

2 Literatur

2.1 Probiotika

Zu Beginn der Arbeit soll der Begriff 'Probiotikum' erklärt und gegenüber weiteren, ähnlich lautenden Begriffen mit dem Wortstamm '-biotikum' abgegrenzt werden. Zu diesem Zweck erfolgt ein kurzer geschichtlicher Rückblick.

2.1.1 Definition und Entwicklung des Begriffes 'Probiotikum'

Die direkte Übersetzung der den Begriff 'Probiotikum' bildenden griechischen Worte 'pro bios' bedeutet 'für das Leben'.

Das Konzept von probiotischen Wirkungen entwickelte Metchnikoff bereits Anfang des 20. Jahrhunderts, indem er postulierte, dass das Altern durch eine Vergiftung des Körpers durch die Produkte der Darmflora verursacht wird. Um die Vermehrung der Darmflora zu hemmen schlug er eine Diät vor, welche Milch, fermentiert von Bakterien, die große Mengen an Milchsäure produzieren, beinhaltet (THE NOBEL FOUNDATION, 1967).

Die Bezeichnung 'Probiotika' wurde als erstes von LILLY und STILLWELL (1965) geprägt. Sie verstanden darunter Substanzen, die von Protozoen abgesondert werden und das Wachstum anderer Protozoen fördern (LILLY und STILLWELL, 1965).

1989 stellte Fuller auf der Grundlage von PARKER (1974) eine erweiterte Definition der Probiotika für die Tierernährung auf. Danach sind Probiotika lebende mikrobielle Futtermittelzusatzstoffe, die das Wirtstier durch Verbesserung seines intestinalen Gleichgewichtes vorteilhaft beeinflussen (FULLER, 1989). Die 'World Health Organization' definierte 1994 Probiotika in ähnlicher Weise für die Humanernährung als „Produkte zur Stabilisierung der Darmflora (...), die aus einem oder wenigen, genau definierten Mikroorganismen-Stämmen bestehen“ (WHO (1994) zitiert nach BUSCH et al. (1999)). Durch GÖRKE und LIEBLER-TENORIO (2001) wurde die grundlegende Definition von FULLER (1989) dem erweiterten Kenntnisstand entsprechend durch den Halbsatz: „oder den Wirtsorganismus direkt beeinflussen“ ergänzt. Um jedoch eine Wirkung erzielen zu können, müssen Probiotika in bestimmten Mengen aufgenommen werden (GUARNER und SCHAAF SMA, 1998).

Fuller unterstreicht in seiner Definition die Wichtigkeit der in einem Probiotikum enthaltenen *lebensfähigen* Mikroorganismen. Nach neuesten wissenschaftlichen Untersuchungen ist diese Lebensfähigkeit jedoch nicht zwingend für die Wirkung aller als Probiotika eingesetzten Mikroorganismen notwendig.

Da sich die Wirksamkeit von Probiotika auch auf darmunabhängige Anwendungsgebiete (KNEIFEL, 2005) sowie auf Erhöhung der zotechnischen Leistungen (VANBELLE et al., 1990) erstreckt, stellte KNEIFEL (2005) eine allgemeiner gefasste Definition für Probiotika auf: „Probiotika sind Mikroorganismen, die das Wohlbefinden von Tier und Mensch fördern bzw. einen gesundheitlichen Nutzen besitzen.“

Neben dem Terminus 'Probiotikum' existieren die Begriffe 'Prebiotikum' sowie 'Symbiotikum'. Prebiotika stellen Substanzen dar, die dazu dienen, die Vermehrung bestimmter, als vorteilhaft angesehener Mikroorganismen im Gastrointestinaltrakt zu fördern. Solche Substanzen sind zumeist nichtverdauliche Polysaccharide, z.B. Fruktose-Oligosaccharide, die

zu einer Erhöhung der Bifidobakterien-Anzahl im Colon führen (GIBSON und ROBERFROID, 1995), sowie unidirektionale Mannitfluxe im Jejunum ansteigen lassen (BREVES et al., 2001).

Symbiotika hingegen sind als Kombinationen aus Pro- und Prebiotika definiert, wobei durch metabolische Aktivierung die Implantierung der Probiotika im Gastrointestinaltrakt verbessert wird (KAUR et al., 2002).

Im Gegensatz zu den oben genannten Substanzen, die die Entwicklung bestimmter Mikroorganismen fördern oder selbst Mikroorganismen sind, stehen die Antibiotika. Antibiotika im engeren Sinne sind Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, Streptomycceten oder Bakterien, im weiteren Sinne auch deren (semi-) synthetische Derivate mit bakteriostatischer oder bakterizider Wirkung (PSCHYREMBEL, 2002). Im Gegensatz zu den vorher genannten Gruppen von Leistungsförderern besteht das Wirkungsprinzip der Antibiotika, die ebenfalls eine leistungssteigernde Wirkung besitzen (FREITAG et al., 1999), in der direkten schädigenden Wirkung auf Mikroorganismen. Über den entstehenden Selektionsdruck auf die das Tier umgebenden Mikroorganismen kann die Verabreichung von Antibiotika zur Ausbildung von Resistenzen führen (BFR - BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 1996). Da sie jedoch für die Behandlung von bakteriell bedingten Erkrankungen vorgesehen und klinisch notwendig sind, dürfen Antibiotika ab 2006 in der Europäischen Union nicht mehr als Leistungsförderer eingesetzt werden (BUCHER, 2004).

2.1.2 Probiotische Wirkungsmechanismen

Mit dem Einsatz von Probiotika in der Veterinärmedizin werden unter anderem eine verbesserte Futterverdaulichkeit, gesteigerte Wachstumsraten, die Verhütung von Durchfällen und allgemein positive Wirkungen auf das Immunsystem beabsichtigt (ALEXOPOULOS et al., 2001; FULLER, 1999; REID, 1999).

Die diesen Wirkungen zu Grunde liegenden Mechanismen der Probiotika lassen sich generell zwei Kategorien zuordnen (siehe Abbildung 2.1.1):

1. Interaktionen zwischen probiotischen Keimen und Intestinalflora mit den darin enthaltenen z.T. pathogenen Mikroorganismen, wodurch eine Vermehrung und Stabilisierung der erwünschten Intestinalflora (THELEN et al., 2004) sowie eine Verdrängung pathogener Mikroorganismen aus der Darmflora (SCHAREK et al., 2005) erreicht wird und
2. direkte Beeinflussung des Makroorganismus durch das Probiotikum, wodurch der Makroorganismus u. a. kompetenter gegen pathogene Mikroorganismen reagieren kann (GÖRKE und LIEBLER-TENORIO, 2001; GÖRKE, 2000).

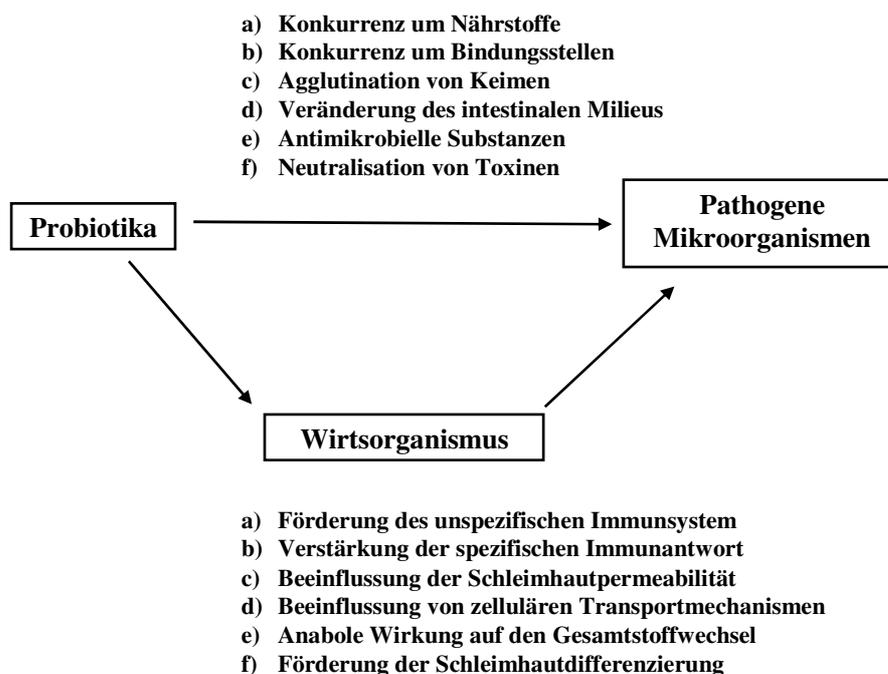


Abbildung 2.1.1 Hypothesen zu Wirkungsmechanismen und Angriffspunkten probiotischer Mikroorganismen (GÖRKE, 2000)

Da es sich bei Probiotika um eine sehr heterogene Gruppe von Mikroorganismen handelt, die in ihren Eigenschaften weit differieren, steht nicht zu erwarten, dass ihre Wirkung pauschal durch gleiche Wirkungsmechanismen für alle Probiotika erklärt werden kann. Vielmehr ist anzunehmen, dass je nach Keim ein spezielles Spektrum von Mechanismen wirksam wird. Einige der dazu aufgestellten Hypothesen konnten in einzelnen Studien bestätigt werden. Folgende probiotische Angriffspunkte, Wirkungsmechanismen und Wechselwirkungen mit der Gastrointestinalflora werden in der Literatur diskutiert:

2.1.2.1 Interaktionen zwischen Probiotika und Intestinalflora (siehe Abbildung 2.1.1)

- a) Konkurrenz um Nährstoffe zwischen Probiotika und unerwünschten Bakterien (GÖRKE, 2000; SIMON et al., 2001)
 - Verdrängung von *Clostridium difficile* durch die Zäkalfloora von Mäusen über Konkurrenz um das begrenzte Angebot von leicht metabolisierbaren Kohlenhydraten (WILSON und PERINI, 1988).
- b) kompetitive Adhäsion von Probiotika an epitheliale Rezeptoren (GÖRKE, 2000; SIMON et al., 2001)
 - Besetzung der zellulären Bindungsstellen im Darm von neugeborenen Schweinen durch einen apathogenen *E. coli* mit dem Fimbrienantigen K88 verhindert die Anheftung eines enterotoxischen *E. coli* mit dem gleichen Fimbrienantigen (DAVIDSON und HIRSH, 1976).
- c) Aggregation (Agglutination) von pathogenen Bakterien an Probiotika (GÖRKE, 2000; SIMON et al., 2001)
 - Bindung von *E. coli* an die Zelloberfläche von *Saccharomyces boulardii* (GEDEK, 1991).
- d) Veränderung des intestinalen Milieus (GÖRKE, 2000)
 - pH-Beeinflussung durch *Bacillus cereus var. toyoi* (JADAMUS et al., 2002),
 - Reduktion der bakteriellen Gallensäuredekonjugation (SIMON et al., 2001),
 - Veränderung des Redoxpotenzials (JADAMUS, 2001),
 - Reduktion von NH₃-Produktion und vermehrte Produktion von organischen Säuren im Dickdarm (SAKATA et al., 1999).
- e) Produktion von spezifischen Substanzen (SIMON et al., 2001)
 - Bakteriocine (SIMON et al., 2001), z.B. Reuterin (TALARICO et al., 1988),
 - Dipicolinsäure – sie wird unter anderem von *Bacillus cereus* während der Sporulation freigesetzt (GEDEK, 1992; SIMON et al., 2001),
 - *Saccharomyces boulardii* produziert so genannte „Killertoxine“, die *E. coli* abtöten können (GEDEK, 1991),
 - Polyamine wirken als Mediatoren, über die *Saccharomyces boulardii* auf die Darmwand wirkt (BUTS et al., 1994).
- f) Neutralisation bakterieller Toxine (GÖRKE und LIEBLER-TENORIO, 2001)
 - Neutralisation von Toxin A und B aus *Clostridium difficile* durch eine von *Saccharomyces boulardii* produzierte Serinprotease (CASTAGLIUOLO et al., 1999),
 - Bindung der Untereinheit B und Internalisierung der Untereinheit A des Cholera-Toxins durch *Saccharomyces boulardii* und *Saccharomyces cerevisiae* (BRANDAO et al., 1998),
 - Hypothese der Bindung mannosenspezifischer reagierender *E. coli*-Enterotoxine an die Zelloberfläche von *Saccharomyces boulardii* (GEDEK, 1991).

2.1.2.2 Interaktionen zwischen Probiotika und Wirtsorganismus (siehe Abbildung 2.1.1)

Die Punkte c und d der Interaktion zwischen Probiotika und Wirtsorganismus, sowie teilweise Punkt f, gehen auf die Beeinflussung der Transport- und Barrierefunktion des Darmepithels ein. Sie sind für die vorliegende Arbeit besonders relevant und werden deshalb im Folgenden etwas ausführlicher betrachtet.

- a) Förderung des unspezifischen Immunsystems (GÖRKE, 2000)
- Erhöhung der Sekretionsbereitschaft des Darmepithels (EL ASMAR et al., 2002)
 - Einige als Probiotika eingesetzte Bakterien sind in der Lage, sich in der Muzinschicht zu verankern, welche der Darmwand aufgelagert ist und so einen 'natürlichen Biofilm' aufzubauen. Dieser verstärkt die humorale Barriere der Darmwand (GEDEK, 1994; GEDEK, 1995).
 - Produktion schleimhautprotektiver Zytokine (IL-10) durch gentechnisch veränderte Probiotika (STEIDLER et al., 2000). Zytokine können neben der Schleimhautprotektivität epitheliale Transportprozesse beeinflussen (HARDIN et al., 2000; MADSEN et al., 1996).
- b) Modulation der spezifischen Immunantwort (SCHAREK et al., 2005)
- Signifikante Zunahme CD4⁺T-Lymphozyten im Zottenbereich des mittleren Jejunums unter dem Einfluss von *Saccharomyces boulardii* (BRIEL, 2002),
 - Orale Gabe von *Laktobazillus casei* kann antigen-spezifische Entzündungen der Haut durch eine Reduktion des CD8⁺T-Zellenpools reduzieren (CHAPAT et al., 2004).
- c) Beeinflussung der Permeabilität und d) der zellulären Transportmechanismen der Darmschleimhaut (GÖRKE, 2000)
- Reduktion der parazellulären Permeabilität des jejunalen Epithels unter dem Einfluss von Probiotika. Schweine, die *Saccharomyces boulardii* über verschiedene Zeiträume erhielten, zeigten signifikant niedrigere basale unidirektionale Fluxraten bei gleich bleibenden Nettofluxraten von Mannit, gleicher Gewebeleitfähigkeit und gleichem Kurzschlussstrom im Vergleich zur Kontrollgruppe (WINCKLER, 1997). Des Weiteren konnte in Zellkulturen eine Erhöhung des transepithelialen Widerstandes unter dem Einfluss von verschiedenen Probiotika nachgewiesen werden (OTTE und PODOLSKY, 2004; WINCKLER et al., 1998).
 - Über die Wirkung auf die Darmflora (siehe oben) können Probiotika indirekt Einfluss auf die Expression von 'Heat-Shock-Proteinen' nehmen (KOJIMA et al., 2003), welche unter anderem die Reparatur des Epithels positiv beeinflussen können (BIDMON et al., 2000).
 - Signifikante Erhöhung der Glucose- und Alaninaufnahmen pro Zeiteinheit im proximalen Jejunum von Schweinen nach 8-tägiger Gabe von *Saccharomyces boulardii* (BREVES et al., 1997a).
 - Senkung des basalen Kurzschlussstromes im mittleren Jejunum des Schweines nach 8-tägiger Applikation von *Saccharomyces boulardii*. Dies basiert laut SCHROEDER et al. (2004) auf verringerter Na⁺-Sekretion, da die Cl⁻-Fluxraten nicht beeinflusst wurden. Weiterhin war die durch Theophyllin stimulierte Cl⁻-Sekretion deutlich reduziert. Beide Effekte konnten nach 16-tägiger Applikation von *Saccharomyces boulardii* nicht mehr beobachtet werden (SCHROEDER et al., 2004).
 - Antisekretorischer Effekt von *Saccharomyces boulardii* auf das Jejunum von Ratten. Die Cl⁻-Sekretion in Reaktion auf PGE₂ wurde bei mukosaler Zugabe von *Saccharomyces boulardii* durch einen erhöhten Cl⁻-Flux in muko-serosaler Richtung in eine Cl⁻-Absorption umgekehrt (KRAMMER und KARBACH, 1993).
 - Im Modell (Infektion mit dem enterotoxischen *E. coli*-Stamm *Abbotstown*) verhindert das Probiotikum *E. coli Nissle 1917* eine überschießende Sekretion nach Applikation von Forskolin (SCHROEDER et al., 2006).

- Anstieg der Mannitfluxraten von mukosal nach serosal sowie erhöhte Kurzschlussstromantwort auf die Zugabe von Glukose im distalen Jejunum des Schweines nach Verfütterung von inaktivierter Hefe (BREVES et al., 2001).
 - Erhöhung der Kurzschlussstromantwort bei mukosalen Glukosekonzentrationen von 8 bzw. 10 mM unter der Wirkung von *Enterococcus faecium* im mittleren Jejunum von Saug- und Absatzferkeln bis 35 Tage. Dies lässt auf eine erhöhte Glukoseabsorption schließen (LODEMANN et al., 2003a).
- f) Förderung der Schleimhautdifferenzierung (GÖRKE, 2000)
- Beeinflussung der molekularen Regulation der Genexpression für wichtige Darmfunktionen: Keimfreie Mäuse zeigen unter dem Einfluss von *Bacteroides thetaiotaomicron* einen erhöhten Spiegel von SGLT-1-mRNA (SGLT-1 ist ein Na⁺-Glukose-Kotransporter) im Ileum im Gegensatz zu unbehandelten Kontrolltieren. Weiterhin greift der Keim in die Regulation der Genexpression von folgenden intestinalen Funktionen ein: Darmbarriere, Angiogenese, xenobiotischer Metabolismus und postnatale Darmreifung (HOOPER et al., 2001).
 - veränderte Aktivität von Bürstensaummembranenzymen durch *Bacillus firmus* (inaktiviert) und *Bifidobacterium bifidum* bei Mäusen (KOZAKOVA et al., 2002; KOZAKOVA et al., 2001), sowie durch *Saccharomyces boulardii* beim Menschen und bei der Ratte (BUTS et al., 1986),
 - veränderte Qualität der Mucine in den Becherzellen des Dickdarmes von Schweinen, die mit *Saccharomyces boulardii* behandelt wurden (GÖRKE, 2000)
- g) Modifikation der Darmmukosamorphologie (GÖRKE, 2000).
- Nach einer 4-wöchigen *Bacillus cereus* var. *caron* - Applikation an Ferkel zeigt sich eine signifikante Zunahme der Mucosaoberfläche und der Zottenlänge im Jejunum (KLEIN und SCHMIDTS, 1997),
 - Probiotika fördern die Proliferation der Epithelzellen des gesamten Darmes (ICHIKAWA et al., 1999).
- h) Antimutagene/ antikarzinogene Aktivität (KAUR et al., 2002)
- Deaktivierung von Karzinogenen durch lebende Laktobazillen und Bifidobakterien im Darmlumen von Ratten (POOL-ZOBEL, 1997).

Punkt e) der Abbildung 2.1.1, „anabole Wirkung auf den Gesamtstoffwechsel“ (GÖRKE, 2000) benennt einen Effekt von Probiotika, der die oben beschriebenen Wirkungsmechanismen zu Grunde liegen. Er wird deshalb erst jetzt im Anschluss gesondert mit einem Beispiel erwähnt. In der Untersuchung von KIRCHGESSNER et al. (1993) bewirkte die Verfütterung von *Bacillus cereus* in der Dosierung 10⁸ CFU/kg Futter an abgesetzte Ferkel eine 15 %ige Steigerung der Lebendmassezunahme gegenüber der Kontrollgruppe.

Die oben zusammengestellte Aufzählung ist eine Auswahl der häufigsten einheitlich beschriebenen Wirkungsmechanismen von Probiotika in der bis dato aktuellen Literatur. Es besteht weiterer Forschungsbedarf, um diese Mechanismen detaillierter aufzuklären, sowie daraus folgend den einzelnen Vertretern probiotischer Spezies geeignete Einsatzgebiete zuzuordnen.

2.2 Das Probiotikum *Bacillus cereus variatio toyoi*

Wie aus dem letzten Kapitel hervorgeht, gehören Mikroorganismen, die als Probiotika Verwendung finden, unterschiedlichsten Arten an. So werden grampositive Bakterien (z.B.

Laktobazillen, Enterokokken), gramnegative Bakterien (z.B. *E. coli*-Stamm *Nissle 1917*), Sporenbildner (z.B. *Bacillus cereus var. toyoi*) und Hefen (z.B. *Saccharomyces boulardii*) bis hin zu Schimmelpilzen (z.B. *Aspergillus oryzae*) eingesetzt (BRIEL, 2002; FULLER, 1997; LEONHARD-MAREK et al., 2003; YU et al., 1997).

Im Folgenden wird das Probiotikum *Bacillus cereus var. toyoi* näher beschrieben, dessen mögliche Einflussnahme auf Transportvorgänge im Jejunum des Schweines in der vorliegenden Arbeit untersucht wird.

Bei *Bacillus cereus var. toyoi* handelt es sich um einen grampositiven aerob und fakultativ anaerob wachsenden Endosporenbildner (SNEATH, 1986). Er bildet im Gegensatz zu den als Lebensmittelvergifter bekannten Spezies dieser Art kein Toxin (SCIENTIFIC COMMITTEE ON AMINAL NUTRITION und EUROPEAN COMMISSION, 2001). Er ist durch Geißeln beweglich (SCHLEGEL, 1992) und zeichnet sich durch die Fähigkeit zur Spaltung von Turanose (GEDEK, 1994) aus. Das Wachstum von *Bacillus cereus* findet bei Temperaturen zwischen 10 und 40 °C statt (SNEATH, 1986). Das Bakterium besitzt eine natürliche Resistenz gegenüber Tetrazyklinen, Chloramphenicol und Sulfonamiden (SCIENTIFIC COMMITTEE ON AMINAL NUTRITION und EUROPEAN COMMISSION, 2001).

Bacillus cereus var. toyoi wurde ursprünglich aus einer Bodenprobe isoliert (ROTH und KIRCHGESSNER, 1988a). Er zählt definitionsgemäß zur transienten Flora des Darmes (FREITAG et al., 1998). Kurze Zeit nach dem Ende der Verabreichung von *Bacillus cereus var. toyoi* verringert sich der Keimgehalt vor allem im oberen Jejunum des Schweines drastisch (JADAMUS, 2001). Drei Wochen nach dem Absetzen von *Bacillus cereus var. toyoi*-Supplementierung ist der Nachweis des Keimes mit $2,2 \times 10^2$ CFU im Kot von Schweinen zu vernachlässigen (JADAMUS, 2001; JADAMUS et al., 2002; SCIENTIFIC COMMITTEE ON AMINAL NUTRITION und EUROPEAN COMMISSION, 2001).

Neben den oben beschriebenen Eigenschaften, insbesondere seiner Apathogenität wird *Bacillus cereus var. toyoi* auch wegen seiner Fähigkeit zur Sporenbildung als Probiotikum eingesetzt. Für die Verwendung als Futtermittelzusatzstoff sind Sporen unter mehreren Aspekten vorteilhaft: Bei der Pelletierung von Mischfuttermitteln unter Erhitzung übersteht *Bacillus cereus var. toyoi* in der Form von Sporen Temperaturen bis zu 80 °C über einen Zeitraum von 10 Minuten. Die Lagerung des Präparates und der den Keim enthaltenden Futtermittel ist aufgrund der gebildeten Dauerstadien problemlos über den Zeitraum von mindestens einem Jahr möglich (SIMON, 2005). Des Weiteren übersteht *Bacillus cereus* in Form seiner Sporen die Magenpassage ohne Aktivitätsverlust und keimt im Verdauungstrakt schnell aus (JADAMUS et al., 1999).

Die Differenzierung des probiotischen Stammes *Bacillus cereus var. toyoi* von den 15 Wildtypen des *Bacillus cereus var. toyoi* ist per biochemischer Methoden nicht zuverlässig möglich (MIETKE et al., 2000). Die genaue Identifizierung des probiotischen Stammes *Bacillus cereus var. toyoi* kann derzeit am zuverlässigsten und genauesten per 'Fourier-transform infrared spectroscopy' (FT-IR) erfolgen (SCHLEIF und MIETKE, 2002).

2.2.1 Wirkungen und Wirkungsmechanismen von *Bacillus cereus var. toyoi* auf die Gastrointestinalflora

Bei Verabreichung keimfähiger Sporen von *Bacillus cereus var. toyoi* an Minipigs in einer Konzentration von 10^6 Sporen/g Futter kommt es zu einer Verdoppelung der Keimzahl der Laktobazillen und zu einer Abnahme von Enterokokken und coliformen Keimen im Zäkum (GEDEK, 1991).

Einen Anstieg der Laktobazillen und eine Reduktion von *E. coli* konnten ebenfalls HATTORI und WATANABE (1981) im Duodenum von abgesetzten Ferkeln nachweisen (zitiert nach KAHRS (1987)).

Einen Anstieg der Laktobazillen im gesamten Gastrointestinaltrakt von Ferkeln verschiedenen Alters bei Zufütterung von *Bacillus cereus var. toyoi* beobachteten JADAMUS et al. (1999).

In der Arbeit von JADAMUS et al. (2002) wird durch *Bacillus cereus var. toyoi* das bakterielle Wachstum im Ileum von Ferkeln verschiedener Altersgruppen signifikant gesenkt. Im Alter von 13 Tagen ist die Hemmung der Enterobakterien in allen Darmabschnitten der Saugferkel signifikant, obwohl nur die Sau mit *Bacillus cereus var. toyoi* in der Dosierung 10^9 Sporen/kg Futter versorgt wurde und die Saugferkel unter 14 Tagen noch kein Zusatzfutter mit *Bacillus cereus var. toyoi* erhielten. Bei den 13 Tage alten Ferkeln ist jedoch *Bacillus cereus var. toyoi* im Kot nachweisbar, er wird über den Kot der Sau aufgenommen. Die Enterobakterien sind hier nicht differenziert worden (JADAMUS et al., 2002).

Die Arbeitsgruppe um SIMON (2005) konnte ebenfalls *Bacillus cereus var. toyoi* im Kot von 7 und 14 Tage alten Ferkeln nachweisen, auch hier erhielt nur die Sau das Probiotikum über das Futter.

Die *E. coli*-Keimausscheidung der Sau wurde unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* um 50% verringert (MORGENTHUM et al. (1991) zitiert nach KAHRS (1991)). Dies wirkt sich ebenfalls auf die den Kot der Sau aufnehmenden Ferkel aus, die damit einem geringeren Keimdruck ausgesetzt sind.

Die 35-tägige Verabreichung von *Bacillus cereus var. toyoi* in der Konzentration von 10^9 CFU/kg Futter an früh entwöhnte Ferkel bewirkt eine signifikante Reduktion coliformer Keime im Duodenum und Rektum, eine geringere Enterokokken-Konzentration im Zäkum und Rektum sowie eine signifikante Steigerung der Laktobazillen-Konzentration im Duodenum. Unter Berücksichtigung der Keimkonzentration in der Ausgangsgruppe kann dies laut Thelen als florastabilisierende Wirkung von Toyocerin[®] gedeutet werden (THELEN et al., 2004).

Nach Challenge mit *E. coli* reduzierte die Gabe von 10^6 Sporen /g Futter die Häufigkeit der Durchfälle und verringerte die Morbidität von Schweinen. In den Faeces konnten am 7. Tag nach Inokulation von *E. coli* eine Reduktion der coliformen Keime sowie eine Erhöhung der Enterokokkenanzahl durch *Bacillus cereus var. toyoi* beobachtet werden (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION und EUROPEAN COMMISSION, 2001).

Auch auf die Nachweishäufigkeit von viralen und protozoalen Durchfallerregeren kann *Bacillus cereus var. toyoi* Einfluss nehmen. Sowohl die Anzahl von Rota- als auch von Coronaviren,

sowie von Kryptosporidien war bei Kälbern, denen Toyocerin® in die Tränke gemischt wurde verringert im Gegensatz zur Kontrollgruppe (LEUZINGER, 1998). In einer zweiten Studie dieser Arbeitsgruppe konnte dieser Effekt allerdings nicht bestätigt werden (ERHARD et al., 2000).

Den genannten probiotischen Wirkungen von *Bacillus cereus var. toyoi* auf die Gastrointestinalflora liegen bisher weitgehend unbeschriebene Mechanismen zugrunde.

Ein möglicher Wirkungsmechanismus könnte darauf beruhen, dass während der Sporulation, die im oberen Dünndarm zu über 90 % erfolgt und z.T. mehrfach durchlaufen wird (JADAMUS, 2001), durch *Bacillus cereus* große Mengen an Aminosäuren, Dipicolinsäure und Peptiden ausgeschieden werden (SCHLEGEL, 1992). Die Wirkung der Dipicolinsäure könnte nach JADAMUS (2001) in einer pH-Reduktion in der unmittelbaren Umgebung der keimenden Spore und Chelatbildung der Säure mit zweiwertigen Ionen bestehen. Dies führt zu einer Wachstumshemmung, bei *E. coli* stärker als bei Enterokokken.

2.2.2 Wirkungen von *Bacillus cereus var. toyoi* auf den Makroorganismus Schwein

Für *Bacillus cereus var. toyoi* werden in der Literatur Wirkungen auf das Schwein beschrieben, die der Verwendung des Keimes als Probiotikum eine Grundlage geben.

- Verringerung des Auftretens von Durchfallerkrankungen und anabole Wirkung auf den Gesamtstoffwechsel:
 - Toyocerin®-Zufütterung hat positive Effekte auf die Gewichtszunahme und die Futtermittelveerdaulichkeit von Saug- und Absatzferkeln. Bei Saugferkeln wurden zusätzlich eine signifikante Reduktion der Inzidenz von Durchfällen sowie eine erhöhte Überlebens- und Absatzrate dokumentiert (SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL NUTRITION und EUROPEAN COMMISSION, 2001).
 - Ebenfalls signifikant niedrigere Ausfälle infolge verminderter Durchfallerkrankungen finden IBEN und LEIBETSEDER (1989) bei Saug- und Absatzferkeln in den Gruppen mit *Bacillus cereus var. toyoi* im Gegensatz zur Virginiamycin-‘Kontrollgruppe’. Sie stellen eine additive Wirkung von Pro- und Antibiotikum bezüglich der Lebendmassezunahme fest. Allerdings fehlt in dieser Untersuchung eine Null-Kontrollgruppe.
 - Bei KYRIAKIS et al. (1999) zeigen die Absatzferkel signifikant niedrigere Ausfälle infolge verminderter Durchfallerkrankungen sowie erhöhte Lebendmassezunahmen in den Gruppen mit *Bacillus cereus var. toyoi* im Gegensatz zur Kontrollgruppe, wobei er ausdrücklich die schlechten Hygieneverhältnisse in den zum Versuch herangezogenen Schweinehaltungsbetrieben erwähnt.
 - 2004 waren in 4 Versuchen die mittlere tägliche Lebendmassezunahme und der Futteraufwand pro kg Lebendmassezunahme von Schweinen, die mit *Bacillus cereus var. toyoi* gefüttert wurden, statistisch gesichert besser im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die Wirksamkeit von Toyocerin® war während der Aufzuchtphase besser als in der Endmastphase (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2004).
 - THELEN (1997) dagegen beobachtete keine Effekte auf die mittlere tägliche Lebendmassezunahme und auf die Gesamtfutteraufnahme bei früh entwöhnten

Ferkeln nach 35-tägiger Toyocerin®-Gabe unter guten hygienischen Bedingungen, jedoch eine reduzierte Inzidenz der Durchfälle.

Die publizierten Ergebnisse bestätigen die These von FULLER (1992), dass die gesundheits- und damit leistungsfördernde Wirkung von Probiotika erst im vollen Umfang zur Geltung kommen kann, wenn die Tiere durch das Vorhandensein einer wachstumshemmenden Mikroflora belastet werden, die durch das Probiotikum beeinflusst werden kann. Bei optimalen Haltungsbedingungen dürften die Wirkungen von *Bacillus cereus var. toyoi* somit in geringerer Intensität hervortreten als bei Mängeln in den Umweltbedingungen der Tiere.

- Lokale Wirkung auf die Darmmukosamorphologie:
Nach dreiwöchiger Verfütterung von *Bacillus cereus var. toyoi* an Schweine ist eine signifikante Zunahme der Zottenlänge im Jejunum im Vergleich zu den Kontrolltieren zu beobachten (BAUM et al., 2002; GÖRKE, 2000).
- Beeinflussung des Darmschleimhautimmunsystems:
Die CD4+T-Lymphozyten im Zottenbereich des mittleren Jejunums nehmen unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* signifikant zu (BRIEL, 2002).
- Veränderung des intestinalen Milieus:
Unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* ist im Jejunum von 13 Tage alten Ferkeln eine reduzierte Aktivität der bakteriellen Taurocholin dekonjugierenden Enzyme messbar, die Einfluss auf die Fettverdauung haben (JADAMUS et al., 1999).
- Förderung der Schleimhautdifferenzierung:
Die Qualität der Mucine in Becherzellen des Dickdarmes von Schweinen veränderte sich unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* (BAUM et al., 2002).

Besonders relevant für die vorliegende Arbeit sind die Wirkungen von *Bacillus cereus var. toyoi* auf die transportphysiologischen Eigenschaften der Darmwand, auf die nun speziell eingegangen wird.

- *Bacillus cereus var. toyoi* beeinflusst die Permeabilität und die zellulären Transportmechanismen der Darmschleimhaut.
 - Aufzuchtferkel, die *Bacillus cereus var. toyoi* über 3 Wochen erhielten, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Probiotikazusatz signifikant niedrigere basale unidirektionale Fluxraten von Mannit bei gleich bleibenden Nettofluxraten von Mannit, gleicher Gewebeleitfähigkeit und gleichem Kurzschlussstrom im Jejunum (BREVES et al., 1997b; WINCKLER et al., 1998; WINCKLER, 1997).
 - Bei Untersuchung der intestinalen Glukose- und Alaninaufnahme an Vesikeln der Bürstensaummembran des proximalen Schweinejejunums von Aufzuchtferkeln wird gegenüber unbehandelten Tieren eine signifikant höhere zeitabhängige Glucoseaufnahme bei Tieren gefunden, die 21 Tage mit *Bacillus cereus var. toyoi* behandelt wurden (BREVES et al., 1997a).
 - BREVES et al. (2000) untersuchten das Jejunum von Aufzuchtferkeln und beschreiben eine signifikant höhere I_{sc} -Antwort auf mukosale Glukose-, Glycyl-L-Glutamin- bzw. Glycyl-L-Sarkosin-Zugabe bei Fütterung mit *Bacillus cereus var.*

toyoi. Zusätzlich ist die Leitfähigkeit der Gewebe signifikant höher als bei der Kontrollgruppe. Bei kinetischen Studien des Glukosetransports an Brush-Border-Membrane-Vesikeln (BBMV) stellt er eine signifikante Erhöhung von V_{\max} nach Fütterung von *Bacillus cereus* fest.

2.3 Epithelfunktionen

Nachdem die Grundlagen zu Probiotika geklärt wurden, werden zum besseren Verständnis möglicher Effekte von Probiotika auf Transportvorgänge die Mechanismen epithelialer Transportphysiologie erläutert. Dazu werden zuerst in diesem Kapitel die Epithelien, insbesondere das Darmepithel und seine allgemeinen Funktionen sowie die Einteilung der Epithelien besprochen. Anschließend werden im darauf folgenden Kapitel 2.4 ausgewählte Transportmechanismen vorgestellt.

Epithelien sind geschlossene Zellverbände, die innere oder äußere Körperoberflächen bedecken. Ihre Funktionen sind Schutz, Stoffaustausch und Reizaufnahme (PSCHYREMBEL, 2002).

Das Epithel des Darmes trennt das Darmlumen vom Extrazellulärraum des Makroorganismus. Es schützt das Individuum vor der Invasion von Mikroorganismen, Antigenen und toxischen Substanzen aus dem Darmlumen (DOHMS, 2004; FOITZIK et al., 1999).

Das Darmepithel ist des Weiteren neben der Resorption von Nähr- und Hilfsstoffen, wie z.B. Vitamine, Mineralstoffe und Wasser aus der Digesta (BERGER und KETZ, 1969), für die Sekretion von Elektrolyten und Wasser (FIELD, 1976), die als Hilfsstoffe der Verdauung dienen (BARRETT, 1997), in das Darmlumen verantwortlich.

Es nimmt Reize aus dem Darmlumen und aus dem Organismus auf und reagiert darauf mit Veränderung der epithelialen Barriere- oder Transportfunktion (BARRETT, 1997; EL ASMAR et al., 2002; KRAMMER und KARBACH, 1993).

Somit wird dem Darmepithel mit den beiden regulierbaren Funktionen des Stofftransportes und der Schutzbarriere sowie durch seine Fähigkeit Reize aufzunehmen und damit Regulationsmechanismen zu induzieren eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Lebensfähigkeit des Organismus zuteil.

Im weiteren Verlauf wird insbesondere das einschichtige Epithel des Darmes, wie es z.B. im Jejunum anzutreffen ist, besprochen.

2.3.1 Wege des Stofftransportes über das Epithel

Es gibt zwei Transportwege von in Wasser gelösten Stoffen/wässrigen Lösungen über einschichtige Epithelien (siehe auch Abbildung 2.3.1):

1. den transzellulären Weg mit zwei Barrieren, der apikalen und der basolateralen Zellmembran und
2. den parazellulären Weg ('shunt path'), der ebenfalls über zwei transportphysiologische Barrieren, die 'Tight Junctions' und den Interzellularspalt führt (POWELL, 1981).

'Tight Junctions' halten die Zellen mit Hilfe eines Netzwerkes globulärer, kettenartig aneinander gereihter integraler Moleküle, vor allem Occludin, verschiedene Claudine und „Cadherin adhesion molecule“, über den an diesen Abschnitten auf wenige Nanometer

verjüngten Interzellulärspalt zusammen (FANNING et al., 1999; JASTROW, 2001; TEBBE et al., 2002; TUNGGAL et al., 2005). Dieses Netzwerk ist durch Plaqueproteine ZO-1 und ZO-2 am Zytoskelett innerhalb der Zellen verankert (JASTROW, 2001).

Der Stofftransport findet selektiv über das Epithel statt. Diese selektive Transportfunktion ist die Grundlage für die Barrierefunktion des Epithels.

2.3.2 Die Barrierefunktion des Epithels

Die epitheliale Barrierefunktion wird durch den transepithelialen Gesamtwiderstand (R_t) charakterisiert. R_t setzt sich aus den Einzelwiderständen der Epithelbarrieren auf den beiden oben beschriebenen Transportwegen zusammen. Das ist, wie in Abbildung 2.3.1 dargestellt, zum einen der transzelluläre Widerstand, bestehend aus den beiden Teilwiderständen der apikalen (R_a) sowie der basolateralen (R_b) Membran. Zum anderen ist es der parazelluläre Widerstand aus den beiden Widerstandskomponenten der Tight Junctions (R_{TJ}) und des Interzellulärspaltes (R_{IZ}) (POWELL, 1981).

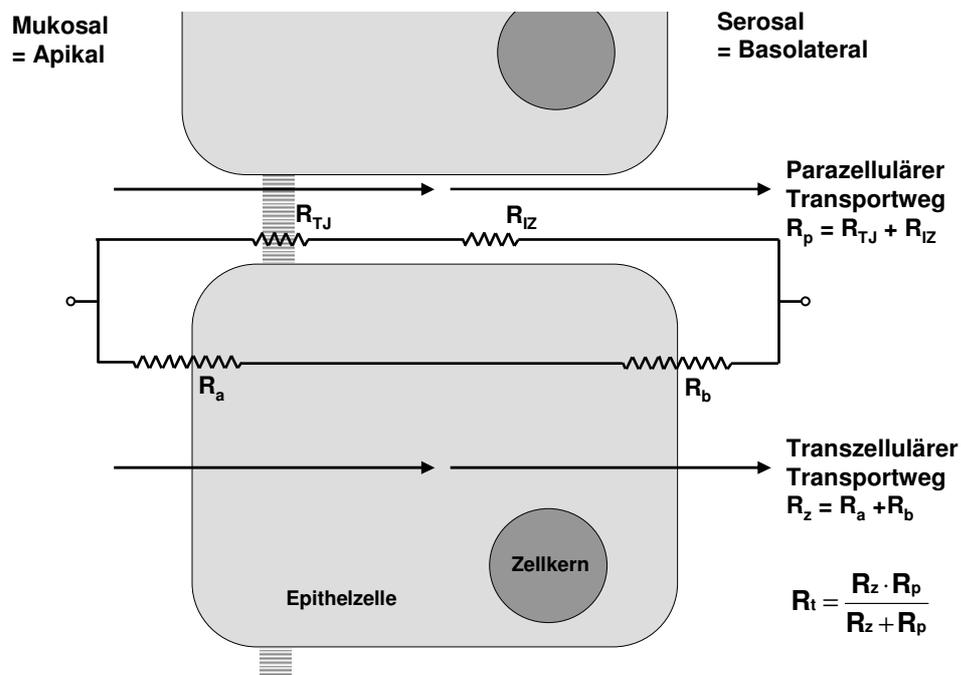


Abbildung 2.3.1, modifiziert nach POWELL (1981) und LODEMANN (2001): Transportwege und Widerstände des Epithels. Der transzelluläre und der parazelluläre Transportweg verlaufen parallel. Der zelluläre Widerstand (R_z) setzt sich aus den in Serie geschalteten Widerständen der apikalen (R_a) und der basolateralen Membran (R_b) zusammen. Der parazelluläre Widerstand (R_p) besteht aus dem Widerstand der 'Tight Junctions' (R_{TJ}) und des Interzellulärspaltes (R_{IZ}), die ebenfalls in Reihe geschaltet sind.

Durch die Barrierefunktion des Epithels werden ein elektrischer und verschiedene chemische Gradienten zwischen Darmlumen (mukosal) und Extrazellulärraum (serosal) aufrecht erhalten, die durch transportphysiologische Vorgänge beeinflusst werden (ENGELHARDT und BREVES, 2000).

2.3.3 Reizaufnahme des Epithels und Regulation der Epithelfunktionen

Reize aus dem Darmlumen sowie aus dem Organismus bewirken als Reaktion des Epithels eine Veränderung der epithelialen Barriereigenschaften und/oder Transportfunktionen. Es werden in diesem Abschnitt einige mögliche Reize und die Reaktion des Epithels darauf genannt.

Mikroorganismen können beispielsweise eine Erniedrigung des transepithelialen Widerstandes und eine Erhöhung der Sekretionsleistung bewirken (EL ASMAR et al., 2002). Die Reizung der Epithelzellen erfolgt z.B. durch epithelassoziierte Immunzellen über interzelluläre Kommunikation mit Hilfe von Mediatoren (THORBOLL et al., 1998). Durch diese interzellulären Signale werden intrazelluläre Botenstoffe freigesetzt, die auf dem Level der Epithelzellen den transepithelialen Transport regulieren (BARRETT, 1997).

Als Beispiel für einen körpereigenen Reiz kann die extrazelluläre Na^+ -Konzentration genannt werden. Sie kann die Na^+ -Resorption über das Epithel regulieren (TURNHEIM, 1991).

Die Regulation der Epithelfunktionen über neuronale Strukturen (KNIPPING, 2003) ist ebenfalls in die Gruppe der auf das Epithel einwirkenden körpereigenen Reize einzuordnen. Auch hier geht die Reizweiterleitung intrazellulär über Botenstoffe bis zum einzelnen Effektor des transepithelialen Transportes vonstatten (BARRETT, 1997).

2.3.4 Einteilung der Epithelien

Die Epithelien des Gastrointestinal-Traktes können anhand des transepithelialen Widerstandes in drei Kategorien, durchlässige, moderat dichte und dichte Epithelien, eingeteilt werden.

Durchlässige Epithelien haben nach POWELL (1981) einen Gewebewiderstand R_t von unter $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$, einen größeren zellulären (R_z) als parazellulären (R_p) Widerstand ($R_z/R_p > 1$) oder eine parazelluläre Leitfähigkeit ($G_p = 1/R_p$), die mehr als 50% der gesamten transepithelialen Gewebeleitfähigkeit ($G_t = 1/R_t$) ausmacht (siehe auch Abbildung 2.3.1). Der niedrige transepitheliale Widerstand wird hier hauptsächlich durch den niedrigen parazellulären Widerstand geprägt (BAKKER und GROOT, 1984; FRIZZELL und SCHULTZ, 1972). In einer neueren Definition von MASYUK et al. (2002) werden durchlässige Epithelien durch einen R_t von 5 bis $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ definiert. Das Epithel des Dünndarmes kann nach beiden Definitionen in die Gruppe der durchlässigen Epithelien eingeordnet werden.

Dichte Epithelien sind beiden Autoren zufolge alle anderen Epithelien, die nicht als durchlässig eingestuft werden können wie zum Beispiel Magenfundus und Harnblase.

Das Kolon wird von POWELL (1981) als Beispiel für ein moderat dichtes Epithel angeführt, ohne jedoch klare Kriterien für diese dritte Gruppe von Epithelien zu benennen. Die moderat dichten Epithelien werden von SACKIN (1981) definiert. Danach sind Epithelien moderat dicht, wenn das Verhältnis parazellulärer zu zellulärer Widerstand größer als 1 und kleiner als 100 ist (SACKIN (1981) zitiert nach GITTER et al. (2000)).

Die unterschiedlich dichten Epithelien zeichnen sich neben verschiedenen Widerstandsverhältnissen auch durch differierende relative Ionenleitfähigkeiten von K^+ , Na^+ und Cl^- aus (weiterführende Literatur in CIVAN (1983)).

2.4 Epitheliale Transportvorgänge im mittleren Jejunum des Schweines

Nach der Aufspaltung der Nahrung durch mechanische Zerkleinerung und enzymatische Spaltung in kleine Moleküle findet die Absorption von Nährstoffen über die Darmwand statt. Um im Verdauungstrakt die Voraussetzungen zur Verdauung und Absorption der Nahrung zu schaffen, muss dem Darminhalt Wasser zugeführt werden. Dies geschieht durch die Anhangsdrüsen des Darmes, doch auch über die Darmwand selbst. Über das Darmepithel werden hauptsächlich Cl^- - und HCO_3^- -Ionen aktiv sezerniert, denen Wasser und Na^+ in das Darmlumen folgt (BARRETT, 1997). Diese, beim Menschen bis zu 8 Liter sezerniertes Wasser täglich (FREITAS, 1999), schaffen die Voraussetzungen für eine gute Durchmischbarkeit der Ingesta. Damit wird eine weitgehend homogene Verteilung der Verdauungsenzyme für die Aufspaltung der Nahrung sowie ein kontinuierlicher Wechsel der zur Absorption von Nährstoffen der Darmwand anliegenden Ingesta erreicht (BARRETT und KEELY, 2000). Diese komplexen Vorgänge zur letztendlichen Absorption von bestimmten Molekülen sind grundlegende Funktionen des Verdauungssystems, um das Leben eines Makroorganismus zu ermöglichen.

Von der Vielzahl der Strukturen, die im Verdauungssystem zusammenarbeiten, wie z.B. enterales Nervensystem, Muskulatur, Immunsystem, und deren Funktionen soll hier nur das einschichtige Epithel der Darmschleimhaut betrachtet werden. Speziell die epithelialen Transportvorgänge der Sekretion bzw. Absorption von Stoffen werden genauer besprochen.

Zusätzlich zu den in Kapitel 2.3 genannten Transportwegen, transzellulär und parazellulär, gibt es neben der Diffusion unpolarer Substanzen durch die Lipid-Doppelschicht (weiterführende Literatur siehe SINGER (2004)) 4 weitere Transportarten (ENGELHARDT und BREVES, 2000):

1. Die Diffusion von Ionen durch Kanäle aus Proteinen entlang ihres elektrochemischen Gradienten, z.B. Anionenkanäle (JENTSCH et al., 2002). Dies ist ein passiver Transport, der nach dem 'Alles oder Nichts Prinzip' abläuft, das heißt der Kanal ist entweder offen für Ionen oder geschlossen - ohne Zwischenstufen (NEHER, 1991).
2. Die zweite Möglichkeit des passiven 'Bergab'-Transportes von Stoffen besteht in der erleichterten Diffusion per Carrier. Diese Carrier sind Membranproteine und lassen vornehmlich polare Stoffe passieren, z.B. GLUT2 für die Passage von Glukose (AU et al., 2002).
3. Der primär aktive Transport 'pumpt' typischerweise Ionen unter Hydrolyse von ATP gegen ihre Konzentrationsgradienten, also 'bergauf' über die Zellmembran (CIVAN, 1983). Ein Beispiel ist hier die unten näher beschriebene Na^+ - K^+ -ATPase (KIRK et al., 1980).
4. Sekundär aktiv ist ein Mechanismus, der unter Zuhilfenahme eines durch einen primär aktiven Transport hergestellten Ionengradienten einen oder mehrere Stoffe gegen ihre Konzentrationsgradienten über die Membran transportiert (ARONSON, 1981). Der unten beschriebene Na^+ -Glukose-Kotransporter ist z.B. ein solcher sekundär aktiver Transport.

Nach dem bisherigen Kenntnisstand kommen alle diese Transportarten beim transzellulären Transport an den beiden Zellmembranen, der apikalen und der basolateralen Membran vor. Parazellulär über Tight Junctions und den Interzellullarspalt ist nur die passive Diffusion anzutreffen, wobei hier neben unpolaren Substanzen auch Ionen und polare Stoffe diffundieren können (FLORIAN et al., 2003; GARCIA et al., 1998; GOODENOUGH, 2005; MÖLLER, 1997; NUSRAT et al., 2000). Einzelheiten hierzu sind im Unterkapitel 2.4.4 zu finden.

Drei Transportvorgänge über die Dünndarmepithelzelle, sowie ein parazellulärer Transportmechanismus wurden modellhaft für verschiedene Aufgaben der Darmwand ausgewählt, um mit der vorliegenden Arbeit die Wirkungsweise von Probiotika und ihre möglichen Angriffspunkte beim Stofftransport über die Darmwand zu charakterisieren.

KOEFORD-JOHNSEN und USSING (1958) stellten nach Untersuchung der Froschhaut mit Hilfe der Ussing-Kammer die Zwei-Membranen-Hypothese auf. Sie basiert auf 4 Aussagen:

1. In der transportierenden epithelialen Zelle befinden sich eine hohe Konzentration von K^+ - und eine geringe Konzentration von Na^+ -Ionen.
2. Die nach außen zeigende Membran (apikal) ist für Na^+ -Ionen permeabel, sie ist impermeabel für K^+ -Ionen.
3. Die nach innen zeigende Membran (basolateral) ist K^+ -permeabel und beinhaltet
4. eine aktive Na^+ - K^+ -Pumpe, die Na^+ aus der Zelle und K^+ in die Zelle transportiert. K^+ rotiert durch einen später beschriebenen K-Kanal über die basolaterale Membran (KOEFOED-JOHNSEN und USSING, 1958).

Die am Epithel der Froschhaut aufgestellte 2-Membran-Hypothese beschreibt die Basisprozesse der Absorption von Na^+ , Wasser und Nährstoffen ebenso für das Dünndarmepithel des Schweines, auch wenn Einzelheiten der 4 Aussagen in späteren Jahren geändert wurden (FIELD et al., 1989; SCHULTZ und CURRAN, 1970).

Der Aufbau der Ussing-Kammer und das elektrophysiologische Messprinzip werden in Kapitel 3.3 und 3.4 vorgestellt.

2.4.1 Sekretion von Anionen, speziell Cl^- , und Wasser im Jejunum des Schweines unter dem Einfluss von PGE_2

Die Sekretion von Ionen und daraus folgend von Wasser (EGGENTON et al., 1974) wird z.B. durch mechanische Reize ausgelöst (SIDHU und COOKE, 1995) und schützt die Mukosa vor physischer Beschädigung (BARRETT und KEELY, 2000). Wie in Kapitel 2.1 beschrieben, ist die intestinale Sekretion auch ein wichtiger unspezifischer Abwehrmechanismus gegen pathogene Keime (EL ASMAR et al., 2002). Die Bedeutung der Sekretionsmechanismen wird durch die pathologischen Konsequenzen bei Fehlen oder Dysregulation der Sekretion unterstrichen (weiterführende Literatur siehe BARRETT und KEELY, 2000). Die prominenteste Ionensekretion im mittleren Jejunum ist laut BARRETT und KEELY (2000) die Sekretion von Chlorid-Ionen, denen parazellulär Na^+ und Wasser in das Darmlumen folgen. Die Cl^- -Sekretion findet überwiegend in den intestinalen Kryptenzellen statt (JENTSCH et al., 2002).

2.4.1.1 Mechanismus der Cl^- -Sekretion

Der Mechanismus der Cl^- -Sekretion beginnt an der basolateralen Membran mit der sekundär aktiven, elektroneutralen Aufnahme von Cl^- per Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Kotransporter (D'ANDREA et al., 1996). Der Na^+ -Konzentrationsgradient, welcher den Kotransporter antreibt, wird durch die ebenfalls basolateral gelegene Na^+ - K^+ -ATPase aufrecht erhalten (BLIKSLAGER et al., 1999b). Die Tätigkeit der Na^+ - K^+ -ATPase (SKOU, 1997) bildet damit die Grundlage für den sekundär aktiven Transport von Cl^- per Na^+ - K^+ - $2Cl^-$ -Kotransporter. Sie tauscht aktiv und elektrogen,

unter Hydrolyse von Adenosintri-phosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP) + Phosphat (P) 2 K^+ -Ionen gegen 3 Na^+ -Ionen entgegen ihren Konzentrationsgradienten aus (weiterführende Literatur siehe GLYNN (2002); JORGENSEN et al. (2003); KAPLAN (1983)). Das mit beiden Transportern aufgenommene K^+ strömt basolateral durch K^+ -Kanäle seinem Konzentrationsgradienten folgend wieder aus der Zelle aus (GREGER et al., 1997; MCROBERTS et al., 1985). Das K^+ befindet sich damit in einem Recycling über die basolaterale Membran (JENTSCH et al., 2002), ebenso wie Na^+ .

Eine untergeordnete Rolle in der basolateralen Cl^- -Aufnahme spielt der $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporter (SHULL et al., 2000). Cl^- wird über den $Na^+K^+2Cl^-$ -Kotransporter bis zum elektrochemischen Gleichgewicht in der Zelle akkumuliert (D'ANDREA et al., 1996), bzw. in sekretorischen Epithelien wird Cl^- bis zum 5-fachen des elektrochemischen Gleichgewichts in der Zelle angereichert (FOSKETT, 1990). Werden die apikal gelegenen Cl^- -Kanäle geöffnet strömt Cl^- dem elektrochemischen Gradienten folgend aus der Zelle aus (BEGENISICH und MELVIN, 1998). Da Cl^- automatisch durch den basolateral gelegenen Mechanismus wieder in die Zelle transportiert wird, resultiert daraus die transepitheliale Nettosekretion von Cl^- .

Von den drei in Säugetieren und Bakterien vorkommenden Cl^- -Kanal-Genfamilien, den CLC-Proteinen (CHEN, 2005; JENTSCH et al., 2005), dem CFTR (cAMP-aktiviert) (GREGER, 2000) und dem GABA- und Glycin-Rezeptor Cl^- -Kanal ($GAGA_A$) (JENTSCH und GUNTHER, 1997) wird neben CFTR mindestens eine Klasse von Cl^- -Kanälen, namentlich die Ca^{++} -aktivierten Cl^- -Kanäle in der apikalen Membran von Darmzellen exprimiert (KIDD und THORN, 2000; MERLIN et al., 1998).

Der Großteil der Cl^- -Bewegung über die apikale Membran findet via dem sehr gut untersuchten CFTR, einem cAMP-abhängigem Cl^- -Kanal statt (CLARKE et al., 1992; LOFFING et al., 1998), weiterführende Literatur siehe RIORDAN (2005).

Der Cl^- -Kanal CFTR konnte erstmals 1989 kloniert werden (KEREM et al., 1989; RIORDAN et al., 1989; ROMMENS et al., 1989). Der CFTR ist spannungsunabhängig (JENTSCH et al., 2002) und permeabel für HCO_3^- und Cl^- (FIELD, 2003). In welchem Verhältnis er diese beiden Ionen passieren lässt ist abhängig von deren Zell-Lumen-Konzentrationsdifferenzen und der relativen Leitfähigkeit des Kanals (POULSEN et al., 1994). Auch wenn dieser Kanal noch andere Anionen, z.B. NO^- oder I^- besser passieren lassen kann als Cl^- , so wird er doch oft Cl^- -Kanal genannt, da Cl^- das am häufigsten vorkommende Anion im Körper und damit das meist transportierte Ion durch diesen Kanal ist (JENTSCH et al., 2002). Im Folgenden soll der CFTR daher als Cl^- -Kanal angesprochen werden.

Dem luminal gerichteten Cl^- -Strom folgt Na^+ parazellulär, was einen Netto-Salz-Strom Richtung Lumen erzeugt (DAWSON, 1991). Dieser Salzstrom baut einen transepithelialen osmotischen Gradienten auf, dem Wasser folgt. Dies geschieht parazellulär (PAPPENHEIMER und REISS, 1987) sowie transzellulär per Aquaporinen (AGRE, 2004).

Pro Molekül ATP, das in ADP + P gespalten wird, werden 6 Cl^- -Ionen in die Zelle transportiert und bei offenen Cl^- -Kanälen in das Darmlumen sezerniert (TURNER (1993) zitiert nach BEGENISICH und MELVIN (1998)). Es werden dem Cl^- folgend parazellulär 6 Na^+ -Ionen sowie Wasser sezerniert. Weiterhin rezirkulieren 5 K^+ -Ionen und 3 Na^+ -Ionen über die basolaterale Zellmembran.

Den limitierenden Faktor des Cl^- -Transportes stellt der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter dar (FIELD, 2003). Berechnungen zur maximalen Transportgeschwindigkeit (V_{max}) bei offenen Cl^- - und K^+ -Kanälen beschreiben also die V_{max} dieses Transporters (FIELD, 2003). Berechnungen der Michaelis-Menten-Konstante des Cl^- -Transportes dagegen beschreiben das Verhalten des Transportes in Reaktion auf die den Transport stimulierende Substanz. Weitere Erläuterungen zu diesen kinetischen Parametern werden im Kapitel 3.8 gegeben, sowie in der Diskussion besprochen.

2.4.1.2 Intrazelluläre Regulation der Cl^- -Sekretion

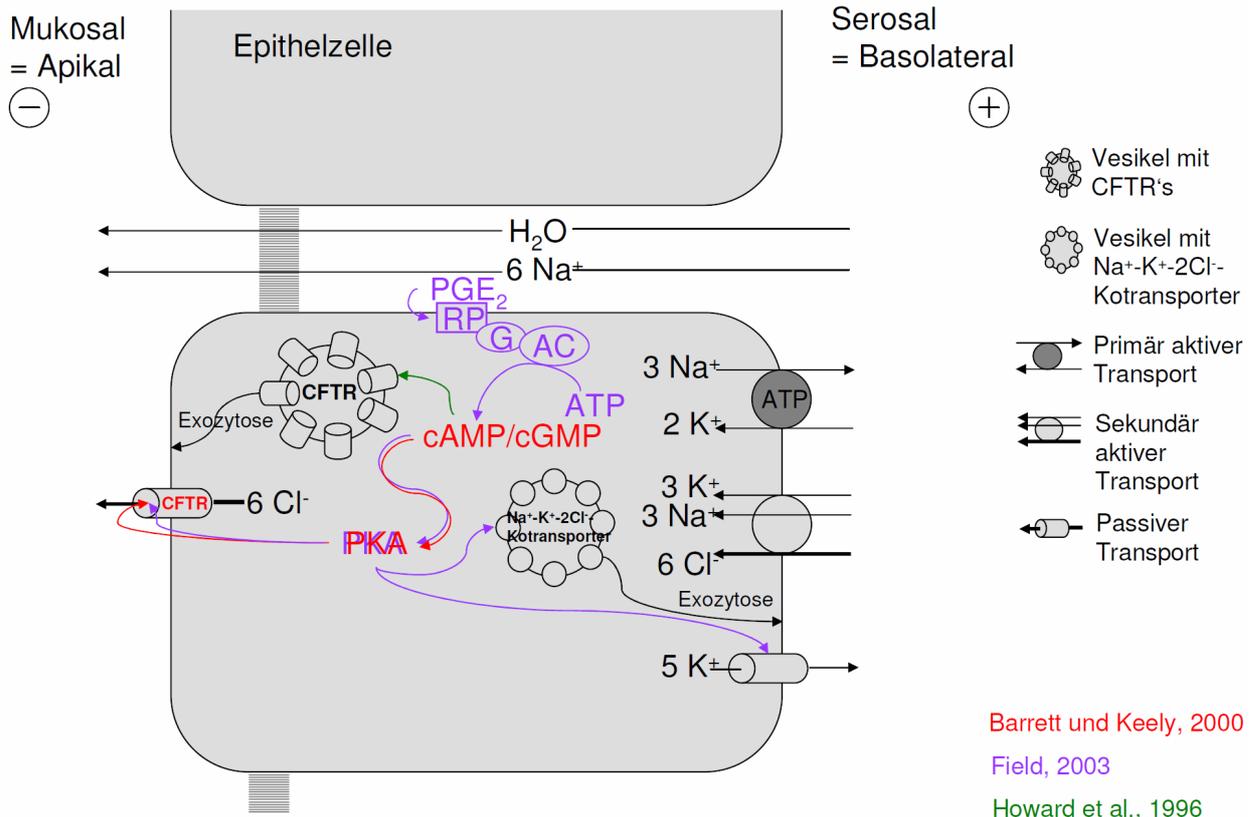


Abbildung 2.4.1 Stochiometrie und Regulation des Cl^- -Transportes unter dem Einfluss von PGE_2 (nach BARRETT und KEELY (2000), FIELD (2003), HOWARD et al. (1996)). (Abkürzungen siehe Text sowie wie folgt: RP - Rezeptor, G - G-Protein, AC - Adenylatcyclase)

Die Regulation durch Ca^{++} sowie weitere Cl^- -Transportsysteme wurden aus der Zeichnung herausgelassen, um die Übersichtlichkeit zu wahren (weiterführende Literatur in BARRETT und KEELY (2000), BERRIDGE (2005), BLIKSLAGER et al. (2001b)).

Die intrazelluläre Regulation der Cl^- -Sekretion via CFTR erfolgt nicht nur direkt am Cl^- -Kanal durch Endo- und Exozytose des Kanals (TAKAHASHI et al., 1996), sondern auch an den anderen involvierten Transportstrukturen wie K^+ -Kanal, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ -Kotransporter und $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Eine Schlüsselrolle in dieser komplexen Regulation spielt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als Stimulator der Cl^- -Sekretion (FIELD, 1976).

Der intrazelluläre Botenstoff cAMP aktiviert via Proteinkinase A (PKA) die Transportaktivitäten von drei Membranproteinen für die Cl⁻-Sekretion, die des apikalen Cl⁻-Kanals, des basolateralen K⁺-Kanals sowie des basolateralen Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporters (FIELD, 2003). Letzteres wird über 2 unabhängige Wege erreicht. Direkt durch Stimulierung der Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter-Insertion in die basolaterale Membran aus intrazellulären Vesikeln per Exozytose (D'ANDREA et al., 1996), sowie indirekt durch Öffnung der apikalen Cl⁻-Kanäle und dadurch Verminderung des intrazellulären Chlorids (LYTLE und FORBUSH, 1996).

Der CFTR wird über cAMP (YURKO-MAURO und REENSTRA, 1998) und cGMP (FRENCH et al., 1995) oder durch cGMP aktivierte Proteinkinasen positiv reguliert (FORTE et al., 1992; SINGH et al., 1998; VAANDRAGER et al., 1998), d.h. Cl⁻ kann vermehrt aus der Zelle ausströmen. Negativ wird er wahrscheinlich über Proteinphosphatasen reguliert (LUO et al., 1998; TRAVIS et al., 1997). Wie für den Na⁺-K⁺-2Cl⁻-Kotransporter gibt es auch für den CFTR cAMP-abhängige Mechanismen, die die Anzahl der Transporter in der Membran steuern (BRADBURY et al., 1994; HOWARD et al., 1996; MATTHEWS et al., 1995).

Neben dem intrazellulären Botenstoff cAMP hat auch Ca⁺⁺ auf der Ebene der zellulären Ionen-Transporter bzw. -Kanäle eine die Cl⁻-Sekretion triggernde Funktion (DEVOR und DUFFEY, 1992; VAJANAPHANICH et al., 1995). Eine Erhöhung des intrazellulären Ca⁺⁺ aktiviert möglicherweise die Adenylatcyclase über die Proteinkinase C (PKC) und erhöht so den cAMP-Spiegel - weiterführende Literatur zu dieser Regulation findet sich in BLIKSLAGER (2001).

Die Regulation der Na⁺-K⁺-ATPase kann der in BARRETT und KEELY (2000) zitierten Literatur entnommen werden.

Zusätzlich erfolgt eine Regulation der relevanten Transportproteine über die Transkription/Translation. Diese ist abhängig von der Salzaufnahme über die Nahrung (weiterführende Literatur siehe BARRETT und KEELY, 2000).

Interessant ist ebenfalls, dass der CFTR seinerseits andere Ionentransportprozesse (Cl⁻-Kanal, Na⁺-Kanal) reguliert (weiterführende Literatur siehe JENTSCH (2002)).

„Diese komplexen Regulationsmechanismen unterstreichen die physiologische Wichtigkeit und erlauben die Feinabstimmung der Flüssigkeits- und Elektrolytsekretion unter einer Vielzahl von physiologischen (z.B. postprandial) und pathophysiologischen (z.B. während Infektionen) Umständen.“ (übersetzt aus BARRETT und KEELY (2000))

2.4.1.3 Eigenschaften und Wirkungen von Prostaglandinen, speziell von PGE₂

Die Erforschung der Synthese und des Metabolismus von Prostaglandinen (PGs) im Intestinum geht bis in die 60iger Jahre zurück - beschrieben in EGGENTON et al. (1974). Die Tatsache, dass PGs eine Wirkung auf die intestinale Adenylatcyclase entfalten und eine Sekretion von Cl⁻ bewirken, war Anfang der 70iger Jahre bekannt (KIMBERG et al., 1971). Dabei erfolgt eine intestinale Flüssigkeitssekretion sekundär zur durch PGE₂ stimulierten Anionsekretion (EGGENTON et al., 1974). REDDIX et al. (1998) zeigte, dass PGE₂ direkt auf die epitheliale Zelle wirkt und die Cl⁻-Sekretion stimuliert.

Neben der Cl⁻-Sekretion wird auch die HCO₃⁻-Sekretion durch die sehr potenten Sekretagoga, welche die Prostaglandine der E-Serie (PGEs) darstellen (WEYMER et al., 1985), stimuliert (FLEMSTROM und ISENBERG, 2001). Es gibt dabei funktionelle Analogien von HCO₃⁻- und Cl⁻

-Sekretion (BARRETT, 1997), jedoch auch Unterschiede. So hemmt Histamin den PGE-Effekt auf die HCO_3^- -Sekretion ohne Effekt auf die Cl^- -Sekretion (HOGAN et al., 1995). Es soll im weiteren Verlauf jedoch nur auf die zelluläre Wirkung der PGs, die Cl^- -Sekretion, weiter eingegangen werden.

PGs beeinflussen neben den transzellulären auch parazelluläre Transportmechanismen im Schweinedünndarm (GOOKIN et al., 2003; UNMACK et al., 2001b). Sie bewirken den cAMP-vermittelten Schluss der Tight Junctions durch zytoskelettale Änderungen (DUFFEY et al., 1981; MADARA et al., 1987). Die Änderung des transepithelialen Widerstandes steht hierbei in strenger Korrelation mit Na^+ - sowie Mannitfluxen. Die Änderung des R_t kann also als Änderung des parazellulären Widerstandes angesprochen werden (BLIKSLAGER et al., 1997).

Die Induktion der Sekretion sowie die Erhöhung des Widerstandes der transepithelialen Barriere sind Mechanismen, die nach Schädigung des Epithels eine schnelle Rekonvaleszenz und eine Aufrechterhaltung der intestinalen Barriere ermöglichen (BLIKSLAGER et al., 1999b).

PGs werden z.B. bei Infektionen ausgeschüttet (BLIKSLAGER et al., 2001b) und entfalten eine zytoprotektive Wirkung (UNMACK et al., 2001b). Zytoprotektivität ist die Fähigkeit einer Substanz, die Darmmukosa vor Entzündung und Nekrose zu schützen, wenn sie enteropathogenen Mechanismen ausgesetzt ist (ROBERT et al., 1979).

Am oben genannten Beispiel einer Infektion kann die Rolle der PGs gut erläutert werden. Durch die Wirkung exokriner Mediatoren z.B. bakterielle Toxine kommt es neben direkten Wirkungen auf die Epithelzelle (BARRETT, 2000) auch zur Ausschüttung parakriner Mediatoren wie z.B. PGs aus mesenchymalen Zellen (FIELD, 2003; KANDIL et al., 1994). Diese PGs können parakrin die Cl^- -Sekretion der Epithelzellen stimulieren (BARRETT und KEELY, 2000). PGs werden jedoch nicht nur durch exokrine Mediatoren ausgeschüttet, sondern auch durch neuronale Botenstoffe (z.B. Substanz P (THORBOLL et al., 1998)) sowie durch endokrine Mediatoren (FIELD, 2003).

Anders als Hormone werden PGs nicht in der Zelle gespeichert, sondern bei Rezeptorstimulation oder mechanischem Stress plötzlich produziert und freigesetzt (BEUBLER et al., 2001; SMITH und MARNETT, 1991).

Der Austritt der PGs aus der Zelle kann durch Diffusion erfolgen (KAMP et al., 1993), es wurden aber auch PG-Transporter charakterisiert (KANAI et al., 1995). Nach Ankunft an den Zielzellen, wie Epithelzellen und Neurone, wirken PGEs z.B. von außen direkt auf die Zelle (KANDIL et al., 1994; UNMACK et al., 2001b). Sie agieren über G-Proteingekoppelte Rezeptoren vom Rhodopsintyp (EP_1 - EP_4) (weiterführende Literatur in BLIKSLAGER et al. (2001)). Die Rezeptoren EP_2 und EP_3 haben dabei die Hauptrolle (BLIKSLAGER et al., 2001b).

Die Wirkungen der PGs werden intrazellulär durch Ca^{++} , Proteinkinase C (PKC) bzw. cAMP weitergeleitet (DHARMSATHAPHORN et al., 1985; FIELD, 2003). Dabei erhöhen hohe Dosen von PGs, z.B. $1\mu\text{M}$ PGE_2 nach BLIKSLAGER (2001), den cAMP-Spiegel direkt, niedrigere wirken über Ca^{++} auf zelluläre Sekretionsmechanismen (FIELD et al., 1989), wobei Ca^{++} u.a. über die Wirkung am G-Protein eine triggernde Wirkung auf den cAMP-Spiegel in der Zelle

ausübt (BLIKSLAGER et al., 2001b; BLIKSLAGER et al., 1997; FIELD, 2003). Die PG-induzierte Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Aktivierung der Adenylatcyclase bzw. Erhöhung des intrazellulären Ca^{++} -Spiegels, u.a. über die Stimulation von enterischen Nerven durch PGs, ist hierbei gut untersucht (BLIKSLAGER et al., 1997; FIELD et al., 1981). Die Wirkungen von cAMP auf die Cl^- -Sekretion wurden bereits beschrieben.

Anhand der Literatur lässt sich zeigen, dass PGE_2 in seiner Wirkung mit der von cAMP gut übereinstimmt, z.B. öffnet PGE_2 den basolateralen K^+ -Kanal (DEACHAPUNYA und O'GRADY, 1998), induziert in der Konzentration $1 \mu\text{M}$ die Cl^- -Sekretion (BLIKSLAGER et al., 1999b), sowie den Schluss der Tight Junctions (BLIKSLAGER et al., 1997).

Andere transportphysiologische Wirkungen von PGE_2 , wie die elektroneutrale NaCl -Absorption, sind in Mechanismus und Regulation anhand weiterführender Literatur in BLIKSLAGER (2001) beschrieben.

2.4.1.4 Messung der PGE_2 -Wirkung anhand des Kurzschlussstromes und des transepithelialen Widerstandes

Die Wirkung von PGE_2 auf die elektrogene Cl^- -Sekretion (DEACHAPUNYA und O'GRADY, 1998) kann mit Hilfe der Änderung des Kurzschlussstromes (I_{sc}) in der unten beschriebenen Ussing-Kammer gemessen werden. Neben Cl^- werden auch andere Anionen in Reaktion auf PGE_2 in den Konzentrationen von $0,1$ bis $100 \mu\text{M}$ elektrogen sezerniert, doch die Cl^- -Sekretion macht den weit überwiegenden Teil der gemessenen I_{sc} -Reaktion aus (BLIKSLAGER et al., 1997; UNMACK et al., 2001b). Die durch PGE_2 gehemmte Na^+ -Absorption ist eine elektroneutrale NaCl -Absorption, deshalb mit I_{sc} nicht interferierend und beeinflusst die Messung der Cl^- -Sekretion per I_{sc} nicht (BLIKSLAGER et al., 2001b; BLIKSLAGER et al., 1999b). Nach Zugabe von PGE_2 ist die Erhöhung von I_{sc} in der Ussing-Kammer äquivalent zur Cl^- -Sekretion (ARGENZIO und LIACOS, 1990; LEONHARD-MAREK et al., 2003).

Da die I_{sc} -Reaktion auf PGE_2 konzentrationsabhängig mit einer biphasischen Sättigungskinetik ist, wird vermutet, dass 2 Rezeptoren für PGE_2 vorhanden sind (UNMACK et al., 2001b). Sowohl in höheren „pharmakologischen“ als auch in niedrigeren „physiologischen“ Konzentrationen verursacht PGE_2 einen steilen Anstieg des I_{sc} , dazwischen liegt ein Plateau (BUKHAVE und RASK-MADSEN, 1980; UNMACK et al., 2001b). Nach UNMACK (2001) befindet sich das Plateau zwischen PGE_2 -Konzentrationen von 10^{-6} - $10^{-5,5}$ mM, nach BUKHAVE und RASK-MADSEN (1980) zwischen 10^{-7} und 10^{-6} mM. Darunter gelegene Konzentrationen definieren diese Autoren jeweils als niedrig, darüber gelegene als hoch.

Nach Manipulationen, die die Umweltbedingungen des Epithels in der Ussing-Kammer ändern, treten Regulationsmechanismen am Epithel zur Anpassung an die neuen Bedingungen auf (SCHEFFLER, 1984). Dies ist an einem Anstieg des I_{sc} mit nachfolgendem Abfall in etwa den ersten 10 Minuten nach Zugabe von PGE_2 gut nachzuvollziehen (siehe auch SCHEFFLER (1984)).

PGE_2 erhöht den parazellulären Widerstand der transepithelialen Barriere (BLIKSLAGER et al., 1999b; BLIKSLAGER et al., 1997). Der R_t -Peak tritt erst etwa eine Stunde nach Zugabe von

PGE₂ auf, wobei der Anstieg sofort nach der Zugabe beginnt (BLIKSLAGER et al., 1999b). Es wurde jedoch aus technischen Gründen der R_{tV} innerhalb der ersten 10 min zur Berechnung von ΔR_t herangezogen.

Die Erhöhung von R_t nach PGE₂-Zugabe spiegelt laut BLIKSLAGER (1999) die Fähigkeit des Epithels zur Reparatur wieder. Dabei wird der erwartete R_t-Abfall aufgrund des erhöhten Ionentransportes nach PGE₂-Zugabe durch den erhöhten parazellulären Widerstand, der in durchlässigen Epithelien den transzellulären Widerstand bestimmt, vollständig kompensiert (BLIKSLAGER et al., 1999b).

2.4.1.5 Einfluss von Probiotika sowie des Alters auf die Sekretionseigenschaften des Jejunumepithels

Der Einfluss von Probiotika auf die PGE₂-stimulierte Ionensekretion wurde in der Literatur unterschiedlich beschrieben. Zum einen soll der durch PGE₂ stimulierte ΔI_{sc}, der die primär elektrogene Cl⁻-Sekretion widerspiegelt, mit Probiotikazugabe erniedrigt sein ((KRAMMER und KARBACH, 1993; LEONHARD-MAREK et al., 2003; LODEMANN et al., 2004b; SCHRÖDER und BREVES, 2004), was als Grundlage für die Abnahme der Diarrhöehäufigkeit diskutiert wird (JANSEN, 2004). Zum anderen wird ΔI_{sc} nach PGE₂-Zugabe unter der Wirkung von *Enterococcus faecium* etwas erhöht (LODEMANN et al., 2003b), wodurch mit einem etwas flüssigeren Darminhalt eine bessere Durchmischung der Ingesta, Aufspaltung der Nahrung und Absorption von Nährstoffen erfolgen (BARRETT, 1997) sowie durch eine mechanische Spülung der Mukosaoberfläche das Ansiedeln von (pathogenen) Bakterien verhindert werden kann (EL ASMAR et al., 2002).

Die Höhe des I_{sc} unter dem Einfluss von verschiedenen, die cAMP-gesteuerte Sekretion stimulierenden Substanzen, wird mit zunehmendem Alter von neonaten bis zu adulten Schweinen als gleich bleibend bis leicht abnehmend beschrieben (BOUDRY et al., 2003; BOUDRY et al., 2004; GRONDAHL et al., 1996).

Zum Einfluss des Alters speziell auf die PGE₂-stimulierte ΔI_{sc}-Reaktion existieren widersprüchliche Angaben. So ist bei älteren Ferkeln ein geringerer ΔI_{sc} als bei jüngeren (ERLWANGER et al., 1999) sowie auch umgekehrt beschrieben (LODEMANN et al., 2004b). Ferner wurde ebenfalls kein Effekt des Alters auf die ΔI_{sc}-Reaktion nach PGE₂-Zugabe beobachtet (MCEWAN et al., 1990).

2.4.2 Na⁺-gekoppelter Glukosetransport über das Jejunumepithel des Schweines

Glukose ist ein häufiges Monosacharid in der Ingesta (HEDIGER und RHOADS, 1994) und Hauptenergiequelle der meisten Körperzellen (TANG et al., 2004). Der Na⁺-gekoppelte Glukosetransport über den SGLT-1 ist der Hauptabsorptionsweg für diesen Zucker in der Darmepithelzelle (WRIGHT et al., 2004).

Anfang des 20igsten Jahrhunderts wurde beschrieben, dass der Glukosetransport im Dünndarm Na⁺-abhängig ist (REID (1902) zitiert nach SCHULTZ und CURRAN (1970), sowie weiterführende Literatur in REUSS (2000)). Die Glukoseaufnahme scheint in dieser Form vor allem durch Villuszellen zu erfolgen (STEWART und TURNBERG, 1987).

Eine detailliertere Vorstellung entwickelten WRIGHT et al. (1981). Nach ihnen erfolgt der Glukosetransport über das Epithel in zwei Etappen: 1. ein Na^+ -Glukose-Kotransport über die apikale Membran und 2. die erleichterte Diffusion des Zuckers aus der Zelle über die basolaterale Membran entlang des Konzentrationsgradienten. Schritt 1 ist hierbei der den Transport limitierende Faktor (RABITO und AUSIELLO, 1980).

Der SGLT-1 ist der einzige apikale Glukosetranporter im Dünndarm, er wird durch Glukose stimuliert (WRIGHT, 1993). Hierbei werden 2 Na^+ -Ionen gemeinsam mit einem Glukosemolekül transportiert (MACKENZIE et al., 1994; MISFELDT und SANDERS, 1981). Durch den Nettotransport von positiven Ladungen ist der Na^+ -Glukose-Kotransport elektrogen (UMBACH et al., 1990). Der Na^+ -Glukose-Kotransport wird sekundär aktiv durch die basolateral gelegene Na^+ - K^+ -ATPase über die intrazelluläre Na^+ -Konzentration als 'Keilriemen' angetrieben (WRIGHT et al., 1981). Die Na^+ - K^+ -ATPase wurde oben ausführlich beschrieben.

Die Glukose wird an der basolateralen Membran per erleichteter Diffusion durch den Glukosetransporter GLUT2 aus der Zelle heraus transportiert (AU et al., 2002; WRIGHT, 1993; WRIGHT et al., 2004). Der GLUT2 transportiert Glukose elektroneutral, ohne gekoppeltes Ion (THORENS, 1993). Er wird ausschließlich in den Villi, nicht in den Krypten exprimiert und ist somit ein Zeichen der Differenzierung der epithelialen Zelle (THORENS et al., 1990).

Der transepitheliale Na^+ -gekoppelte Glukosetransport ist ein Nettotransport von einem Glukosemolekül mit 2 Na^+ unter Hydrolyse von ATP. Dies ist mit dem Transport von Wasser verbunden (DUQUETTE et al., 2001; LOO et al., 1996). Das Wasser sorgt für einen osmotischen Ausgleich, wobei 220-260 Moleküle H_2O pro Molekül Glukose transportiert werden (DUQUETTE et al., 2001; LOO et al., 1996). Für ein Mol Glukose werden geschätzt etwa 6 Liter Wasser resorbiert, das heißt, in Anwesenheit von Glukose wirkt SGLT-1 als Wasserpumpe (WRIGHT et al., 2004). In Abwesenheit von Glukose kann er im Darm als Wasserkanal (LOO et al., 2002; PANAYOTOVA-HEIERMANN und WRIGHT, 2001), ähnlich wie Aquaporine (AGRE, 2004) wirken.

Die Regulation des SGLT-1 ist sehr gut untersucht und in der Literatur ausführlich beschrieben (DIEZ-SAMPEDRO et al., 2003; FERRARIS und DIAMOND, 1997; WRIGHT, 1993; WRIGHT et al., 1997; WRIGHT et al., 2004).

2.4.2.1 Messung des Na^+ -gekoppelten Glukosetransportes anhand des Kurzschlussstromes

Aufgrund seiner Elektrogenität eignet sich der Na^+ -gekoppelte Glukosetransport sehr gut für die Untersuchung mit der Ussing-Kammer-Technik (UMBACH et al., 1990).

Der I_{sc} ist unter dem Einfluss von Indomethacin ein Maß der apikalen Glukoseaufnahme per SGLT-1 in die Zelle, was indirekt - abzüglich des in der Zelle verstoffwechselten Teiles der Glukose (WU et al., 1995) - dem transepithelialen elektrogenen Na^+ -gekoppelten Glukosetransport entspricht und durch verschiedene Versuche in der Literatur belegt ist (BREVES et al., 2001; SCHULTZ und ZALUSKY, 1964a; SUSSMAN und RENFRO, 1997; UNMACK et al., 2001b; USSING, 1965).

Ein weiterer, die Messung beeinflussender Mechanismus ist der Na^+ -Uniport durch den SGLT-1 bei Abwesenheit von Glukose (8-34% des maximal möglichen Na^+ -Glukose-Kotransportes) (LOO et al., 1999; UMBACH et al., 1990; WRIGHT et al., 2004). Die Höhe dieses Transportes vor der Glukosezugabe ist unbekannt und im basalen I_{scB} enthalten. Bei Glukosezugabe wird dieser Na^+ -Transport mit Glukose gekoppelt ausgeführt und somit der I_{scB} erst ab einer gewissen Glukosekonzentration, bei welcher der gekoppelte Transport den vorherigen Na^+ -Transport übertrifft, überschritten. Die Na^+ -gekoppelte Glukoseaufnahme via Glukosetransporter SGLT-1 kann auch als Glukosekonzentrationsabhängige Na^+ -Aufnahme betrachtet werden (HOLTUG und SKADHAUGE, 1991). ΔI_{sc} für den Na^+ -gekoppelten Glukosetransport wird so pro Tier systematisch, mit individuellen Schwankungen zwischen den Tieren, etwas zu klein gemessen.

Neben dem SGLT-1 transportiert der oben genannte GLUT2 ebenfalls Glukose, jedoch elektroneutral, damit hat er keinen Einfluss auf den I_{sc} und Schwankungen der GLUT2-Transporteranzahl in der apikalen Membran unter In-vitro-Bedingungen sind ebenfalls ohne Auswirkungen (KELLETT, 2001; THORENS, 1993).

Aufgrund von Gegenregulationsmechanismen und anderen z.T. nicht bekannten transportbeeinflussenden Vorgängen wird bei der Glukoseaufnahme ein Peak mit nachfolgendem Abfall des ΔI_{sc} innerhalb der ersten 5-10 min nach Zugabe beobachtet (JANSEN, 2004; LODEMANN et al., 2004a; RHOADS et al., 1990).

Der I_{sc} als Maß der Na^+ -abhängigen Glukoseaufnahme ist eine sättigbare Funktion der Glukosekonzentration mit einer Michaelis-Menten-Kinetik (weiterführende Literatur siehe BREVES et al. (2000), HALAIHEL et al. (1999), HOLTUG und SKADHAUGE (1991), LODEMANN et al. (2003a), LODEMANN et al. (2003b), SCHULTZ und CURRAN (1970)), wobei Na^+ -Konzentrationen unter 140 mM im Puffer Einfluss auf die Höhe von K_m bzw. V_{max} des Glukosetransportes haben (SCHULTZ und ZALUSKY, 1964b; WRIGHT et al., 1991).

2.4.2.2 Einfluss von Probiotika sowie des Alters auf den Na^+ -gekoppelten Glukosetransport über das Jejunumepithel

Der Glukosetransport als ein Modell für die Nährstoffabsorption ist bei Probiotika-gefütterten Ferkeln höher als bei den Kontrolltieren beschrieben worden (BREVES et al., 1997a; BREVES et al., 2000; JANSEN, 2004).

Die Zugabe von Glukose in der Konzentration von 30 mM erhöhte den I_{sc} , wie auch den Netto- Na^+ -Flux, durch einen erhöhten Na^+ -Flux von mukosal nach serosal, wobei 21 Tage alte Schweine höhere unidirektionale Na^+ -Fluxe und eine höhere I_{sc} -Antwort als 3 Tage alte Tiere aufwiesen (RHOADS et al., 1990; RHOADS et al., 1992). Nach dem Absetzen fiel die I_{sc} -Reaktion auf Glukose über die Messzeitpunkte 21., 29. und 36. Lebenstag leicht ab (BOUDRY et al., 2003; BOUDRY et al., 2004). Einen ähnlichen Verlauf fanden PUCHAL und BUDDINGTON (1992) mit einem Anstieg des Glukosetransportes vom 1. zum 10. Lebenstag, welcher dann vom 10. zum 30. Lebenstag gleich blieb.

Es ist bekannt, dass der SGLT-1 regulativ beeinflusst werden kann (siehe Literatur in VEYHL et al. (2003)). Daraus ergibt sich die Möglichkeit der Beeinflussung von K_m bzw. V_{max} . Es

wurde ein steigender Effekt von *Bacillus cereus var. toyoi* auf V_{\max} des Na^+ -gekoppelten Glukosetransportes ohne Veränderung von K_m beschrieben (BREVES et al., 2000). Dagegen war durch das Alter keine Veränderung von K_m oder V_{\max} nachweisbar (PUCHAL und BUDDINGTON, 1992).

2.4.3 Na^+ -gekoppelter Aminosäuretransport über das Jejunumepithel des Schweines

Der zweite Na^+ -gekoppelte Nährstofftransport, der im Rahmen dieser Arbeit behandelt wird, ist die Glutaminabsorption. Als Beispiel für den Transport von Aminosäuren ist die elektrogene Na^+ -gekoppelte Glutaminabsorption an der Dünndarmepithelzelle häufig untersucht worden und gut beschrieben (BLIKSLAGER et al., 2001a; BLIKSLAGER et al., 1999a; KANDIL et al., 1995; KOVACEVIC und MCGIVAN, 1984; RHOADS et al., 1994; RHOADS et al., 1990).

Glutamin ist eine für den Säugetierorganismus sehr wichtige Aminosäure. Sie ist mit 20% des gesamten Aminosäuren-pools des Blutplasmas die prinzipiell im Körper zirkulierende Aminosäure (MEISTER, 1984). Glutamin ist neben Glukose der grundlegende metabolische Energieträger im Dünndarm von Säugetieren (weiterführende Literatur siehe BLIKSLAGER et al. (2001a), RHOADS et al. (1994), WINDMUELLER (1982)). Glutamin ist für den Metabolismus der Darmzelle, speziell in katabolen Zuständen, verantwortlich (HANSON und PARSON, 1988). Des Weiteren ist Glutamin Stimulator der NaCl - und damit der Wasserabsorption sowie der Epithelreparation, unter anderem erhöht es die Überlebenszeit von Enterozyten (BLIKSLAGER et al., 1999a; KANDIL et al., 1995; NATH et al., 1992; RHOADS et al., 1990; RHOADS et al., 1992).

Der Glutamintransport läuft, ebenso wie der oben beschriebene Glukosetransport in zwei Etappen ab. Die erste Etappe ist der Na^+ -Glutamin-Kotransport über die apikale Membran.

Glutamin wird über die apikale Membran aufgenommen, jedoch im Unterschied zu beta-Aminosäuren wahrscheinlich nicht mit Hilfe eines Aminosäure- Na^+ - Cl^- -Kotransporters (TURNER, 1986), sondern zu einem großen Teil über einen Na^+ -abhängigen Aminosäuretransporter (ASC) für neutrale Aminosäuren (MUNCK et al., 2000). ASC ist für etwa 50% der Glutaminaufnahme aus dem Darmlumen zuständig (weiterführende Literatur siehe BLIKSLAGER et al. (2001a)) und im Gegensatz zum SGLT-1 sowohl in den Villi als auch in der Übergangsregion Villus-Krypte und in den Krypten lokalisiert (BLIKSLAGER et al., 2001a). Daneben wird Glutamin durch 2 weitere Na^+ -abhängige AS-Transportsysteme aus dem Darmlumen in die Zelle transportiert (WRIGHT et al., 1981).

Der ASC wird, wie auch die oben beschriebene Glukoseabsorption sowie die Cl^- -Sekretion durch die basolaterale Na^+ - K^+ -ATPase angetrieben (WRIGHT et al., 1981).

ASC befindet sich wahrscheinlich nicht nur an der apikalen Membran sondern auch an der basolateralen Membran. Er nimmt dort Glutamin aus dem Blut auf, wenn die Darmzelle nicht ausreichend über die Ingesta damit versorgt wird (BLIKSLAGER et al., 2001a).

Bei ausreichender Aufnahme aus dem Darmlumen kann jedoch die zweite Etappe der Glutaminresorption, ein Austritt von Glutamin basolateral aus der Zelle ins Blut erfolgen,

wobei hierzu ein Na^+ -unabhängiges System, eine erleichterte Diffusion, vermutet wird (BLIKSLAGER et al., 2001a; WRIGHT et al., 1981).

Glutamin fördert die Netto- Na^+ -Absorption im Fall einer Infektion des Ileum z.B. beim Kalb (BLIKSLAGER et al., 2001a) und beim Schwein (ARGENZIO et al., 1994).

Die Regulation der Aufnahme von Glutamin in die Zelle wird erst seit der Jahrtausendwende genauer erforscht. Laut neuerer Literatur scheint sie über PKC reguliert zu werden (PAN et al., 2002). Ebenso spielt der pH des Extrazellulärraumes eine regulatorische Rolle (PAN et al., 2004).

2.4.3.1 Messung des Na^+ -gekoppelten Glutamintransportes anhand des Kurzschlussstromes

Analog zum Na^+ -gekoppelten Glukosetransport ist die gemessene Kurzschlussstromänderung nach Glutaminzugabe der Indikator der Menge des elektrogenen Na^+ -gekoppelten Glutamintransportes über die apikale Membran in die Zelle. Der Nettotransport von Glutamin über das Epithel sowie der in der Zelle verstoffwechselte Teil (WU et al., 1995) wird nicht erfasst. Die Zugabe von Glutamin in der Konzentration 10 mM ergibt im Jejunum des Kalbes einen signifikanten I_{sc} -Anstieg, der äquivalent zur Na^+ -Absorption ist (BLIKSLAGER et al., 2001a).

Wird der I_{sc} -Peak innerhalb der ersten 5 Minuten nach Glutaminzugabe gemessen, können danach eventuell auftretende (z.T. unbekannt) Gegenregulationsmechanismen von der Messung ausgeschlossen werden (RHOADS et al., 1990).

Der Transport aller neutralen Aminosäuren erfolgt über die gleichen Systeme. Sie können sich damit gegenseitig bei der Na^+ -gekoppelten Absorption hemmen (FAN et al., 1998; MUNCK et al., 2000). Wird Glutamin jedoch dem Puffer als einzige Aminosäure zugegeben, werden kompetitive Effekte vermieden.

Glutamin stimuliert als einzige Aminosäure den elektroneutralen NaCl -Transport (GRONDAHL et al., 1997; RHOADS et al., 1990). Aufgrund der Elektroneutralität ergibt diese Wirkung des Glutamins keinen Fehler in der Messung der I_{sc} -Änderung durch die Na^+ -gekoppelte Glutaminabsorption (RHOADS et al., 1990).

Im Ileum des Kalbes hat Indomethacin (siehe Kapitel 5.1.3) einen hemmenden Effekt auf die Na^+ -gekoppelte Glutaminabsorption, der dosisabhängig mit Zugabe von PGE_2 oder durch hohe endogene PGE_2 -Spiegel aufgehoben werden kann (BLIKSLAGER et al., 2001a). Dies ist für das Jejunum des Schweines nicht beschrieben, sollte jedoch als mögliche Fehlerquelle betrachtet werden.

2.4.3.2 Einfluss von Probiotika sowie des Alters auf den Na^+ -gekoppelten Glutamintransport über das Jejunumepithel des Schweines

L-Glutamin stimuliert den Kurzschlussstrom unter der Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* sowie auch bei anderen Probiotika mehr als in der jeweiligen Kontrollgruppe (JANSEN, 2004).

Bei Schweinen zeigte sich vom 3. bis zum 21. Lebenstag eine Abnahme der I_{sc} -Reaktion auf die Zugabe von Glutamin (RHOADS et al., 1990). Transportraten von Aminosäuren verlaufen jedoch je sehr individuell unterschiedlich mit zunehmendem Alter (BUDDINGTON et al., 2001). Der Na^+ -gekoppelte Glutamintransport stieg vom 14. über den 28. auf den 35. Lebenstag an um danach zum 56. Tag auf tiefere Werte als am 14. Tag abzufallen. Diese Unterschiede zwischen den Altersgruppen waren jedoch nicht signifikant (JANSEN, 2004).

2.4.4 Die parazelluläre Permeabilität und der Gewebewiderstand als Modell für die Barrierefunktion des Jejunumepithels des Schweines

Ein Jahrhundert der Forschung hat zu einem grundlegenden Verständnis der Rolle der Tight Junctions geführt. Diese interzelluläre Verbindung formt eine regulierte, semipermeable Barriere in den Lücken zwischen den epithelialen und endothelialen Zellen. Integrale Membranproteine, Okkludin und Claudine wurden als die wichtigsten barriereformenden Strukturen identifiziert (TAVALALI et al., 2002).

Der Transport von Molekülen und Ionen erfolgt parazellulär per Diffusion durch die Lücken in den Tight Junctions, getrieben durch transepitheliale Konzentrationsgradienten der Substanzen oder auch durch den „solvent drag“ - ein Mitziehen von in Wasser gelösten Teilchen beim Wassertransport (USSING, 1965). Der Transport wird gesteuert durch chemo-mechanische Veränderungen in den Tight Junctions. Hierbei bilden Claudine regulatorisch wichtige ladungsselektive Poren in den Tight Junctions (ANDERSON, 2001; COLEGIO et al., 2002).

Die Regulation des Transportes über die Tight Junctions erfolgt über den Öffnungsgrad des sie umgebenden Actin-Myosin-Ringes (FLORIAN et al., 2002; MADARA, 1989). Der Schluss dieses Ringes wird über cAMP reguliert (DUFFEY et al., 1981). Ebenso werden die Tight Junctions über die in dieser Kaskade wirksamen Transmitter PKA, PKC und GTP-bindende Proteine, die auf den perijunktionalen Aktinring wirken, beeinflusst (KOHLENER et al., 2004; TURNER et al., 1999). Durch diese, auch durch PGE auslösbare, Transduktionskaskade wird ein Schluss der Tight Junction bewirkt, wodurch der parazelluläre Widerstand R_t erhöht wird (BLIKSLAGER et al., 1997; UNMACK et al., 2001b).

Sehr großen Einfluss auf die Permeabilität hat auch die Motilität des Darmes (MADARA und TRIER (1994) zitiert nach BALTESS (2001)), welche *in vitro* jedoch nicht untersucht werden kann und in der vorliegenden Arbeit nicht betrachtet werden soll.

2.4.4.1 Messung der parazellulären Barrierefunktion

Um die Barriereigenschaften des Dünndarmepithels zu beschreiben, ist die Messung des parazellulären Transportes mit Hilfe von 3H -Mannit als Modellsubstanz bei zeitgleicher Dokumentation des transepithelialen Widerstandes R_t etabliert (BLIKSLAGER et al., 1999b). Es existiert eine enge Korrelation zwischen unidirektionalen 3H -Mannit-Fluxen und Änderung des parazellulären Widerstandes (weiterführende Literatur siehe MADARA et al. (1986), MADARA und DHARMSATHAPHORN (1985), WINCKLER (1997)). Hierbei wird der Begriff „Flux“ für den durch radioaktive Markierung direkt gemessenen transepithelialen Transport von Stoffen seit USSING (1949) verwendet.

Mannit als inerter, durch seine Molekülgröße ausschließlich parazellulär transportierter Zucker repräsentiert die parazelluläre Permeabilität gegenüber ungeladenen Teilchen (TURNER et al., 1997). Die R_t -Messung dagegen basiert auf den in durchlässigen Epithelien zum Großteil parazellulär transportierten geladenen Teilchen (BAKKER und GROOT, 1984). Der R_t bietet demnach bei durchlässigen Epithelien eine gute Näherung für den parazellulären Widerstand und es kann per R_t der ionale Teil des parazellulären Transportes beurteilt werden (BAKKER und GROOT, 1984).

Für eine exakte Fluxmessung muss vor der ersten Probennahme eine homogene Verteilung des ^3H -Mannits im Puffer sichergestellt und die 20-minütige 'Lag'-Phase nach Zugabe des ^3H -Mannits abgeschlossen sein (NEJDFORS et al., 2000). Weiterführende Literatur zur Fehlerabschätzung bei Fluxmessungen können FANNING et al. (1999) entnommen werden.

2.4.4.2 Veränderung der parazellulären Barrierefunktion unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* bzw. des Alters

Unter Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* wurde eine Verringerung der unidirektionalen Fluxes von ^3H -Mannit, nicht jedoch der Nettofluxes beobachtet, wobei der R_t ohne statistische Signifikanz erhöht war (BREVES et al., 1997b; WINCKLER et al., 1998).

Im Widerspruch dazu wurde R_t unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* in einer anderen Veröffentlichung geringer (BREVES et al., 2000). Für andere Probiotika (*Lactobacillus acidophilus* und *Streptococcus thermophilus*), hingegen wurde eine R_t -steigernde Wirkung beschrieben (RESTA-LENERT et al., 2002).

Für *Enterococcus faecium* sind bei der Messung von unidirektionalen ^3H -Mannit-Fluxen und R_t die Unterschiede zwischen den Alters- bzw. Fütterungsgruppen als nicht konsistent beschrieben (JANSEN, 2004).

Bei Bestimmung der Einflüsse des Alters auf die Barrierefunktion mit Hilfe von R_t veränderte sie sich nicht, bzw. bei der Fluxmessung mit Meerrettichperoxidase wurde sie über die Messzeitpunkte 21., 29. und 36. Lebenstag etwas schwächer (BOUDRY et al., 2004). Wurde ausschließlich R_t gemessen, zeigte sich zwischen den Messzeitpunkten 7-11 Tage und 6-8 Wochen keine Änderung (ERLWANGER et al., 1999).

2.5 Zusammenfassung der Literatur in Bezug auf die eigene Fragestellung und Arbeitshypothesen

Die Wirkungen der Applikation von diversen Probiotika wurden bei verschiedenen Tierarten untersucht. Bei diesen Forschungen standen entweder das Tier als Modell für die probiotischen Wirkungsweisen im Menschen oder die leistungssteigernde Wirkung und die ihr zugrunde liegenden Mechanismen beim Nutztier im Vordergrund. Die Einflüsse des Alters auf die Transport- und Barrierefunktion des Darmes wurden dabei nur wenig untersucht.

Für einige dieser Veröffentlichungen wurden transportphysiologische Messungen an isolierten Epithelien (u.a. des Jejunums des Schweines) durchgeführt, um mögliche Veränderungen

der Transporteigenschaften des Jejunumepithels durch Verfütterung eines Probiotikums (z.B. *Bacillus cereus var. toyoi*) bzw. unter dem Einfluss verschiedenen Alters zu erfassen.

Die in dieser Dissertation über das Probiotikum *Bacillus cereus var. toyoi* beim Schwein verschiedenen Alters durchgeführten transportphysiologischen Untersuchungen am Epithel des mittleren Jejunums sollen die bereits erschienenen Veröffentlichungen weiterführen und ergänzen. Zwei Fragen können aus der bekannten Literatur abgeleitet werden.

1. Werden transepitheliale Transportprozesse durch die Verabreichung von *Bacillus cereus var. toyoi* beeinflusst?
2. Hat das Alter der Schweine einen Einfluss auf transepitheliale Transportmechanismen?

Zur Klärung dieser beiden Grundfragen wurden vier unterschiedliche Transporte am Dünndarm ausgewählt und mit der nachfolgend beschriebenen Ussing-Kammer-Methode untersucht. Zu diesen Transporten können anhand der Literatur spezielle Arbeitshypothesen abgeleitet werden.

Zum möglichen Probiotikaeinfluss kann auf Grundlage der vorhandenen Literatur vorausgesetzt werden:

Der durch PGE₂ stimulierte ΔI_{sc} spiegelt die primär elektrogene Cl⁻-Sekretion wider. Er fällt mit Probiotikazugabe geringer aus als ohne diese (KRAMMER und KARBACH, 1993; LODEMANN et al., 2004b; SCHRÖDER und BREVES, 2004). Die I_{sc}-Reaktion auf PGE₂-Zugabe ist konzentrationsabhängig mit einer Sättigung und einer Michaelis-Menten-Kinetik (UNMACK et al., 2001b).

Der Glukosetransport als Modell für die Nährstoffabsorption ist bei Probiotika-gefütterten Ferkeln höher als bei Kontrolltieren (BREVES et al., 2000). Als Versuchsparameter dient der durch den Na⁺-gekoppelten Glukosetransport induzierte Kurzschlussstrom ΔI_{sc} (BREVES et al., 1997a). Die I_{sc}-Reaktion auf Glukose-Zugabe ist konzentrationsabhängig und zeigt eine Michaelis-Menten-Kinetik (KAUNE et al., 1992). V_{max} ist bei Untersuchung von 'brush-border membrane vesicles' ('BBMV') unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* höher, wobei kein Effekt auf K_m auftritt (BREVES et al., 2000).

Bei Ferkeln der Probiotikagruppe ist eine Dipeptid- bzw. Glutaminabsorption höher als in der Kontrollgruppe, was durch den transportinduzierten ΔI_{sc} gekennzeichnet wird (BREVES et al., 2000; JANSEN, 2004).

Die parazelluläre Permeabilität, die mit H³-Mannit als Marker gemessen wird, ist in der Probiotikagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert (BREVES et al., 1997b). Dabei ist der im Jejunum vor allem durch den parazellulären Widerstand bestimmte transepitheliale Widerstand R_t geringgradig, jedoch nicht signifikant erhöht (WINCKLER et al., 1998; WINCKLER, 1997). Dies spiegelt die durch Probiotika verbesserte Barrierefunktion wieder.

Als Arbeitshypothesen zum Einfluss des Probiotikums *Bacillus cereus var. toyoi* auf die Transportvorgänge im mittleren Jejunum des Schweines können aus dem oben zusammengefassten direkt und indirekt abgeleitet werden:

- Der durch PGE₂ stimulierte ΔI_{sc} ist in der Probiotikagruppe geringer als in der Kontrollgruppe.
- Mit Hilfe verschiedener PGE₂-Konzentrationen werden die maximale Transportgeschwindigkeit (V_{max}) und die Michaelis-Menten-Konstante (K_m) berechnet. Es wird vermutet, dass V_{max} in der Probiotikagruppe geringer ausfällt, wobei K_m nicht beeinflusst wird.
- Der durch PGE₂ stimulierte ΔR_t ist in der Probiotikagruppe höher als in der Kontrollgruppe.
- Der durch den Na⁺-gekoppelten Glukosetransport induzierte Kurzschlussstrom ΔI_{sc} ist bei den mit Probiotika gefütterten Ferkeln höher als bei den Kontrolltieren.
- Über ansteigende Konzentrationen von Glukose werden die Parameter V_{max} und K_m für den Na⁺-gekoppelten Glukosetransport berechnet. V_{max} ist unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* höher gegenüber der Kontrollgruppe. Auf K_m hat die Fütterung keinen Einfluss.
- Der durch den Na⁺-gekoppelten L-Glutamintransport hervorgerufene I_{sc} ist in der Probiotikagruppe höher als in der Kontrollgruppe.
- Unidirektionale H³-Mannit-Fluxe sind in der Probiotikagruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert, R_t zeigt keine signifikante Änderung.

Bei der Betrachtung eines möglichen Alterseinflusses innerhalb des untersuchten Aufzuchtzeitraumes der Ferkel kann weiterhin vorausgesetzt werden:

Die durch PGE₂ stimulierte ΔI_{sc} -Reaktion bleibt nach Aussagen in der Literatur während des Alterszeitraumes von der 2. bis zur 8. Lebenswoche etwa gleich (MCEWAN et al., 1990; MILLER und SKADHAUGE, 1997).

Ebenso weist der durch den Na⁺-gekoppelten Glukosetransport induzierte Kurzschlussstrom ΔI_{sc} keine signifikanten Unterschiede zwischen der 2. und 8. Lebenswoche von Ferkeln auf (PUCHAL und BUDDINGTON, 1992).

Der durch den Na⁺-gekoppelten L-Glutamintransport induzierte Kurzschlussstrom ΔI_{sc} verringert sich leicht mit zunehmendem Alter (JANSEN, 2004; RHOADS et al., 1990).

Die Barrierefunktion des Jejunumepithels, gemessen anhand des transepithelialen Widerstandes R_t , bzw. mit ³H-Mannit-Fluxen verändert sich nicht zwischen der 2. und 8. Lebenswoche (BOUDRY et al., 2004; ERLWANGER et al., 1999; JANSEN, 2004).

Als Arbeitshypothesen zum Einfluss des Alters auf die Transportvorgänge im mittleren Jejunum des Schweines können aus der bekannten Literatur direkt und indirekt abgeleitet werden:

- Die durch PGE₂ stimulierte ΔI_{sc} -Reaktion bleibt in allen Altersgruppen gleich.
- K_m für die PGE₂-stimulierte Cl⁻-Ionensekretion steigt mit zunehmendem Alter an, V_{max} fällt dabei ab.

- Die durch PGE_2 stimulierte ΔR_t -Erhöhung bleibt in allen Altersgruppen gleich.
- Der durch den Na^+ -gekoppelten Glukosetransport induzierte Kurzschlussstrom ΔI_{sc} weist zwischen den Altersgruppen keine Unterschiede auf.
- Mit zunehmendem Alter steigt V_{max} des Na^+ -gekoppelten Glukosetransportes an, wobei K_m gleich bleibt.
- Der durch den Na^+ -gekoppelten L-Glutamintransport induzierte Kurzschlussstrom ΔI_{sc} zeigt keine signifikanten Änderungen mit zunehmendem Alter.
- Mit zunehmendem Alter verändert sich die per unidirektionaler H^3 -Mannit-Fluxraten sowie R_t gemessene parazelluläre Permeabilität nicht.