
Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review.  
*Livest. Prod. Sci.* **51**: 215-236
- Pluske, J. R., Siba, P. M., Pethick, D. W., Durmic, Z., Mullan, B. P., Hampson, D. J. (1996):  
The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine.  
*J. Nutr.* **126**: 2920-2933
- Preston, A., Mandrell, R. E., Gibson, B. W., Apicella, M. A. (1996):  
The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria.  
*Crit. Rev. Microbiol.* **22**: 139-180
- Reimund, J. M., Scheer, O., Muller, C. D., Pinna, G., Duclos, B., Baumann, R. (2004):  
In vitro modulation of inflammatory cytokine production by three lipid emulsions with different fatty acid compositions.  
*Clin. Nutr.* **23**: 1324-1332
- Reiner, D. S., Wang, C. S., Gillin, F. D. (1986):  
Human milk kills *Giardia lamblia* by generating toxic lipolytic products.  
*J. Infect. Dis.* **154**: 825-832

- Richter, A., Löscher, W., Witte, W. (1996):  
Leistungsförderer mit antimikrobieller Wirkung: Probleme aus pharmakologisch-toxikologischer und mikrobiologischer Sicht.  
Prakt. Tierarzt **7**: 603-622
- Rothkötter, H. J., Geist, M., Fritz, F. J., Pabst, R. (1988):  
Age-dependence of lymphocyte production in Peyer's patch follicles in contrast to the other Peyer's patch compartments and the thymus.  
Adv. Exp. Med. Biol. **237**: 81-85
- Roy, C. C., Ste-Marie, M., Chartrand, L., Weber, A., Bard, H., Doray, B. (1975):  
Correction of the malabsorption of the preterm infant with a medium-chain triglyceride formula.  
J. Pediatr. **86**: 446-450
- Saalmüller, A. (2006):  
New understanding of immunological mechanisms.  
Vet. Microbiol. **117**: 32-38
- Saalmüller, A., Aasted, B., Canals, A., Dominguez, J., Goldman, T., Lunney, J. K., Maurer, S., Pescovitz, M. D., Pospisil, R., Salmon, H., et al. (1994):  
Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD5.  
Vet. Immunol. Immunopathol. **43**: 237-242
- Saalmüller, A., Bryant, J. (1994):  
Characteristics of porcine T lymphocytes and T-cell lines.  
Vet. Immunol. Immunopathol. **43**: 45-52
- Saalmüller, A., Hirt, W., Reddehase, M. J. (1989):  
Phenotypic discrimination between thymic and extrathymic CD4-CD8- and CD4+CD8+ porcine T lymphocytes.  
Eur. J. Immunol. **19**: 2011-2016
- Saalmüller, A., Reddehase, M. J., Buhning, H. J., Jonjic, S., Koszinowski, U. H. (1987):  
Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes.  
Eur. J. Immunol. **17**: 1297-1301
- Sakata, T. (1987):  
Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors.  
Br. J. Nutr. **58**: 95-103
- Sakata, T., Kojima, T., Fujieda, M., Miyakozawa, M., Takahashi, M., Ushida, K. (1999):  
Probiotic preparations dose-dependently increase net production rates of organic acids and decrease that of ammonia by pig cecal bacteria in batch culture.  
Dig. Dis. Sci. **44**: 1485-1493

- Sato, H., Nitanaï, A., Kurosawa, T., Oikawa, S. (2004):  
Anticoccidial efficacy of medium-chain triglycerides (MCT) in calves.  
*J. Vet. Med. Sci.* **66**: 1583-1585
- Sheu, C. W., Freese, E. (1973):  
Lipopolysaccharide layer protection of gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids.  
*J. Bacteriol.* **115**: 869-875
- Sheu, C. W., Salomon, D., Simmons, J. L., Sreevalsan, T., Freese, E. (1975):  
Inhibitory effects of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian cells.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **7**: 349-363
- Smith, S. (1980):  
Mechanism of chain length determination in biosynthesis of milk fatty acids.  
*J. Dairy Sci.* **63**: 337-352
- Solomon, M. F., Kuziel, W. A., Mann, D. A., Simeonovic, C. J. (2003):  
The role of chemokines and their receptors in the rejection of pig islet tissue xenografts.  
*Xenotransplant.* **10**: 164-177
- Sprong, R. C., Hulstein, M. F., Van der Meer, R. (1999):  
High intake of milk fat inhibits intestinal colonization of *Listeria* but not of *Salmonella* in rats.  
*J. Nutr.* **129**: 1382-1389
- Sprong, R. C., Hulstein, M. F., Van der Meer, R. (2001):  
Bactericidal activities of milk lipids.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 1298-1301
- Stokes, C. R., Bailey, M., Wilson, A. D. (1994):  
Immunology of the porcine gastrointestinal tract.  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* **43**: 143-150
- Sun, C. Q., O'Connor, C. J., Robertson, A. M. (2002):  
The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase.  
*Chem. Biol. Interact.* **140**: 185-198
- Symersky, T., Vu, M. K., Frolich, M., Biemond, I., Masclee, A. A. (2002):  
The effect of equicaloric medium-chain and long-chain triglycerides on pancreas enzyme secretion.  
*Clin. Physiol. Funct. Imaging* **22**: 307-311
- Takase, S., Goda, T. (1990):  
Effects of medium-chain triglycerides on brush border membrane-bound enzyme activity in rat small intestine.  
*J. Nutr.* **120**: 969-976
- Tanaka, T., Makino, R., Iizuka, T., Ishimura, Y., Kanegasaki, S. (1988):  
Activation by saturated and monounsaturated fatty acids of the O<sub>2</sub><sup>-</sup>-generating system in a cell-free preparation from neutrophils.  
*J. Biol. Chem.* **263**: 13670-13676

- Tang, A. L., Shah, N. P., Wilcox, G., Walker, K. Z., Stojanovska, L. (2007):  
Fermentation of calcium-fortified soymilk with *Lactobacillus*: effects on calcium solubility, isoflavone conversion, and production of organic acids.  
*J. Food Sci.* **72**: M431-436
- Tantibhedhyangkul, P., Hashim, S. A. (1975):  
Medium-chain triglyceride feeding in premature infants: effects on fat and nitrogen absorption.  
*Pediatrics* **55**: 359-370
- Thielke, K. H., Pabst, R., Rothkotter, H. J. (1999):  
Quantification of proliferating lymphocyte subsets appearing in the intestinal lymph and the blood.  
*Clin. Exp. Immunol.* **117**: 277-284
- Thomke, S., Elwinger, K. (1998):  
Growth promotants in feeding pigs and poultry. I. Growth and feed efficiency responses to antibiotic growth promotants.  
*Ann. Zootech.* **47**: 85-97
- Thomke, S., Elwinger, K. (1998):  
Growth promotants in feeding pigs and poultry. II. Mode of action of antibiotic growth promotants.  
*Ann. Zootech.* **47**: 153-167
- Thormar, H., Isaacs, C. E., Brown, H. R., Barshatzky, M. R., Pessolano, T. (1987):  
Inactivation of enveloped viruses and killing of cells by fatty acids and monoglycerides.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **31**: 27-31
- Traul, K. A., Driedger, A., Ingle, D. L., Nakhasi, D. (2000):  
Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides.  
*Food Chem. Toxicol.* **38**: 79-98
- Tsuchido, T., Hiraoka, T., Takano, M., Shibasaki, I. (1985):  
Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short- and medium-chain fatty acids.  
*J. Bacteriol.* **162**: 42-46
- Tsuzuki, Y., Miyazaki, J., Matsuzaki, K., Okada, Y., Hokari, R., Kawaguchi, A., Nagao, S., Itoh, K., Miura, S. (2006):  
Differential modulation in the functions of intestinal dendritic cells by long- and medium-chain fatty acids.  
*J. Gastroenterol.* **41**: 209-216
- Udey, M. C., Peck, R. D., Pentland, A. P., Schreiner, G. F., Lefkowitz, J. B. (1991):  
Antigen-presenting cells in essential fatty acid-deficient murine epidermis: keratinocytes bearing class II (Ia) antigens may potentiate the accessory cell function of Langerhans cells.  
*J. Invest. Dermatol.* **96**: 950-958

- Van Immerseel, F., De Buck, J., Boyen, F., Bohez, L., Pasmans, F., Volf, J., Sevcik, M., Rychlik, I., Haesebrouck, F., Ducatelle, R. (2004):  
Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hilA* suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 3582-3587
- Vega-Lopez, M. A., Arenas-Contreras, G., Bailey, M., Gonzalez-Pozos, S., Stokes, C. R., Ortega, M. G., Mondragon-Flores, R. (2001):  
Development of intraepithelial cells in the porcine small intestine.  
*Dev. Immunol.* **8**: 147-158
- Vervaeke, I. J., Decuypere, J. A., Dierick, N. A., Henderickx, H. K. (1979):  
Quantitative in vitro evaluation of the energy metabolism influenced by virginiamycin and spiramycin used as growth promoters in pig nutrition.  
*J. Anim. Sci.* **49**: 1447-1469
- Vessey, D. A. (2001):  
Isolation and preliminary characterization of the medium-chain fatty acid:CoA ligase responsible for activation of short- and medium-chain fatty acids in colonic mucosa from swine.  
*Dig. Dis. Sci.* **46**: 438-442
- Visek, W. J. (1978):  
The mode of growth promotion by antibiotics.  
*J. Anim. Sci.* **46**: 1447-1469
- Wächtershäuser, A., Stein, J. (2000):  
Rationale for the luminal provision of butyrate in intestinal diseases.  
*Eur. J. Nutr.* **39**: 164-171
- Waldmann, K. H., Wendt, M. (2004):  
Lehrbuch der Schweinekrankheiten  
Parey Verlag, Stuttgart
- Walter, J., Hertel, C., Tannock, G. W., Lis, C. M., Munro, K., Hammes, W. P. (2001):  
Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis.  
*Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2578-2585
- Wang, J., Wu, X., Simonavicius, N., Tian, H., Ling, L. (2006):  
Medium-chain fatty acids as ligands for orphan G protein-coupled receptor GPR84.  
*J. Biol. Chem.* **281**: 34457-34464
- Wanten, G. J., Janssen, F. P., Naber, A. H. (2002):  
Saturated triglycerides and fatty acids activate neutrophils depending on carbon chain-length.  
*Eur. J. Clin. Invest.* **32**: 285-289
- Wargovich, M. J., Eng, V. W., Newmark, H. L. (1984):  
Calcium inhibits the damaging and compensatory proliferative effects of fatty acids on mouse colon epithelium.  
*Cancer Lett.* **23**: 253-258

Werdan, K., Schuster, H.-P., Müller-Werdan, U. (2005):  
Sepsis und MODS  
Springer Medizin Verlag, Heidelberg

Wieland, T. M., Lin, X., Odle, J. (1993):  
Emulsification and fatty-acid chain length affect the utilization of medium-chain triglycerides  
by neonatal pigs.  
*J. Anim. Sci.* **71**: 1869-1874

Witte, W. (1998):  
Medical consequences of antibiotic use in agriculture.  
*Science* **279**: 996-997

Yang, H., Parkhouse, R. M. (1996):  
Phenotypic classification of porcine lymphocyte subpopulations in blood and lymphoid  
tissues.  
*Immunology* **89**: 76-83

## Anhang

Tabelle 48: Bewertungsschema des Gesundheitszustands

Bewertungsparameter	Kriterien	Scoring
Konsistenz der Faeces	flüssige Faeces, Diarrhoe	1
	Mischung aus größtem Anteil flüssiger Faeces	2
	geformte Faeces, aber sehr weich	3
	geformte und trockene Faeces, aber nicht hart	4
	geformte, trockene, harte Faeces	5
Körperhaltung	aufrecht, belastet alle 4 Gliedmaße gleichmäßig	1
	unphysiologisch (mit Beschreibung)	2
Verhalten	apathisch	1
	matt	2
	ruhig und aufmerksam	3
	übererregt	4
	Excitationen	5
Ernährungszustand	sehr gut (adipös)	1
	gut	2
	mäßig	3
	schlecht	4
	sehr schlecht (kachektisch)	5
Entwicklungszustand	Kümmerer	1
	Alter und Rasse entsprechend	2
	für Alter und Rasse überentwickelt	3
Pflegezustand	Haare: Glatt, anliegend, mattglänzend, unversehrt, geschlossen Haut: glatt, leicht glänzend, blassrosa, ohne Auflagerungen und Effloreszenzen	1
	Haare: glatt, anliegend, stumpf, ggr. versehrt (Scheuerstellen), ggr. Borstenausfall, ggr. Verfärbung der Borsten Haut: ggr. rau, stumpf, blassrosa, ggr. Auflagerungen bzw. Effloreszenzen	2
	Haare: struppig, stumpf, mgr. bis hgr. versehrt, großflächiger Ausfall oder übermäßig lange Borsten oder starke Verfärbungen der Borsten Haut: rau, stumpf, starke Farbabweichungen, starke Auflagerungen bzw. Effloreszenzen	3
Allgemeinbefinden	ungestört	1
	geringgradig gestört	2
	mittelgradig gestört	3
	hochgradig gestört	4

## Lösungen für die Nukleinsäureextraktion

### CSB-Puffer

Tri-Na-Citrat-dihydrat (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)	3,25 g
N-Laurylsarcosine Na-Salz	2,075 g
Antifoam Y-30 Emulsion (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)	50 µl
Ad 250 ml Aqua bidest.	
20 min bei 121 °C bei 1 bar Überdruck autoklavieren	
Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland)	50 µl
1,4-Dithiothreit (DDT) 0,1 M (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)	250 µl (steril filtriert)
Lagerung bei 4 °C ma. 2 Monate	

### GTC-Lösung

CSB-Puffer	250 ml (60 °C)
Guanidinthiocyanat (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)	187,5 g

### RNase-Stammlösung

Ribonuklease A (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)	10 mg gelöst in 1 ml Wasser
15 min bei 95 °C inkubieren, Lagerung bei minus 30 °C	

### 10 x TNE-Puffer

Aqua dest.	70 ml
Tris Base (1 M)	20 ml
NaCl (5 M)	70 ml
EDTA (0,2 M)	10 µl
mit HCl (1 M) auf pH-Wert 7,4 titrieren	

### 1 x TNE-Puffer

10 x TNE-Puffer	5 ml
Aqua dest.	45 ml

Referenzstämme für die Quantifizierung der qPCR

*Bifidobacterium adolescentis* DSM20083, *B. thermophilum* DSM20210, *B. suis* DSM20211, *B. longum* DSM20219, *B. bifidum* DSM20456, *Enterococcus cecorum* DSM20682, *E. faecalis* DSM6134, *E. faecalis* DSM8629, *E. faecalis* DSM 13591, *E. faecalis* DSM20376, *E. faecalis* DSM20380, *E. faecalis* DSM20478, *E. faecium* DSM2146, *E. faecium* DSM2918, *E. faecium* DSM6177, *E. faecium* DSM20477, *E. faecium* isolate 333, *E. faecium* isolate 378, *E. faecium* isolate 380, (Institute for Medical Microbiology, Benjamin-Franklin hospital, Berlin), *E. faecium* isolate 32 – 39 (Institute for Medical Microbiology, Benjamin-Franklin hospital, Berlin), *E. faecium* NCIMB2702, *E. faecium* NCIMB10415, *E. faecium* NCIMB12412, *E. faecium* NCIMB12494, *E. faecium* NCIMB700583, *E. faecium* NCIMB702711, *E. faecium* NCIMB702822, *E. villorum* DSM15688, *Escherichia coli* DSM2840, *Lactobacillus acidophilus* DSM20079, *L. alimentarius* DSM20249, *L. animalis* DSM20602, *L. bif fermentans* DSM20003, *L. bifidus* DSM20100, *L. brevis* DSM20054, *L. bulgaricus* DSM20081, *L. casei* DSM20011, *L. crispatus* DSM20584, *L. delbrueckii* DSM20711, *L. farciminis* DSM20184, *L. fermentum* DSM20052, *L. gallinarum* DSM10532, *L. jensenii* DSM20557, *L. johnsonii* DSM10533, *L. murinus* DSM20452, *L. panis* DSM6035, *L. paracasei* DSM20020, *L. plantarum* DSM 20174, *L. pontis* DSM8475, *L. reuteri* DSM20016, *L. rhamnosus*, DSM20021, *L. salivarius* subsp. *salivarius* DSM20555, *L. sharpeae* DSM20505, *L. vaginalis* DSM5837, *L. zeae* DSM20178, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM20481, *S. alactolyticus* DSM20728, *S. bovis* DSM20480, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* DSM20662, *S. gallolyticus* DSM13808, *S. hyointestinalis* DSM20770, *S. infantis* DSM 12492, *S. mutans* DSM20523, *S. porcinus* DSM20725, *S. salivarius* DSM 20560, *S. suis* DSM9682, *Weissella confusa* DSM20196 und *W. hellenica* DSM7378.

**Lösungen für die Durchflusszytometrie**

FACS-Puffer 0,5 % BSA/0,1 % Na-azid in PBS (1 Liter)

Albumin Fraktion V (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland)	5 g
Aqua bidest.	700 ml
10xPBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	100 ml
10 % Na-azid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	10 ml
Auffüllen auf 1 Liter mit Aqua bidest. durch einen Faltenfilter filtrieren	

Fixierlösungen 1 % Paraformaldehyd/0,1 % Tween20 in PBS (50 ml)

Paraformaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	0,5 g
Aqua dest	30 ml
Unter Erhitzen auf dem Magnetrührer lösen.	
10xPBS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	5 ml
Tween 20 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)	5 µl
Aqua dest.	ad 50 ml

DNase I Puffer 0,15 M NaCl/4,2 mM MgCl<sub>2</sub>/10 µM HCl (500 ml):

NaCl (MW = 58.44)	4,383 g
MgCl <sub>2</sub> (MW = 203.3)	0,427 g
HCl (1 M)	5 µl
Aqua bidest	ad 500 ml

Zellkulturmedium

VLE RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	500 ml
Fötale Kälberserum (FCS) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	50 ml
Hepes (2 mM) (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)	5 ml
Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria)	5 ml
L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH Pasching, Austria)	5 ml

## Danksagung

Herrn Professor Dr. Zentek danke ich dafür, dass ich meine Dissertation am Institut für Tierernährung durchführen konnte und er mir mit Hilfe der Firma Vitamex N.V. ein Stipendium für diese Zeit ermöglichte.

Ich danke dem Bundesinstitut für Risikobewertung für die Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Unterbringung der Ferkel und Sektion der Tiere. Mein besonderer Dank gilt dabei den Tierpflegern am Versuchsgut des BfR unter der Leitung von Frau Lochotzke und Herrn Götte, die mir tatkräftig bei der Haltung der Ferkel geholfen haben und mit Rat und Tat zur Seite standen. Außerdem danke ich Frau Hellwig, ohne ihre Hilfe wäre die kulturelle Mikrobiologie nicht möglich gewesen.

Dem Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité danke ich für die Untersuchung der Zytokinexpression im Ileum. Herr Professor Dr. Lutz Schomburg war dabei immer offen für spontane Ideen und Ermöglichung der Durchführung. In diesem Zusammenhang danke ich im speziellen Kostja Renko, der diese Arbeiten durchgeführt hat.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Annabella Khol-Parisini, die trotz starker Arbeitsbelastung immer ein offenes Ohr für mich hatte, die für mich die Kontakte am BfR und zur Herstellerfirma knüpfte, die mir viele Techniken im Labor vermittelte und mir einerseits aktiv bei der Bewältigung der stressigen Versuchstage geholfen hat und andererseits bei der Theorie meines Themas zur Seite stand.

Ich danke Petra Huck, die mich bei den immunologischen Untersuchungen und bei Fragen bezüglich des FACS immer unterstützt hat, und Anett Kriesten für die manchmal sehr mühseligen Stunden am GC und die Arbeiten am AAS. Dr. Schäfer danke ich für die Hilfe bei der GC und bei Marita Eitinger bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Untersuchung der Metaboliten und das man sie mit allem „Laborkram“ belastigen konnte.

Für das Lesen meiner Dissertation und der konstruktiven Kritik danke ich Herrn Professor Dr. Männer, Herr Dr. Vahjen und Frau Dr. Tedin.

Frau Dr. Arndt und den Mitarbeitern des Instituts für Biometrie danke ich für die statistische Beratung.

Ich danke meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung der Studienzeit und während der Zeit der Doktorarbeit, ohne die ich die ganze Geschichte niemals so schnell hätte durchziehen können, zudem für die langen Telefonate, in denen ich meinem Frust Luft machen konnte.

Ich danke meinen lieben Kollegen Annabella Khol-Parisini, Katrin Kirsch, Irina Klär, Mascha Sysel, Sandra Böttche und Stefan Schön, die mir tatkräftig an den Tötungstagen bei den weniger schönen Dingen, wie Digesta abfüllen, geholfen haben.

Ganz besonderer Dank gilt der „Küchencrew“ Katrin Kirsch, Linda Koiou, Birgit Schläfke, Beatrice Meyer und Anett Kriesten, die in meinen manchmal grauen Alltag einige Lichtblicke brachten, woraus sich einige gute Freundschaften entwickelt haben, die ich nicht mehr missen möchte.

Mein größter Dank gilt meinem geliebten Freund Kostja, der mir immer zur Seite stand, egal ob es um fachliche Fragen oder um emotionalen Halt ging. Ich bin froh und stolz, wie wir beide diese Zeit, in der wir beide im Dissertationstress waren, gemeistert haben. Schön, dass es Dich gibt.

## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 18. März 2009

Susanne Buchheit