

## 5 Diskussion

Vor der Diskussion der Ergebnisse sowie daraus eventuell möglichen Rückschlüssen auf die Wirkungsweise des Probiotikums *Bacillus cereus var. toyoi* bzw. auf die Einflüsse des Alters auf die intestinale Barriere muss eine differenzierte Kritik an der Methode stehen. Erst nach Aufzeigen der Grenzen der angewandten Techniken und Berechnungen sind angemessene Interpretationen der Ergebnisse möglich.

### 5.1 Methode und Methodenkritik

*In vitro*-Versuche an Epithelien in der Ussing-Kammer werden seit 1951 durchgeführt und sind inzwischen gut etabliert (USSING und ZERAHN, 1951).

Das Epithel kann in der Ussing-Kammer als „Blackbox“ betrachtet werden (CIVAN, 1983). In den letzten Jahrzehnten wurden viele Erkenntnisse über die Transportmechanismen von Epithelien gewonnen - siehe Literaturteil 2.4 - weshalb die 'Blackbox' 'Epithel' keine echte Blackbox mehr ist und die Messergebnisse aus der Ussing-Kammer sicher als einzeln angesprochene Mechanismen interpretierbar sind.

Diese Messungen in der Ussing-Kammer, also unter künstlichen Bedingungen, lassen in vielen Fällen qualitative Rückschlüsse auf die Verhältnisse am Epithel *in vivo* zu (SCHULTHEIß, 1995).

#### 5.1.1 Kritik in Bezug auf die Versuchstiere

In Bezug auf das in Kapitel 3 vorgestellte Tiermaterial sind trotz der standardisierten Aufzucht, Haltung und Fütterung auch verschiedene nicht zu beeinflussende Einwirkungen auf die Tiere aufgetreten.

Damit sind die vorhandenen großen Streuungen zwischen den Tieren, auch innerhalb einer Alters- bzw. Fütterungsgruppe, auf mehrere bekannte (sowie mit großer Wahrscheinlichkeit auch einige unbekannte) Faktoren zurückzuführen:

Die Versuche fanden über den Zeitraum von einem Jahr, Mai bis April statt. Etwaige saisonale Schwankungen sind auf Grund der geringen Gruppengrößen nicht abschätzbar, werden aber durch die Verteilung der Würfe über fast ein Jahr in der Gesamtheit der Untersuchungen wahrscheinlich kompensiert.

Die Tiere waren aufgrund ihrer Abstammung genetisch und phänotypisch sehr heterogen sowie von unterschiedlichem Geschlecht. Trotz ausgeglichener (standardisierter Mindest-) Wurfgröße traten Würfe mit extrem kleinen, bzw. extrem großen Ferkeln auf.

Die Menge des dem Futter zugesetzten Probiotikum war zwar festgelegt, jedoch erfolgte keine definierte Gabe des Probiotikums an die Tiere. Daraus ergab sich, dass Ferkel mit hoher Futteraufnahme mehr Probiotikum erhielten als Ferkel mit geringer Futteraufnahme. Dieses Vorgehen ist sehr praxisnah, führt aber zu Unterschieden in den Versuchsbedingungen, die nur entweder durch direkte, definierte Probiotikagabe oder, da auch zusätzlich Effekte durch die Höhe Futteraufnahme selbst zu beobachten sind (CAREY et al., 1994), mit einer höheren Anzahl von Tieren pro Versuchsgruppe ausgeglichen werden könnte.

Auch die Kotkonsistenz war zwischen den als klinisch gesunden und damit für den Versuch tauglichen Tieren sehr heterogen, was auf sehr heterogene Verhältnisse im Darm der Tiere hinweisen kann.

Alle diese Einflüsse sind prinzipiell kein Problem für die Auswertung der Untersuchungen, da sie alle in Praxi auftreten können. Das Problem besteht vielmehr in der geringen Tierzahl pro Untersuchungsgruppe, die ein sehr homogenes Untersuchungsmaterial fordert, damit Effekte zwischen den Gruppen nicht durch die Streuungen überlagert werden.

### 5.1.2 Kritik zur Präparation

Verschiedene Tötungsmethoden zeigten keine Auswirkungen auf die elektrischen Parameter (HOLTUG und SKADHAUGE, 1991). Es wurde außerdem bei allen Untersuchungen die gleiche Tötungsmethode angewandt, weshalb kein Einfluss der Tötung auf die Messergebnisse angenommen wird.

Obwohl das Handling, bestehend aus Entnahme, Präparation, Probentransport und Einbau der Epithelien in die Ussing-Kammer mit größtmöglicher Sorgfalt erfolgte, war eine geringfügige Schädigung des Epithels in Ausnahmefällen mit möglichen Auswirkungen auf die Transport- oder Barriereeigenschaften durch die Manipulationen nicht unbedingt auszuschließen. Anhand der Ausschlusskriterien, denen institutsinterne Erfahrungswerte zugrunde lagen (siehe Kapitel 3.9), wurden geschädigte Epithelien jedoch nicht in die Versuchsauswertung einbezogen und die Versuche auf diese Weise standardisiert. Die in Kapitel 3.5 und 4.7 vorgestellten mikroskopischen Bilder repräsentieren den Zustand der Epithelien vor und nach solchen, in die Versuchsauswertung einbezogenen, Versuchen.

Die Präparationsart hat entscheidenden Einfluss auf die elektrophysiologischen Parameter (STEVENS, 1964), vor allem durch die unten beschriebenen 'Unstirred layer'. Sie wurde in Anlehnung an in der Literatur übliche Verfahren durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen (UNMACK, 2000). Bei dieser in 3.5 beschriebenen Präparationsart bleibt der submuköse Plexus zum Teil erhalten, der myenterische Plexus wird mit den Ringmuskelschichten entfernt (FIELD, 2003).

### 5.1.3 Probentransport und die Bedeutung einer Zugabe von Indomethacin in die Badelösungen

Nach Entnahme des Darmteilstückes zur Untersuchung in der Ussing-Kammer wurde dieses sofort in frisch mit Indomethacin versetzten Transportpuffer verbracht. In diesem Puffer wurde es präpariert, gespült und transportiert. Allen Puffern/Badelösungen in der Ussing-Kammer wurde ebenfalls Indomethacin frisch vor dem Versuch zugesetzt.

*In vivo* findet im Dünndarm des Schweines eine Nettoabsorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  statt. *In vitro* kehrt sich das durch die artifiziell hohe Prostanoidfreisetzung bei der Präparation und damit verbundenen erhöhten Fluxen von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  von mukosal nach serosal in eine Netto-Sekretion von  $\text{Cl}^-$  und eine gegen 0 tendierende Nettoabsorption von  $\text{Na}^+$  um (ARGENZIO und LIACOS, 1990). Endogene Prostanoiden haben dabei einen wichtigen Einfluss auf den Ionen-transport im Schweinedünndarm (BLIKSLAGER et al., 2002). Bei Zugabe von

Indomethacin, einem potenten nichtselektiven Cyclooxygenasehemmer (z.B. 1-5  $\mu\text{M}$ ) wird die Produktion der endogenen Prostaglandine unterbunden und die physiologisch vorhandene NaCl-Netto-Absorption wird wieder hergestellt (BLIKSLAGER et al., 1999b; UNMACK et al., 2001a). Gewebe ohne Indomethacin im Puffer zeigten anfangs einen sehr hohen  $I_{sc}$ , der über 150 min stetig abfiel, mit Indomethacin war der  $I_{sc}$  dagegen auf einem niedrigen Niveau relativ stabil. Daneben bewirkte Indomethacin auch eine  $R_t$ -Reduktion auf eine stabile Höhe. Auf exogene Prostaglandine reagierte das Gewebe unter Indomethacineinfluss ebenso mit einer Sekretion von  $\text{Cl}^-$  und Absorption von  $\text{Na}^+$  wie ohne diesen - bis zur gleichen absoluten Höhe, doch beginnt die Messung mit Indomethacin an der wahren Basislinie und nicht an der durch endogene Prostanoiden artifiziell erhöhten (ARGENZIO und LIACOS, 1990). Für diese Wirkung muss Indomethacin jedoch schon vor der Präparation, d.h. sobald wie möglich an den Darm gebracht werden, da die Ausschüttung der endogenen Prostanoiden vor allem während der Präparation erfolgt (BUKHAVE und RASK-MADSEN, 1980).

#### 5.1.4 Kritik zur Apparatur

Die Ussing-Kammer ist eine elektrophysiologische Apparatur, in der Epithelien über einige Stunden kultiviert werden, um Barriere- und Transportfunktionen des lebenden Gewebes studieren zu können. Sie geht auf die Arbeiten von Ussing und Zehran zurück, die 1951 die Erstbeschreibung von  $\text{Na}^+$ -Fluxmessungen parallel zu  $\text{Na}^+$ -basierten Strommessungen veröffentlichten. Später folgte in anderen Arbeiten das Konzept des Short Circuit sowie Fehlerabschätzungen zu den Versuchsergebnissen (CIVAN, 1983; SCHEFFLER, 1984).

Einen Einfluss auf die Messungen und die Messgenauigkeit haben die elektrischen Eigenschaften der Kammern, die elektrophysiologischen Parameter und die Kennlinieneigenschaften der Gewebe und der Potenzialverlauf entlang der Messstrecke. Bei jeder Messung werden neben dem durch das Präparat verursachten Spannungsabfall auch der längs der verbleibenden Flüssigkeit, sowie das Eigenpotenzial der Elektroden mit erfasst (SCHEFFLER, 1984). Daraus folgt die Notwendigkeit von Leermessungen vor dem Einbau des Epithels, deren Werte bei den späteren Messungen durch die Messanlage automatisch abgezogen werden.

Des Weiteren wird der wahre Klemmstrom um den Faktor  $1 + R_{\text{Flüssigkeit}}/R_{\text{Gewebe}}$  unterschätzt - der tatsächliche Fehler hängt also vom Verhältnis  $R_{\text{Flüssigkeit}}/R_{\text{Gewebe}}$  ab und kann um so mehr vernachlässigt werden je dichter das Epithel ist (SCHEFFLER, 1984). Da  $R_{\text{Flüssigkeit}}$  jedoch gemessen und von den Messwerten abgezogen wird, tritt ein Fehler hier nur noch durch die Verdrängung von Flüssigkeit durch das Gewebe auf. Weiterhin verursacht die dem Epithel anhaftende Bindegewebsschicht, ein 'Unstirred layer' (siehe unten), als zusätzlicher serieller Widerstand einen Fehler.

Bei der Messung des Gewebewiderstandes durch Erzeugung stromimpulsinduzierter Potenzialdifferenzänderungen müssen neben Dauer, Amplitude und Orientierung der verwendeten Pulse auch die Basisstromdichte, der die Pulse überlagert werden (z.B. 'Open Circuit' oder 'Short Circuit') bei der Interpretation der Resultate Berücksichtigung finden. Des Weiteren haben die Wirkungsweisen von zugegebenen Substanzen, die ionale Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, die Durchmischungsverhältnisse der Kammer und die Morphologie des untersuchten Gewebes Einflüsse auf die physiologischen Inhalte der

Messergebnisse (SCHEFFLER, 1984). In den vorliegenden Versuchen wurde bipolar gemessen und damit das Gewebe nicht polarisiert. Die Wirkung der zugegebenen Substanzen war klar definiert und die ionale Zusammensetzung der Lösungen durch Leermessungen berücksichtigt. Die Durchmischungsverhältnisse sowie die Morphologie des Gewebes werden unter dem später erklärten 'Unstirred layer' behandelt.

Mechanische Manipulationen durch Auf- und Abbau bewirken  $R_t$ -Differenzen von  $< 0,5 \Omega$ , die Eigenpotenzialdifferenzshift beträgt weniger als  $0,1 \text{ mV}\cdot\text{h}^{-1}$  - bei einem Variationskoeffizienten der Anlage  $< 0,5 \%$  und Rechengenauigkeiten mit einem Fehler von  $< 5 \%$ . Großen Einfluss auf Messwerte hat das Verstellen der Begasung (SCHEFFLER, 1984). Die Elektroden sowie der Aufbau zur Messung der elektrischen Parameter sind zusätzlich relativ empfindlich gegenüber mechanischen Störungen während des Messvorganges. Die Begasung wurde deshalb vor den Leermessungen eingestellt und danach nicht mehr verändert, sowie während der Messungen jede mechanische Manipulation an der Anlage vermieden.

Nach SCHEFFLER (1984) beträgt der relative Messfehler für die Gewebepotenzialdifferenz unter 'Short Circuit' etwa  $10 \%$ . Die gemessenen elektrischen Werte unterscheiden sich zwischen 'Short Circuit' und 'Open Circuit' nur quantitativ. Deshalb sind Rückschlüsse von den Messungen im 'Short Circuit' auf die zugrunde liegenden Mechanismen und eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Mechanismen zulässig (SCHEFFLER, 1984).

Nach den technisch bedingten Fehlern sollen nun die Fehlermöglichkeiten durch das Gewebe selbst in der Apparatur behandelt werden.

An allen Grenzflächen, an denen sich der Anteil einer Ionenspezies an der Stromleitung ändert, kommt es zu einer Konzentrationsänderung dieses Ions. Das führt zu Widerstandsänderungen, da der Widerstand bei einem hier vorliegenden elektrischen Leiter 2. Klasse unmittelbar mit dessen ionaler Zusammensetzung korreliert (detailliert beschrieben in SCHEFFLER, 1984). Die entstehenden Konzentrationsgradienten wirken mit ihren Diffusionspotenzialen ihrer Ursache entgegen. Daneben verändern sich auch die Membranpotenziale entlang der Messstrecke. Potenzialdifferenz- und polaritätsabhängige Strukturveränderungen der Membranproteine (unter anderem von Ionenkanälen), sind weiterhin vorstellbar. Es können sich durch Konzentrationsverschiebungen osmotische Gradienten aufbauen, die durch sekundäre Wasserströme das Verhältnis von Zell- und Shuntvolumina und damit die transepitheliale Leitfähigkeit verändern (SCHEFFLER, 1984). Diese Effekte werden durch die, in der vorliegenden Versuchsanordnung verwandten, bipolaren Strompulse weitgehend vermieden und damit in der Berechnung vernachlässigt. Zusätzlich werden durch Kurzschluss des gesamten Gewebes, also nicht nur des Epithels selbst, mögliche auftretende elektrochemische Gradienten zwischen den Reservoiren vermieden bzw. ausgeglichen.

In den Versuchen wurde keine unbehandelte Kontrolle parallel mitlaufen gelassen. Als Kontrolle der Stabilität und Vitalität des Gewebes, sowie der Stabilität der Messeinrichtung dienen die in 3.9 genannten Kriterien. Während des Versuches wurden die elektrophysiologischen Werte nach dem Pufferwechsel zwischen  $\text{PGE}_2$ -Wirkungs- und Glukosewirkungsmessung in den Kammern als Kontrolle verwendet. Sie sollten den vor der  $\text{PGE}_2$ -Zugabe gemessenen Grundwerten auf etwa  $10 \%$  genau entsprechen.

Durch die Art der Messung von  $R_t$  ist dieser eigentlich als transmuraler Widerstand (durch alle vorhandenen Gewebeschichten) anzusprechen. Außer dem Epithel ist jedoch nur eine geringe Schicht subepitheliales Gewebe - bestehend aus Lamina propria, Lamina muscularis mucosae, und der teilweise entfernten Tela submucosa - nach dem 'Strippen' vorhanden (siehe Mikroskopschnitte im Kapitel 3.5 und 4.7). Damit ist der Fehler zum transepithelialen Widerstand durch diese relativ dünne zusätzliche Gewebeschicht systematisch mit geringen Schwankungen (GROOT und BAKKER, 1988) und der  $R_t$  wird hier der vorhandenen Literatur folgend als transepithelialer Widerstand angesprochen (BLIKSLAGER et al., 2001b; STEWART und TURNBERG, 1987).

Um Messfehler durch Nebenströme auf ein Minimum zu reduzieren wurde die Differenz  $\Delta I_{sc}$  zwischen  $I_{scB}$  vor Versuchsbeginn und dem  $I_{scV}$  im Versuch gebildet. Diese Nebenströme spielen damit praktisch keine Rolle mehr.

Alle erwähnten Messungenauigkeiten zusammengenommen sind im Gegensatz zu den Streuungen zwischen den Messwerten unerheblich und können somit als vernachlässigbar angesehen werden.

#### 5.1.4.1 'Unstirred layer'

Es existieren mukosal und aus morphologischen Gründen v.a. serosal zwischen den Zellen und Flüssigkeitsreservoirschichten, die von der begasungsangetriebenen Strömung nicht erfasst werden = 'Unstirred layers'. Die darin enthaltenen Ionenkonzentrationen können sich mit der Badelösung nur über einfache Diffusion ausgleichen. Dies kann unter 'Short Circuit'-Bedingungen zu lokalen Konzentrationsverschiebungen und damit zu einer Beeinträchtigung der  $Cl^-$ -Sekretion bzw. Na-gekoppelter Absorptionsprozesse führen (SCHEFFLER, 1984). Der Effekt durch diese mit Diffusion zu überbrückende Barriere ist um so höher, je höher die Konzentration der zugegebenen Substanz ist (HOLTUG und SKADHAUGE, 1991; THOMSON und DIETSCHY, 1980).

Die Präparation, das 'Strippen', breitet die große Darmoberfläche, die durch die Plicae circulares und die Villi dreidimensional verteilt ist, durch Glätten der Plicae circulares auf eine Ebene aus und reduziert damit den luminalen 'Unstirred layer', übrig bleiben als dreidimensionale Strukturen die Villi und die zelleigenen Mikrovilli. Des Weiteren werden serosal die nichtepithelialen Diffusionsbarrieren durch Entfernung der Tunica muscularis und der Tunica serosa minimiert. Der serosale 'Unstirred layer' besteht, wie oben genannt, somit nur noch aus Lamina propria, Lamina muscularis mucosae, und der teilweise entfernten Tela submucosa.

Die Fehler durch 'Unstirred layer' und die anderen oben beschriebenen Phänomene bewegen sich im Rahmen der ohnehin vorhandenen Mess- und Rechenungenauigkeit, so dass man die Modellvorstellung des Epithels als vernünftige Grundlage für die Interpretation der Daten des *In-vitro*-Versuches ansehen kann (KELLETT, 2001).

#### 5.1.4.2 'Solvent Drag'

'Solvent Drag' ist die Bezeichnung für eine Absorption von Stoffen parazellulär durch forcierte Diffusion dieser Stoffe über lokal im und am parazellulären Raum durch andere Transportmechanismen aufgebaute Konzentrationsgradienten. 'Solvent Drag' ist unter anderem für den Na<sup>+</sup>-gekoppelten Glukosetransport - hier SGLT-1-abhängig - bei hohen luminalen Glukosekonzentrationen (300-425 mM) (KELLETT, 2001; PAPPENHEIMER und REISS, 1987) aber auch für Ionen beschrieben (FAVUS, 1985). Die Theorie des 'Solvent Drag' ist nicht ganz unstrittig, jedoch allgemein anerkannt (KELLETT und HELLIWELL, 2000).

Es ist anzunehmen, dass dieser Transport auch in der hier vorliegenden Versuchsanordnung existierte. Da jedoch nur der direkt Na<sup>+</sup>-gekoppelte - elektrogene - Teil der transportierten Glukose bzw. des Glutamins durch die elektrophysiologischen Messungen erfasst wurde und die Konzentrationsänderungen der Pufferlösungen auf beiden Seiten des Epithels durch den zusätzlichen Transport im Gegensatz zu den Zugabekonzentrationen keine Rolle spielen, entsteht durch 'Solvent Drag' kein zusätzlicher Messfehler.

#### 5.1.4.3 Gewebestabilität

Die in den Abbildungen 3.5.1 und 4.7.1a-c gezeigten Gewebestücke unterschieden sich makroskopisch nicht von Geweben anderer Versuchstage. Daher wird davon ausgegangen, dass die histologischen Bilder für alle Versuche repräsentativ sind. In der Literatur ist die Annahme bestätigt, dass bei sorgfältiger Präparation keine wesentlichen Veränderungen des histologischen Bildes von Epithelien des oberen Magen-Darm-Traktes über die Dauer der Ussing-Kammer-Versuche von etwa 2-3 Stunden auftreten (MÖLLER, 1997; WINCKLER, 1997). Am Epithel gesetzte Schäden werden während der Inkubation in der Ussing-Kammer sogar repariert (BLIKSLAGER et al., 1999b).

#### 5.1.4.4 Kritik zu den Messungen

Es wurden 3 elektrogene Transportprozesse mit Hilfe von  $\Delta I_{sc}$  gemessen. Damit konnten spezielle Transportsysteme im Gegensatz zu Fluxmessungen dieser Substanzen gezielt angesprochen und damit genauer als mit Fluxmessungen gemessen werden (ARGENZIO und LIACOS, 1990).

Der parazelluläre Transport eines ungeladenen Zuckermoleküls wurde mit <sup>3</sup>H-Mannit per Fluxmessung bestimmt, da Mannit parazellulär und nicht elektrogen (z.B. durch Kopplung an einen Ionentransport) transportiert wird. Somit ist die Fluxmessung hier die Methode der Wahl.

## 5.2 Berechnungskritik

Im Gegensatz zu anderen Arbeiten, die Änderungen des basalen  $I_{sc}$  (MILLER und SKADHAUGE, 1997) bzw. prozentuale Änderungen des  $I_{sc}$  (BUKHAVE und RASK-MADSEN, 1980) in geringer zeitlicher Auflösung von einigen Minuten untersuchten, wurde in dieser Arbeit der  $I_{sc}$  in der höheren zeitlichen Auflösung von 6 s gemessen. Diese hohe zeitliche Auflösung ergibt eine genauere Abbildung des eigentlichen  $I_{sc}$ -Peaks. Die Verwendung von  $\Delta I_{sc}$  ergibt eine vom basalen  $I_{sc}$  unabhängige Nivellierung zwischen den einzelnen Tieren, die

sehr unterschiedliche basale  $I_{sc}$  aufwiesen. Dadurch reduzieren sich die individuellen Streuungen.

### 5.2.1 Kritik zur Berechnung von $K_m$ und $V_{max}$

Bei den zur Berechnung herangezogenen Transportvorgängen handelt es sich um carriervermittelte Transporte. Sie können der Reaktionsgleichung  $E + S \rightleftharpoons ES$  zugeordnet werden. Damit ist diese Bedingung zur Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung erfüllt (LINEWEAVER und BURK, 1934). Des Weiteren ist die Substratkonzentration um ein Vielfaches höher gegenüber der Enzymkonzentration. Das heißt, selbst wenn alles Enzym im Enzym-Substrat-Komplex gebunden ist, hat sich die Substratkonzentration noch nicht wesentlich verringert. In diesem Fall weist die Michaelis-Menten-Gleichung die größte Genauigkeit zur Berechnung der Enzymkinetik gegenüber anderen Berechnungsmöglichkeiten auf (CHA, 1970).

Die Berechnung von  $K_m$  und  $V_{max}$  aus Werten, die nur einen Teil der Sättigungsfunktion beschreiben ist ebenso zulässig wie die Berechnung aus der ganzen Kurve, wenn nachgewiesen wurde, dass es sich bei der zur Berechnung herangezogenen Reaktion auch tatsächlich um eine sättigbare Reaktion handelt (MICHAELIS und MENTEN, 1913). Dies ist sowohl für die  $PGE_2$ -stimulierte Ionensekretion als auch für den  $Na^+$ -gekoppelten Glukosetransport in der Literatur umfassend belegt und wurde in eigenen Untersuchungen bestätigt (BUKHAVE und RASK-MADSEN, 1980; HOLTUG und SKADHAUGE, 1991; KELLETT, 2001; LODEMANN et al., 2003a; UNMACK et al., 2001b; WRIGHT et al., 1997).

Bei den Berechnungen mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung erweist sich die nichtlineare Regression, die auf einer Iteration über die kleinsten Quadrate beruht, eine sehr hohe Stabilität gegenüber Extremwerten auf. Die lineare Regression zeigt eine wesentlich höhere Instabilität bei Auftreten von weit ausschlagenden Werten (MOTULSKY und CHRISTOPOULUS, 2003). Die Werte der linearen Regression bilden jedoch eine Orientierung und werden als Startwerte für die nichtlineare Regression benötigt. Durch Ausprobieren verschiedener extremer Startwerte wurde festgestellt, dass unabhängig von diesen extremen Startwerten die Ergebnisse der nichtlinearen Regression bis zur 2. Dezimalstelle übereinstimmen.

Der Vorteil der Gesamtregression aller Werte einer Gruppe im Gegensatz zur Mittelwertbildung aus den Einzeltierregressionen liegt in der höheren Genauigkeit der direkten Berechnung des Gruppenergebnisses. Hierbei rückt das jeweilige Einzeltier in den Hintergrund der Betrachtung. Dies ist in der vorliegenden Arbeit die angestrebte Betrachtungsweise. Die Problematik liegt einzig darin, dass die Gruppengrößen zum Teil unterschiedlich sind, was den direkten Vergleich der 95%-Konfidenzintervalle behindert. Deshalb wurden zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen mit den Regressionsergebnissen der Einzeltiere Varianzanalysen, wie in Kapitel 3.9 beschrieben, durchgeführt.

Für die Interpretation von  $K_m$  und  $V_{max}$  ist es wichtig zu wissen, dass diese Größen immer nur für den Transporter bestimmt werden, der den elektrogenen Transportprozess limitiert.  $V_{max}$  ist hierbei die maximale Transportgeschwindigkeit des gemessenen Ions bzw. des an dieses gekoppelten Substrates, gemessen über den  $I_{sc\ max}$  (WRIGHT et al., 1997).  $V_{max}$  wird

hierbei nicht direkt durch die Transportgeschwindigkeit des einzelnen Transporters determiniert, sondern durch die Anzahl der Transporter auf der zur Messung herangezogenen Epithelfläche (WRIGHT et al., 1997).  $K_m$  beschreibt das Verhalten des Transportes in direkter oder indirekter Reaktion auf die den Transport stimulierende Substanz (VEYHL et al., 2003).

Im Falle offener  $\text{Cl}^-$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle stellt der  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Kotransporter den limitierenden Faktor für die  $\text{Cl}^-$ -Sekretion dar. Dies ist bei maximalen  $\text{PGE}_2$ -Konzentrationen der Fall und die Berechnungen beschreiben die  $V_{\max}$  des  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Kotransporters (FIELD, 2003). Da jedoch die  $\text{PGE}_2$ -stimulierte Ionensekretion bei submaximalen Transportgeschwindigkeiten über die Öffnung der  $\text{Cl}^-$ -Kanäle und nicht über die Transportgeschwindigkeit des  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$ -Kotransporters gesteuert wird (FIELD, 2003), beschreibt  $K_m$  die Konzentration von  $\text{PGE}_2$  bei der die Hälfte der für  $V_{\max}$  nötigen Menge an Kanälen für den Ionen transport zur Verfügung steht. In diese  $K_m$  des Botenstoffes  $\text{PGE}_2$  fließt die Signaltransduktion innerhalb der Zelle ein. Eine Veränderung dieser Signalvermittlungsprozesse unter dem Einfluss von Fütterung oder Alter ist vorstellbar.

Der limitierende Schritt im Falle des  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Glukosetransportes ist die Translokation von Glukose über die apikale Membran, was durch den SGLT-1 erfolgt (HOLTUG und SKADHAUGE, 1991; WRIGHT, 1993; WRIGHT et al., 1991).  $V_{\max}$  ist damit bei einer  $\text{Na}^+$ -Konzentration von über 142 mM die maximale Transportgeschwindigkeit des SGLT-1 von Glukose (SCHULTZ und CURRAN, 1970),  $K_m$  bezeichnet die Konzentration von Glukose, bei der die halbmaximale Glukose-Transportgeschwindigkeit des SGLT-1 erreicht ist. Da Glukose hier selbst der Botenstoff ist, über den die Glukoseaufnahme in die Zelle reguliert wird (DIEZ-SAMPEDRO et al., 2003), beschreibt  $K_m$  auch bei diesem Transport eine indirekte, über Signaltransduktionsprozesse geleitete Reaktion auf die den Transport stimulierende Substanz Glukose.

### 5.2.2 Kritik zur Statistik

Da die Stichprobenumfänge relativ klein und z.T. in den einzelnen Gruppen von unterschiedlicher Größe sind, sollte das bei der Bewertung der Ergebnisse der Varianzanalyse berücksichtigt werden. Unter diesen Bedingungen können heterogene Populationsvarianzen nicht völlig ausgeschlossen werden und die Varianzanalysen deutlich auf eine Verletzung der Anwendungsvoraussetzungen reagieren. Im Gegensatz zu höheren Fallzahlen kann sich dies mit einer unkalkulierbaren Erhöhung des tatsächlichen Fehler-1-Risikos über dem nominellen  $\alpha$  äußern (DIEHL und ARBINGER, 1990).

Die z.T. in den Graphen sichtbaren Unterschiede zwischen einzelnen Untersuchungsgruppen sind in vielen Fällen statistisch nicht als signifikant zu bezeichnen da die untersuchte Tierzahl im Hinblick auf die möglichen Störfaktoren zu gering war.

War kein Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen nachweisbar, war eine gemeinsame fütterungsunabhängige Betrachtung, wie in Kapitel 3.9 beschrieben, zulässig (BOUDRY et al., 2003). Im Ausnahmefall eines signifikanten Unterschiedes, z.B. bei  $V_{\max}$  der 28 Tage alten Ferkel, wird der Einfluss der Fütterung durch Zusammenfassen beider Fütterungsgruppen ausnahmsweise vernachlässigt, um mit dieser Näherung die nachfolgenden Berechnungen durchführen zu können.

Die Darstellung der Standardabweichung ist, wie auch das 95%-Konfidenzintervall nur eine näherungsweise Möglichkeit der Verbildlichung von Ergebnissen der Varianzanalysen. Es wurde in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich auf die Standardabweichung und allein für die numerische Darstellung von  $K_m$  und  $V_{max}$  auf das 95%-Konfidenzintervall zurückgegriffen.

### **5.3 Diskussion der Einflüsse von *Bacillus cereus var. toyoi* bzw. des Alters auf die sekretorischen Epithelfunktionen**

Jeder der drei folgenden Diskussionsteile soll dem gleichen Schema folgen. Nach Validierung der gewonnenen Ergebnisse anhand der Literatur kann eine Diskussion und eine Entwicklung von Theorien über die Ursache verschiedener Beobachtungen mit Hilfe der Literatur (siehe auch Kapitel 2) erfolgen.

#### **5.3.1 PGE<sub>2</sub>-stimulierte Sekretion**

Die basalen Parameter  $I_{sc}$  und  $R_t$ , sowie  $\Delta I_{sc}$  und  $\Delta R_t$  nach PGE<sub>2</sub>-Zugabe liegen im in der Literatur für den Dünndarm des Schweines beschriebenen Bereich (ARGENZIO und LIACOS, 1990).(BLIKSLAGER et al., 1999b; BLIKSLAGER et al., 1997; CAREY et al., 1994; JANSEN, 2004; SANGILD et al., 1993) Ebenso ist der Verlauf des  $I_{sc}$  nach Zugabe von PGE<sub>2</sub> vergleichbar (UNMACK et al., 2001b).

Die zu PGE<sub>2</sub> aufgestellten Arbeitshypothesen (siehe Kapitel 2.5) können nur teilweise bestätigt werden, was jedoch den innerhalb der Literatur ebenfalls zum Teil gegensätzlich beschriebenen Ergebnissen entspricht.

Im Alter von 28 und 35 Tagen ist  $\Delta I_{sc}$  in der Gruppe der *Bacillus cereus var. toyoi*-gefütterten Tiere höher als in der Kontrollgruppe und im Alter von 14 und 56 Tagen in 75 % der Fälle in der Probiotikagruppe geringer als in der Kontrollgruppe. Dies deckt sich in der Konzentration von 1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> in den Altersgruppen 14, 28, 35 und 56 Tage mit der Arbeit von JANSEN (2004), in der *Enterococcus faecium* als Probiotikum Verwendung fand. Zusätzlich deckt sich generell über alle Konzentrationen gesehen der Effekt von *Bacillus cereus var. toyoi* in den Altersgruppen 14, 28 und 35 Tage zum überwiegenden Teil mit dem von *Enterococcus faecium* (JANSEN, 2004), wobei die Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen in der eigenen Untersuchung größer sind.

Eine mögliche Schlussfolgerung daraus könnte sein, dass der probiotische Effekt auf die PGE<sub>2</sub>-stimulierte Ionensekretion in den kritischen Phasen Saugferkel (14 und 28 Tage alt) und nach dem Absetzen (35 Tage), sowie bei hohen PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen bei beiden Probiotika ähnlich, aber bei *Bacillus cereus var. toyoi* stärker ausgeprägt ist als bei *Enterococcus faecium*. Im Alter von 56 Tagen, wo sich die Darmflora mit der Aufnahme von festem Futter stabilisiert hat, ist die Wirkung des Probiotikums nicht mehr erkennbar.

Auffällig ist weiterhin, dass die Standardabweichungen in rund 88 % aller Fälle in der Gruppe der mit *Bacillus cereus var. toyoi* gefütterten Tiere niedriger als in der Kontrollgruppe sind. Dies kann auf einen die Mikroökologie des Darmes stabilisierenden Effekt des Probiotikums hindeuten, was auch bei mikrobiologischen Untersuchungen beobachtet wurde (THELEN et al., 2004).

Der Faktor Alter zeigte einen signifikanten Effekt, wobei die 14 und 35 Tage alten Schweine mit einem höheren  $\Delta I_{sc}$  auf PGE<sub>2</sub> reagieren als die 28 und 56 Tage alten Tiere. Auch dieser charakteristische Verlauf der Kurven über die verschiedenen Altersgruppen lässt Ähnlichkeiten zur Untersuchung von JANSEN (2004) erkennen.

Der zickzackförmige Verlauf der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Ionensekretion mit steigendem Alter spiegelt die kritischen Phasen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit einer Durchfallerkrankung im Leben des Ferkels wider. Diese sind die ersten 2-3 Lebenswochen und ein bis zu zwei Wochen nach dem Absetzen, unabhängig vom Absetzalter (BOUDRY et al., 2003; BOUDRY et al., 2004; MILLER und SKADHAUGE, 1997).

Die Streuung der  $\Delta I_{sc}$ -Werte nimmt sowohl vom 14. zum 28., als auch vom 35. zum 56. Tag ab. Zwischen dem 28. und 35. Tag, im Zeitraum nach dem Absetzen, steigt diese Streuung an. Dies weist auf eine Stabilisierung des mikroökologischen Darmsystems mit zunehmendem Alter, mit einer durch das Absetzen verursachten Störung, hin, wobei die Mikroökologie hier sowohl die Darmwand und ihre Transportprozesse sowie die Ingesta und ihre Mikroflora in die Definition einschließt. Den Effekt einer durch das Absetzen unterbrochenen Stabilisierung der Mikroflora beschrieben unter anderem AWATI (2005) sowie SCHAREK et al. (2005).

Die in der Literatur für den  $\Delta I_{sc}$  nach PGE<sub>2</sub>-Zugabe einheitlich beschriebene Konzentrationsabhängigkeit mit Michaelis-Menten-Kinetik wurde in dieser Untersuchung bestätigt, wobei sich  $\Delta I_{sc}$  in den einzelnen Konzentrationsstufen signifikant voneinander unterschied.

Die ermittelten Werte für  $K_m$  und  $V_{max}$  liegen unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Messmethoden und untersuchten Spezies im in der Literatur beschriebenen Bereich (BUKHAVE und RASK-MADSEN, 1980; UNMACK et al., 2001b). Es kann damit eine differenzierte Auswertung möglicher Einflüsse von Fütterung und Alter auf die den Transport beschreibenden Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  stattfinden.

Da die PGE<sub>2</sub>-Ausschüttung bei Infektionen einen Teil der unspezifischen Abwehr darstellt (siehe Kapitel 2.4.1.5), besteht die Möglichkeit, dass Probiotika als einer ihrer Wirkmechanismen diese unspezifische Abwehr der Clearance und der Verstärkung der Barriere des Darmes 'präventiv' in Gang setzen, ohne dabei auf den Gesamtorganismus pathogen zu wirken. Eine andere Variante der Wirkung wäre, durch Anheben der Empfindlichkeit gegenüber PGE<sub>2</sub> dessen Wirkungen bei beginnender Infektion zu verstärken.

Dazu gibt es bisher nur wenige Veröffentlichungen, wobei in diesen kinetische Parameter der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Ionensekretion nicht in die Untersuchungen einbezogen wurden. Im Vergleich mit *Enterococcus faecium* (JANSEN, 2004) ist die Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* auf die per  $\Delta I_{sc}$  gemessene PGE<sub>2</sub>-stimulierte Ionensekretion sehr ähnlich. Das gibt Anlass, die umfangreicheren Untersuchungen für *Bacillus cereus var. toyoi* dem Versuch einer Interpretation zu unterziehen, von dem eventuell Rückschlüsse auf andere Probiotika gemacht werden können.

$K_m$  wird durch die Fütterung nicht signifikant beeinflusst, ist jedoch am 28. Tag in der Probiotikagruppe höher als in der Kontrollgruppe und verhält sich in allen anderen Altersgruppen umgekehrt.

Am 28. Tag besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der höheren  $V_{max}$  der Probiotikagruppe und der niedrigeren maximalen Transportgeschwindigkeit der Kontrollgruppe. Am 35. Tag ist die Anordnung von  $V_{max}$  der Fütterungsgruppen zueinander gleich, am 14. und 56. Tag umgekehrt, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Dies spiegelt exakt das Verhalten des  $\Delta I_{sc}$  wider.

Die Empfindlichkeit der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Ionensekretion, das heißt die Stärke der sekretorischen Antwort auf geringe PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen, kann nur aus dem Zusammenhang von  $K_m$  und  $V_{max}$ , genauer aus dem Anfangsteil der errechneten Sättigungsfunktion abgeleitet werden (siehe Abbildungen 4.6.1, 4.6.4). Eine Interpretation des Einflusses von *Bacillus cereus var. toyoi* auf diese Empfindlichkeit kann wiederum nur unter Berücksichtigung der Veränderungen der Sättigungskurven mit zunehmendem Alter erfolgen (siehe unten).

Sowohl bei  $K_m$  als auch bei  $V_{max}$  nach PGE<sub>2</sub>-Zugabe ist das 95%-Konfidenzintervall in der Probiotikagruppe durchgängig kleiner als in der Kontrollgruppe. Dies kann als weiteres Indiz für eine das Darmökosystem harmonisierende Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* gewertet werden.

Bei fütterungsunabhängiger Betrachtung zeigt sich ein Alterseffekt auf  $K_m$ : Bei den 14 Tage alten Ferkeln tritt die niedrigste und bei den 28 Tage alten Ferkeln die höchste  $K_m$  für PGE<sub>2</sub> auf. Da sich hierbei das 95%-Konfidenzintervall lediglich proportional zur Höhe der  $K_m$ -Werte verhält, scheint es keinen Einfluss des Alters auf die interindividuellen Schwankungen von  $K_m$  zu geben.

Es ist, basierend auf unseren Altersgruppen, ein zickzackartiger Verlauf von  $V_{max}$  mit steigendem Alter zu erkennen, wobei  $V_{max}$  bei 14 und 35 Tage alten Tieren höher als  $V_{max}$  bei 28 und mit Abstand am niedrigsten bei 56 Tage alten Tieren ist. Dies weist Ähnlichkeiten zum Verhalten des  $\Delta I_{sc}$  auf. Dabei nehmen, unabhängig zu den Schwankungen von  $V_{max}$  die 95%-Konfidenzintervalle mit steigendem Alter kontinuierlich ab, was auf ein sich mit zunehmendem Alter stabilisierendes intra- (eigentlich besser holo-) intestinales System hindeutet.

Die aus  $V_{max}$  im Zusammenhang mit  $K_m$  ableitbare Empfindlichkeit der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Ionensekretion ist ein Maß für die Stärke der Sekretion in Reaktion auf niedrige PGE<sub>2</sub>-Konzentrationen (im vorliegenden Fall bei etwa 0,1  $\mu$ M PGE<sub>2</sub> betrachtet). Damit kann eine Abschätzung der Konsistenz des Darminhaltes im mittleren Jejunum unter physiologischen Bedingungen erfolgen, wobei viele andere Transportprozesse maßgeblich mitwirken.

Werden die 14 Tage alten Schweine isoliert betrachtet, reagiert die Probiotikagruppe auf PGE<sub>2</sub> zwar etwa gleich sensitiv wie die Kontrolle, aber weniger heftig bei höheren Stimuli. Durchfälle fallen so wahrscheinlich mit geringerer Intensität aus. Die Clearance des Darmes ist bei geringen PGE<sub>2</sub>-Ausschüttungen eines ungereizten Darmes dabei in der Probiotikagruppe sogar etwas besser als in der Kontrollgruppe.

Weiterhin ist am 28., 35. und 56. Tag die Empfindlichkeit auf sekretorische Reize im Bereich bis mindestens 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{PGE}_2$  durch *Bacillus cereus var. toyoi* angehoben. Am deutlichsten zeigt sich dies am 28. Tag, dicht gefolgt vom 35. Tag. Dieses Probiotikum sorgt anscheinend in diesen Altersgruppen für einen flüssigeren Darminhalt unter physiologischen, das heißt nichtinflammatorischen, Bedingungen.

Bei gemeinsamer Betrachtung beider Fütterungsgruppen reagieren die 28 Tage alten Schweine wie die Tiere am 56. Tag weniger empfindlich auf eine  $\text{PGE}_2$ -Ausschüttung, sowie weniger heftig auf einen maximalen Stimulus. Die Clearance des Darmes ist hier anscheinend geringer, folglich der Darminhalt fester als bei 35 Tage alten Ferkeln (TARAS et al., 2005).

Dabei ist insgesamt ein Abfall der Empfindlichkeit auf eine Stimulation der Sekretion von 14 zu 56 Tage alten Ferkeln zu verzeichnen. Dies entspricht Ergebnissen aus der Literatur, wo die Wirkung eines antisekretorischen Faktors erst bei älteren Tieren beobachtet werden konnte (MCEWAN et al., 1991) und der Effekt einer verminderten Sekretionsbereitschaft auf eine veränderte Signaltransduktion zurückgeführt wird (GUARINO et al., 1987; JASO-FRIEDMANN et al., 1992).

Insgesamt betrachtet ist die Empfindlichkeit der Probiotikagruppe am 35. Tag nur geringgradig niedriger als die beider 14 Tage alten Fütterungsgruppen mit der höchsten  $\text{PGE}_2$ -Empfindlichkeit. Die Empfindlichkeit der  $\text{PGE}_2$ -stimulierten Ionensekretion der 35 Tage alten Kontrollferkel ist etwa genauso hoch wie die der 28 Tage alten Probiotikagruppe und liegt im mittleren Bereich. Die niedrige Empfindlichkeit der  $\text{PGE}_2$ -stimulierten Ionensekretion der 28 Tage alten Kontrollferkel liegt etwa im Bereich der 56 Tage alten Schweine beider Fütterungsgruppen.

Im Altersverlauf spiegeln sich damit deutlich instabile Phasen im mikroökologischen System des Darmes (14. und 35. Tag) in einer erhöhten Sekretionsbereitschaft des Epithels wider. *Bacillus cereus var. toyoi* vermindert diese Sekretionsbereitschaft bei den 14 Tage alten Ferkeln. Bei den 28 und 35 Tage alten Schweinen dagegen erhöht er sie. Die einzige über alle Altersgruppen durchgängige Wirkung des Probiotikums besteht hier in einer interindividuellen Harmonisierung der Sekretion.

In gewissen Grenzen ist die erhöhte Sekretionsbereitschaft durch die Anwesenheit von *Bacillus cereus var. toyoi* eine Verstärkung des unspezifischen Immunsystems, welche offenbar ebenfalls in Stresssituationen im Darm stattfindet. Diese Erhöhung der Empfindlichkeit auf  $\text{PGE}_2$  kann bedeuten, dass die Stimulierbarkeit bei einem Infekt erhöht ist und durch einen flüssigeren Darminhalt eine bessere Clearance des Darmes in dieser Situation stattfindet (EL ASMAR et al., 2002). Des Weiteren begünstigt ein etwas flüssigerer Darminhalt eine bessere Durchmischung, Aufspaltung und Absorption der Nahrung (BARRETT, 1997), sowie insgesamt eine höhere Zytoprotektivität (UNMACK et al., 2001b).

Gestützt wird die These des Nutzens erhöhter Sekretionsbereitschaft dadurch, dass die Sekretion bei IBD, ein Beispiel eines pathologischen Zustandes des Darmes, über die Hälfte vermindert ist. Dabei korreliert die bis zum 10. Tag nach Absetzen kontinuierlich ansteigende Kryptentiefe nicht mit der Stärke der sekretorischen Antwort (BARMAYER et al., 2004; HAMPSON, 1986).

Diesen Veränderungen der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Sekretion liegen Änderungen der Anzahl von Cl<sup>-</sup>-Kanälen und Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Kotransportern durch Endo- und Exozytose sowie Änderungen in der intrazellulären Signaltransduktion über cAMP und Ca<sup>++</sup> zugrunde (siehe Kapitel 2.4.1).

Vergleichbar zur anderen Arbeiten mit Probiotika ist eine durch *Bacillus cereus var. toyoi* bedingte erhöhte Empfindlichkeit der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Sekretion am deutlichsten bei den Ferkeln vor (28 Tage alt) und eine Woche nach dem Absetzen (35 Tage alt) zu beobachten (vergleiche JANSEN (2004) und LODEMANN (2006)). Die 14 Tage alten Ferkel zeigen insgesamt die höchste Reaktion auf PGE<sub>2</sub>, wobei *Bacillus cereus var. toyoi* hier eine die Sekretion abschwächende Wirkung aufweist. Dies ist, ebenso wie der zickzackförmige Verlauf der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Ionensekretion mit steigendem Alter, vergleichbar zu den Ergebnissen von JANSEN (2004) und LODEMANN (2006) mit dem Probiotikum *Enterococcus faecium*.

### 5.3.2 Theophyllin-induzierte Sekretion

Auch für diese Messung wurde, um transportbeeinflussende Gegenregulationsvorgänge auszuschließen, der I<sub>sc</sub>-Peak innerhalb der ersten 10 Minuten nach Theophyllinzugabe als Berechnungsgrundlage für ΔI<sub>sc</sub> herangezogen (siehe auch SCHEFFLER (1984)).

Es ist anerkannt, dass die Messung des ΔI<sub>sc</sub> nach Theophyllinzugabe als Vitalitätstest verwendbar ist (HOLTUG und SKADHAUGE, 1991).

Die beobachtete absolute Größe von ΔI<sub>sc</sub> nach Zugabe von Theophyllin bestätigt die Angaben in der Literatur (ARGENZIO et al., 1984; BOUDRY et al., 2003; HOLTUG und SKADHAUGE, 1991; MILLER und SKADHAUGE, 1997; SCHRODER et al., 1991; SCHROEDER et al., 2004; WINCKLER, 1997).

Die Wirkung von Theophyllin, einem Phosphodiesteraseinhibitor wirkt wie PGE<sub>2</sub>, indirekt auf den intrazellulären cAMP-Spiegel und auf die Cl<sup>-</sup>-Sekretion (BAKKER und GROOT, 1984).

Die Korrelation von ΔI<sub>sc</sub> nach Zugabe von PGE<sub>2</sub> bzw. Theophyllin in der eigenen Untersuchung validiert unter dem Gesichtspunkt der gleichartigen intrazellulären Signalübertragung die Messergebnisse für die PGE<sub>2</sub>-stimulierte Ionensekretion.

Die ΔI<sub>sc</sub>-Antwort auf Zugabe von Theophyllin ist bei älteren als den im eigenen Versuch verwendeten Tieren unter der Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* geringer als in der Kontrollgruppe (WINCKLER et al., 1998). Dies kann bei jüngerem Tiermaterial (35 Tage alte Ferkel) und anderer Applikationsdauer von *Bacillus cereus var. toyoi* durch die eigenen Ergebnisse bestätigt werden. Allerdings unter Vorbehalt, da die Unterschiede nicht signifikant und die Werte der verschiedenen Altersgruppen widersprüchlich sind.

## 5.4 Diskussion der Einflüsse von *Bacillus cereus var. toyoi* bzw. des Alters auf die absorptiven Epithelfunktionen

### 5.4.1 Glukoseabsorption

Im Vergleich der Versuchsergebnisse mit Daten aus der Literatur liegen diese sowohl für die basalen Parameter  $I_{sc}$  und  $R_t$  als auch für den durch  $Na^+$ -gekoppelte Glukoseabsorption stimulierten  $\Delta I_{sc}$  in ähnlichen Größenordnungen (ARGENZIO und LIACOS, 1990; ARGENZIO et al., 1994; BREVES et al., 2001; CAREY et al., 1994; GRONDAHL et al., 1997; KANDIL et al., 1994).

Die aus der Literatur abgeleiteten Arbeitshypothesen (siehe Kapitel 2.5) zum Glukosetransport unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* konnten nur in wenigen Altersgruppen bestätigt werden. Der Effekt des Alters auf den  $\Delta I_{sc}$  und  $V_{max}$  zeigte sich dagegen überwiegend der Literatur und den Arbeitshypothesen entsprechend.

Eine erhöhte  $Na^+$ -gekoppelte Glukoseabsorption in der Probiotikagruppe, im Mittel über alle zugegebenen Glukosekonzentrationen, war einzig am 35. Lebenstag vorhanden. In den Altersgruppen 14, 28 und 56 Tage beeinflusste die Fütterung den  $Na^+$ -gekoppelten Glukosetransport in die umgekehrte Richtung. Die Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen waren dabei nicht signifikant.

Abweichungen zu Ergebnissen in der Literatur (siehe Kapitel 2) könnten zum einen durch unterschiedliche Glukosekonzentrationen, Untersuchungsalter sowie Applikationsdauer von *Bacillus cereus var. toyoi* (BREVES et al., 1997a; BREVES et al., 2000) und zum anderen durch die Wahl eines anderen Probiotikums (JANSEN, 2004) erklärt werden.

Auffällig ist in der vorliegenden Untersuchung jedoch ein 'stabilisierender' Effekt von *Bacillus cereus var. toyoi*, der dazu führt, dass die Standardabweichungen in der Probiotikagruppe in 75 % der Fälle kleiner als in der Kontrollgruppe sind.

Einen abnehmenden  $Na^+$ -gekoppelten Glukosetransport bei Infektion mit Kryptosporidien beobachteten ARGENZIO et al. (1994) im Ileum des Schweines. Dies kann als eine Auswirkung der Entzündung interpretiert werden. Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen zeigen einen zu diesem 'Entzündungseffekt' gegenteiligen Einfluss von Probiotika auf den Glukosetransport (BREVES et al., 1997a). Mit den vorliegenden Daten lässt sich auch dies nur für den 35. Lebenstag, eine Woche nach dem Absetzen, bestätigen.

Der aus unterschiedlichen Veröffentlichungen (siehe Kapitel 2.4.2) zusammenfassbare charakteristische Altersverlauf des  $\Delta I_{sc}$  mit den höchsten Werten am 28. bzw. 35. Lebenstag wurde von anderen Autoren in sehr ähnlichen Versuchen beschrieben (JANSEN, 2004; LODEMANN et al., 2003a; LODEMANN et al., 2003b) und ebenfalls in der eigenen Untersuchung, zusätzlich mit signifikanten Unterschieden zwischen den Altersgruppen beobachtet.

Es sind im Glukosetransport große Streuungen der Werte vorhanden. Sie scheinen mit steigendem Alter und bei steigenden Glukosekonzentrationen zuzunehmen. Die Tiere

entwickeln sich demnach den Glukosetransport betreffend mit zunehmendem Alter auseinander.

Mit zunehmender Konzentration der Glukose im mukosalen Puffer ist ein Anstieg von  $\Delta I_{sc}$  gut zu erkennen. In den Graphen (siehe Kapitel 4.2) zeichnen sich verschiedene Abschnitte von Sättigungskurven ab, wobei der Faktor Konzentration einen signifikanten Effekt aufweist. Die Sättigung des Transportes zwischen 4 und 10 mM ist dabei etwas niedriger als entsprechende Angaben aus der Literatur (HOLTUG und SKADHAUGE, 1991; RHOADS et al., 1990).

Mit Berechnung von  $K_m$  und  $V_{max}$  kann nun ein umfangreicherer Abgleich mit Daten der Literatur und eine differenzierte Betrachtung möglicher Fütterungs- bzw. Alterseinflüsse erfolgen.

Es ist zu erkennen, dass sowohl  $K_m$  als auch  $V_{max}$  in der vorliegenden Untersuchung im Bereich der in der Literatur beschriebenen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Methode bestimmten Werte für den  $Na^+$ -gekoppelten Glukosetransport liegen (HOLTUG und SKADHAUGE, 1991; PUCHAL und BUDDINGTON, 1992). Dieser  $K_m$ -Wert liegt aufgrund der 'Unstirred layer'-Effekte über dem Wert, der mit Brush Border Membrane Vesikeln gewonnen werden kann (BREVES et al., 2000; BREVES et al., 2000; HIRAYAMA et al., 1997; STEVENS et al., 1990; WRIGHT et al., 1997; WRIGHT et al., 1991). Es kann jedoch mit Hilfe von  $K_m$  für die vorliegende Untersuchung sehr gut abgeschätzt werden, dass die vorhandenen 'Unstirred layer' auf die Untersuchungsergebnisse nur geringe Auswirkungen haben (HOLTUG und SKADHAUGE, 1991; THOMSON und DIETSCHY, 1980; ZHANG et al., 1998).

Ein zweites  $Na^+$ -abhängiges Glukosetransportsystem mit einer  $K_m$  über 50 mM wurde durch die dafür zu niedrigen, im physiologischen Rahmen gehaltenen, Glukosekonzentrationen nicht angesprochen und ergab deshalb keine Interferenz in den Berechnungen (FERRARIS et al., 1990; HOLTUG und SKADHAUGE, 1991).

Der von BREVES et al. (2000) beschriebene steigernde Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* auf  $V_{max}$  des  $Na^+$ -gekoppelten Glukosetransportes konnte in der eigenen Untersuchung nur für die 56 Tage alten Ferkel bestätigt werden. Gleichzeitig zeigen diese 56 Tage alten Tiere als einzige eine signifikante Erhöhung von  $K_m$  unter Probiotikaeinfluss. Da die Versuchsanordnungen differierten und die in der Literatur beschriebenen Tiere älter waren ist es möglich, dass die fehlende statistische Signifikanz der eigenen Ergebnisse auf den unterschiedlichen Versuchskonzeptionen beruht oder aber die Erhöhung von  $V_{max}$  durch *Bacillus cereus var. toyoi* erst bei älteren Tieren auftritt.

$K_m$  ist bei den 14, 28 und 35 Tage alten Tieren in der Probiotikagruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig ist  $V_{max}$  in der Probiotikagruppe niedriger als in der Kontrollgruppe. Eine korrekte Auswertung dieser Daten bezüglich des Einflusses von *Bacillus cereus var. toyoi* auf die Empfindlichkeit des  $Na^+$ -gekoppelten Glukosetransportes bei niedrigen luminalen Glukosekonzentrationen kann jedoch nur im Zusammenhang mit den Veränderungen bei zunehmendem Alter der Schweine gemacht werden (siehe unten).

Die 95%-Konfidenzintervalle der Michaelis-Menten-Konstante sowie der maximalen Transportgeschwindigkeit sind in der Probiotikagruppe kleiner als in der Kontrollgruppe,

wobei der Natriumgekoppelte Glukosetransport am 56. Tag eine Ausnahme davon bildet. Möglicherweise kann das auf einen stabilisierenden (vereinheitlichenden) Effekt von *Bacillus cereus var. toyoi* bei jüngeren Tieren zurückzuführen sein.

Es besteht ein signifikanter Anstieg von  $K_m$  für den  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Glukosetransport mit zunehmendem Alter. Dies steht im Gegensatz zur Literatur, wo kein Alterseinfluss auf  $K_m$  nachweisbar war (PUCHAL und BUDDINGTON, 1992).

Eine Veränderung von  $K_m$  kennzeichnet nach PUCHAL und BUDDINGTON (1992) eine Art Entwicklung der Transporter selbst mit zunehmendem Alter. Da jedoch für Glukose Sensoren (SGLT-3) existieren, die über die Depolarisation der Zellmembran und nachgelagerte intrazelluläre Informationsübermittlung die Glukosetransportmechanismen steuern, wird auch eine Veränderung von Signaltransduktionsprozessen als Ursache von  $K_m$ -Veränderungen diskutiert (DIEZ-SAMPEDRO et al., 2003; VEYHL et al., 2003; WRIGHT, 1993; WRIGHT et al., 1997; WRIGHT et al., 2004).

$V_{\max}$  zeigt die niedrigsten Werte bei den 14 Tage alten Ferkeln und die höchsten in der Altersgruppe 28 Tage. Mit weiter zunehmendem Alter scheint keine weitere Erhöhung von  $V_{\max}$  mehr aufzutreten. Dies ist zum Teil mit den Ergebnissen von PUCHAL und BUDDINGTON (1992) vergleichbar.

$V_{\max}$  von Glukose ist proportional zur Anzahl der  $\text{Na}^+$ -Glukose-Kotransporter in der apikalen Zellmembran, welche durch Endo- und Exozytose, unter anderem in Interaktion mit 'Heat Shock Proteinen', determiniert wird (IKARI et al., 2002; WRIGHT et al., 1997). Dabei tritt keine Veränderung der mRNA-Level für SGLT-1 mit zunehmendem Alter auf (MIYAMOTO et al., 1992).  $K_m$  wird von der Änderung der apikalen Transporteranzahl nicht direkt beeinflusst (WRIGHT et al., 1997). Jedoch hängen  $K_m$  und  $V_{\max}$  über intrazelluläre Regulationsmechanismen zusammen (VEYHL et al., 2003). Dies wird durch die im eigenen Versuch signifikante positive Korrelation von  $K_m$  und  $V_{\max}$  des  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Glukosetransportes bestätigt.

Mit steigendem Alter werden die 95%-Konfidenzintervalle für  $K_m$  und  $V_{\max}$  des  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Glukosetransportes innerhalb der Fütterungsgruppen größer, mit einer Ausnahme für  $V_{\max}$  bei den 35 Tage alten Probiotika-gefütterten Tieren. Das bestätigt die Ergebnisse der  $\Delta I_{sc}$ -Bestimmung und könnte auf eine individuell sehr stark variierende Entwicklung des Glukosetransportmechanismus und der Transportkapazität hindeuten, wobei die Unterschiede zwischen den Tieren mit zunehmendem Alter größer werden.

Bis zum 28. Lebenstag erhielten die Ferkel hauptsächlich Milch, ab dem 14. Tag einen steigenden Anteil an Zufutter. Milch enthält in Form von Laktose geringe Mengen an Glukose, die Glukosekonzentration im Darm ist damit sehr niedrig und ab dem 14. Tag durchschnittlich leicht ansteigend (anhand von FERRARIS et al. (1990) geschätzt unter 5 mM). Es bedarf hier eines empfindlichen Aufnahmesystems um die vorhandene Glukose effektiv absorbieren zu können. Die Empfindlichkeit des  $\text{Na}^+$ -gekoppelten Glukosetransportes bei unter 5 mM kann aus dem Zusammenspiel von  $K_m$  und  $V_{\max}$ , den Sättigungsfunktionen (Abbildungen 4.6.6, 4.6.8), abgeleitet werden.

Dies zeigt, dass der Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glukosetransport im Alter von 14 Tagen, bei Ernährung ausschließlich durch Milch, spezifisch zur Aufnahme nur geringer Mengen Glukose aus dem Darmlumen entwickelt ist. Hierbei steigert *Bacillus cereus var. toyoi* die Empfindlichkeit im Bereich bis 2 mM Glukose, jedoch bleibt danach die Probiotikagruppe durch die niedrigere V<sub>max</sub> hinter der Transportkapazität der Kontrollgruppe bei geringen Konzentrationen unter 5 mM etwas zurück.

Im Alter von 28 Tagen ist der Transport dagegen mit höchster Empfindlichkeit aller Altersgruppen (hohe Transportgeschwindigkeit bei niedrigen Glukosekonzentrationen) sehr gut entwickelt. Hier zeigt die Probiotikagruppe eine nur wenig geringere Empfindlichkeit als die Kontrollgruppe.

Die Empfindlichkeit des Na<sup>+</sup>-gekoppelten Glukosetransportes im Bereich der Glukosekonzentration bis 5 mM nimmt vom 28. über den 35. zum 56. Tag ab. Am 35. Tag liegt die Probiotikagruppe dabei höher als die Kontrolle und zeigt damit praktisch keinen Unterschied zur Probiotikagruppe am 28. Tag. Die Kontrollgruppe des 35. Tages liegt dabei deutlich unter der Kontrollgruppe des 28. Tages. Dies deutet auf einen positiven Effekt von *Bacillus cereus var. toyoi* bei Absatzferkeln hin, da eine, wahrscheinlich durch das Absetzen hervorgerufene Depression der Na<sup>+</sup>-abhängige Glukoseaufnahme verhindert wird. Am 56. Tag, bei Stabilisierung der Aufnahme fester Nahrung hat *Bacillus cereus var. toyoi* nur bei hohen Glukosekonzentrationen, ab etwa 10-15 mM einen geringgradig steigernden Effekt auf die Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glukoseaufnahme.

Des Weiteren findet nach dem Absetzen am 21. Tag eine Umverteilung der höchsten Glukoseaufnahme beim Schwein vom proximalen zum mittleren Jejunum statt (PUCHAL und BUDDINGTON, 1992). Die eigenen Ergebnisse lassen vermuten, dass eine solche Umverteilung um den 21. Tag, unabhängig vom Absetzen, stattfinden könnte.

Der SGLT-1 hat eine bedeutende Nebenfunktion als Wassertransporter (siehe Kapitel 2.4.2 sowie ZEUTHEN et al. (1997)). Es wird geschätzt dass die Wasserresorption unter 'steady state'-Bedingungen zu 35 % mit dem Na<sup>+</sup>-Glukose-Kotransport gekoppelt abläuft (WRIGHT et al., 2004), was indirekt am gemessenen I<sub>sc</sub> ablesbar ist. Zu weiteren 35 % findet der Wassertransport mittels SGLT-1 durch Osmose, unabhängig vom Na<sup>+</sup>-Glukose-Kotransport statt (WRIGHT et al., 2004). Diese Größe lässt sich mit Hilfe der Transporteranzahl-determinierten V<sub>max</sub> abschätzen. Nur etwa weitere 30 % der Wasserresorption erfolgen per Osmose durch die Plasmamembran (WRIGHT et al., 2004). Ein steigender Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* auf den Teil der Wasserresorption per SGLT-1 durch Erhöhung der Transporteranzahl könnte somit eine Erklärung für die reduzierte Durchfallhäufigkeit unter diesem Probiotikum sein. Dies kann jedoch mit den in der eigenen Arbeit gewonnenen Daten (V<sub>max</sub> als Maß der Anzahl der Transporter - siehe unten) nicht belegt werden.

Ein zusammenfassender Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur zeigt für *Bacillus cereus var. toyoi* bei Ferkeln nach dem Absetzen (35 Tage) eine leichte Erhöhung der Na<sup>+</sup>-gekoppelten Glukoseabsorption, wie sie auch BREVES et al. (1997a) ausgeprägter beobachteten. V<sub>max</sub> wurde, ähnlich zu BREVES (2000) durch die Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* bei den 56 Tage alten Tieren angehoben.

Die 14 Tage alten Ferkel unterscheiden sich von den übrigen Ferkeln vor allem dadurch, dass sie Glukose schlechter transportieren als die älteren Tiere, was ähnlich von JANSEN (2004) und LODEMANN (2003a, b und 2006) beschrieben wurde.  $K_m$  stieg mit zunehmendem Alter an, im Gegensatz zu PUCHAL und BUDDINGTON (1992) wo  $K_m$  gleich blieb. Der Anstieg von  $V_{max}$  ist dabei mit den Ergebnissen dieser Autoren vergleichbar.

#### 5.4.2 Glutaminabsorption

Die Höhe des  $\Delta I_{sc}$  auf die Zugabe von Glutamin ist mit den in der Literatur beschriebenen Werten vergleichbar (ARGENZIO et al., 1994; BREVES et al., 2000; JANSEN, 2004; WINCKLER et al., 1999).

L-Glutamin stimuliert den Kurzschlussstrom in der Probiotikagruppe mehr als in der Kontrollgruppe, führt jedoch zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen. Dies bestätigt Daten aus der Literatur sowohl für *Bacillus cereus var. toyoi* als auch für andere Probiotika (BREVES et al., 2000; JANSEN, 2004, LODEMANN, 2006), sowie die Arbeitshypothese. Eine Ausnahme bildet die Altersgruppe 56 Tage, bei der kein Unterschied zwischen den Fütterungsgruppen beobachtet wurde.

Dies kann im Zusammenhang damit, dass an die Glutaminabsorption eine Wasserabsorption gekoppelt ist (RHOADS et al., 1994), möglicherweise helfen, den klinisch beschriebenen Sachverhalt zu begründen, dass *Bacillus cereus var. toyoi* bei jüngeren Tieren eine größere Wirksamkeit z.B. in Form von höheren Gewichtszunahmen und weniger Durchfällen zeigt als bei älteren (LEITGEB, 2004; LÖHNERT, 2000).

In den Altersgruppen 14, 28 und 35 Tage kann *Bacillus cereus var. toyoi* keinen stabilisierenden Effekt auf den Glutamintransport ausüben. Am 56 Tag verringert er jedoch wie auch beim  $Na^+$ -gekoppelten Glukosetransport die Standardabweichung gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Aufnahme von Glutamin scheint in der Säuge- und Absetzphase durch *Bacillus cereus var. toyoi* unterstützt zu werden. In dieser Phase, in der eine Futterumstellung während der Hauptwachstumsphase erfolgt, sind Aminosäuren besonders wichtig zum Aufbau der Körpersubstanz und des Immunsystems sowie besonders Glutamin auch als Energielieferant (KANDIL et al., 1995), sowie weiterführende Literatur in WU et al. (1995). Hier sind die Ferkel der Probiotikagruppe mit einer erhöhten Resorptionsrate von Glutamin, welches als Modellaminosäure für die Aminosäuren-Resorption diente, bevorteilt. Im Alter von 56 Tagen dagegen, wenn die Adaption an die milchlose Ernährung abgeschlossen ist, schwindet dieser Unterschied zwischen den Gruppen und *Bacillus cereus var. toyoi* scheint einen eher stabilisierenden (vereinheitlichenden) Effekt auf den  $Na^+$ -gekoppelte Glutamintransport auszuüben.

Die Untersuchungen der  $Na^+$ -gekoppelten Glutaminabsorption zeigen im Vergleich mit der Literatur, dass *Bacillus cereus var. toyoi* nur bei jüngeren Ferkeln (14, 28 Tage) bzw. nach dem Absetzen (35 Tage) die Absorption geringgradig steigert, wie dies auch von BREVES et al. (2000) für Dipeptide beschrieben wurde. Bei den 56 Tage alten Tieren ist dieser Effekt fast gänzlich aufgehoben (vergleiche JANSEN (2004) und LODEMANN (2006)).

### 5.4.3 Vergleichende Betrachtungen zur Nährstoffabsorption

Der Einfluss des Alters auf die Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glutaminabsorption ähnelt dem Alterseinfluss auf  $\Delta I_{sc}$  in Reaktion auf Glukose, wobei die I<sub>sc</sub>-Reaktion auf Glukose wesentlich höher als die I<sub>sc</sub>-Reaktion auf die gleiche Konzentration Glutamin ist. Dies entspricht Befunden in der Literatur (JANSEN, 2004) In der eigenen Untersuchung korrelieren der Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glutamin- und -Glukosetransport stark positiv.

Mit dieser Korrelation der beiden Na<sup>+</sup>-gekoppelten Absorptionsprozesse läuft eine mit zunehmendem Alter ansteigende Höhe der Villi, sowie eine Steigerung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität bis zum Absetzen parallel (RHOADS et al., 1990; SCHULZKE et al., 1992). 7 Tage nach dem Absetzen sind die Villi nach vorhergehender Verkürzung wieder genauso lang wie vor dem Absetzen. Danach verlängern sie sich nur noch geringfügig weiter (CERA et al., 1988; HALL und BYRNE, 1989; HAMPSON, 1986).

Eine interessante Parallelität zu *Bacillus cereus var. toyoi*, deren Grundlage noch weiterer Untersuchungen bedarf, ist, dass auch im Kryptosporidien-infizierten Ileum sowohl des Schweines als auch des Kalbes die Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glutaminabsorption erhöht ist (ARGENZIO et al., 1994; BLIKSLAGER et al., 2001a).

Allerdings stimuliert Glutamin im Kryptosporidien-infizierten Ileum die Na<sup>+</sup>-Absorption effektiver als Glukose (ARGENZIO et al., 1994). Im Unterschied dazu war unter dem Einfluss des Probiotikums *Bacillus cereus var. toyoi* in der eigenen Untersuchung, wie auch unter *Enterococcus faecium* (JANSEN, 2004) das Gegenteil zu beobachten, Glukose stimulierte die Na<sup>+</sup>-Absorption stärker als Glutamin. Dies könnte folgendermaßen begründet werden:

An den Villi sind die Glukosetransporter exprimiert, während Glutamintransporter sowohl an den Villi als auch in den Krypten zu finden sind (BLIKSLAGER et al., 2001a; STEWART und TURNBERG, 1987). Bei einer Infektion der Darmschleimhaut mit Kryptosporidien kommt es zu einem Verlust der Villi (ARGENZIO et al., 1994; BLIKSLAGER et al., 2001a). *Bacillus cereus var. toyoi* hingegen erhöht die Villuslänge und damit die Größe glukosetransportierender Oberfläche (BAUM et al., 2002; GÖRKE, 2000), sowie GÖRKE (1999) zitiert nach KÜHN (2000)). Bei *Enterococcus faecium* bleibt die Villuslänge gleich im Gegensatz zur Kontrollgruppe (SCHAREK et al., 2005).

An der unbeeinflussten Darmschleimhaut überwiegt offensichtlich die an die Villi gebundene Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glukoseabsorption, dies wird durch die Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* sogar noch verstärkt. Bei Schädigung der Villi ist die Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glukoseabsorption dagegen nur noch rudimentär vorhanden (siehe unten) und somit überwiegt dann die Na<sup>+</sup>-gekoppelte Glutaminabsorption als Na<sup>+</sup>- und Nährstoffaufnahme-mechanismus.

Eine Reduktion des Na<sup>+</sup>-gekoppelten Glukosetransportes durch verringerte Villushöhe kann z.B. durch *Staphylococcus aureus* Enterotoxin hervorgerufen werden. Unter der Wirkung dieses Toxins wird V<sub>max</sub> des Glukosetransportes ohne Einfluss auf K<sub>m</sub> gesenkt (GARRIGA et al., 2005) sowie die Villushöhe verringert (BENJAMIN et al., 1998). Die Abnahme von V<sub>max</sub> zeigt eine Verringerung der SGLT-1-Anzahl an (WRIGHT et al., 1997), die offensichtlich durch Verringerung der Villuszellzahl verursacht wurde.

## 5.5 Diskussion der Einflüsse von *Bacillus cereus var. toyoi* bzw. des Alters auf die Barrierefunktion des Epithels

### 5.5.1 Messung von <sup>3</sup>H-Mannitflux und basalem transepithelialen Widerstand

Wenn keine chemischen, osmotischen oder hydrostatischen Gradienten vorhanden sind, sind die Fluxe in beide Richtungen theoretisch gleich. Ein als 'Bulk Flow' bekannter Effekt kann durch die Verursachung eines 'Solvent Drag' bei dieser Messung jedoch einen Fehler induzieren (FRANZ et al., 1968). Im vorliegenden Versuch wird dies im Rahmen der Messungenauigkeit als unerheblich angenommen, weshalb nur die sero-mukosale Richtung des Mannittransportes gemessen wurde.

Im Vergleich mit der Literatur liegen die gemessenen Werte im beschriebenen Bereich für Mannitfluxe bzw. transepitheliale Widerstände des Schweinedünndarmes (ARGENZIO et al., 1984; ARGENZIO und LIACOS, 1990; BREVES et al., 2001; JANSEN, 2004; WINCKLER et al., 1998; WINCKLER, 1997).

Im Gegensatz zur Literatur, in der signifikante Abnahmen der unidirektionalen Mannitfluxraten bis zu 30 % unter dem Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* beschrieben sind und der eigenen Arbeitshypothese konnten geringgradig abnehmende Effekte zwar beobachtet, jedoch nicht als signifikant eingestuft werden (BREVES et al., 1997b; WINCKLER et al., 1998; WINCKLER, 1997). Alle anderen Arbeitshypothesen zur epithelialen Barrierefunktion (siehe Kapitel 2.5) konnten bestätigt werden.

Am 14. Tag ist die Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* auf die unidirektionalen <sup>3</sup>H-Mannitfluxe umgekehrt zur Wirkung von *Enterococcus faecium* und am 28. Tag gleichgerichtet, doch wesentlich schwächer. Im Alter von 35 und 56 Tagen ist bei beiden Probiotika kein Unterschied zu den Kontrollgruppen mehr sichtbar (vergleiche mit JANSEN (2004) und LOEDEMANN (2006)).

Die verschiedenen Alters- und Fütterungsgruppen weisen, wie in einem Teil der Literatur beschrieben, etwa gleich große transepitheliale Gewebewiderstände bei Schwankungen der unidirektionalen <sup>3</sup>H-Mannitfluxraten auf (WINCKLER et al., 1998; WINCKLER, 1997).

Eine Besonderheit bilden die 35 Tage alten Tiere mit den geringsten transepithelialen Widerständen bei gleichzeitig geringsten unidirektionalen <sup>3</sup>H-Mannitfluxen (siehe Abbildung 4.4.3, 4.4.4 und Tabelle 4.4.1). Dies entspricht den Ergebnissen von JANSEN (2004). Dies kann Ausdruck selektiver Durchlässigkeit der Tight Junctions gegenüber verschiedenen Teilchenspezies sein (AMASHEH et al., 2002; COLEGIO et al., 2002; FLORIAN et al., 2003; GOODENOUGH, 2005). Offensichtlich gibt es einen Unterschied (eine Entkopplung) zwischen dem Widerstand gegenüber elektrisch geladenen Teilchen, messbar mit dem  $R_t$  und dem Widerstand gegenüber großen ungeladenen Molekülen, messbar mit Fluxen dieser ungeladenen radioaktiv markierten Moleküle. Diese These der voneinander losgelösten Durchlässigkeit für verschiedene Ionen/Moleküle findet indirekt Bestätigung durch fehlende ultrastrukturelle Änderungen an den Tight Junctions trotz veränderter Funktionalität in Form von Mannitfluxen und  $R_t$  (ROIG-PÉREZ et al., 2002), sowie durch das Vorhandensein einer Ionenselektivität unter dem Einfluss von z.B. Claudinen in den Tight Junctions (AMASHEH et al., 2002).

## 5.5.2 Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf den transepithelialen Widerstand

Der R<sub>t</sub>-Anstieg nach PGE<sub>2</sub>-Zugabe erfolgte innerhalb des in der Literatur beschriebenen Bereiches (BLIKSLAGER et al., 1999b; BLIKSLAGER et al., 1997; UNMACK et al., 2001b). Der Anstieg des R<sub>t</sub> zeigt sowohl eine signifikante Konzentrationsabhängigkeit als auch Korrelation mit dem  $\Delta I_{sc}$  nach PGE<sub>2</sub>-Zugabe. Die beschriebene Verbindung zwischen Cl<sup>-</sup>-Sekretion und R<sub>t</sub>-Erhöhung konnte damit bestätigt werden (BLIKSLAGER et al., 1997). Ob allerdings PGs den R<sub>t</sub>-Anstieg durch Schaffung eines transmuralen osmotischen Gradienten signalisieren (BLIKSLAGER et al., 1999b; LITTLE et al., 2003) bleibt offen.

## 5.6 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Wirkungen von Probiotika wurden bei vielen verschiedenen Tierspezies mit einer Reihe von Mikroorganismen untersucht (siehe Kapitel 2). In der vorliegenden Arbeit wurden die Spezies Schwein und der Mikroorganismus *Bacillus cereus var. toyoi* für die Untersuchung ausgewählt.

Das Schwein als landwirtschaftliches Nutztier unterliegt ab dem Jahre 2006 dem Verbot der Verfütterung antibiotischer Leistungsförderer, weshalb Probiotika als mögliche Alternative intensiver untersucht werden. *Bacillus cereus var. toyoi* wurde als Probiotikum gewählt, da er als Sporenbildner sehr widerstandsfähig gegenüber Zerstörung bei der Futtermittelzubereitung sowie sehr lange ohne Qualitätsverlust lagerfähig ist.

Das Verdauungssystem des Schweines kann als Modell für den menschlichen Gastrointestinaltrakt betrachtet werden (NEJDFORS et al., 2000), weshalb sich auch für den humanmedizinischen Erkenntnisgewinn eine Bedeutung ergeben kann. Da in der vorliegenden Arbeit die Transportphysiologie im Jejunum untersucht wird, spielt der Unterschied im caecalen Abschnitt des Verdauungstraktes zwischen den Spezies Mensch und Schwein keine Rolle.

In Bezug auf die Arbeitshypothesen zum Einfluss des Probiotikums *Bacillus cereus var. toyoi* bzw. des Alters auf die Transportvorgänge im mittleren Jejunum des Schweines kann zusammengefasst werden:

Die transepithelialen Transportprozesse werden sowohl durch die Verabreichung von *Bacillus cereus var. toyoi* als auch durch das Alter der Schweine beeinflusst.

Daraus folgen speziellere Fragen, wobei der Einfluss von *Bacillus cereus var. toyoi* den Schwerpunkt der Betrachtungen bilden soll:

- Wie verändern sich die transportphysiologischen Funktionen Sekretion, Absorption und die Barrierefunktion des Dünndarmes im Laufe der Entwicklung des Ferkels?
- Auf welche Transportmechanismen kann *Bacillus cereus var. toyoi* im Laufe der Entwicklung des Ferkels Einfluss nehmen, um möglicherweise das Durchfallgeschehen und das Wachstum zu beeinflussen?

Es zeigte sich in der vorliegenden Untersuchung, dass durch Berechnung von  $K_m$  und  $V_{max}$  für konzentrationsabhängige Transporte ein zusätzlicher Erkenntnisgewinn im Gegensatz zur alleinigen Auswertung von  $\Delta I_{sc}$  erreicht werden kann.

Die nutzbringenden Eigenschaften einer durch *Bacillus cereus var. toyoi* bedingten erhöhten Empfindlichkeit der PGE<sub>2</sub>-stimulierten Sekretion sind am deutlichsten bei den Ferkeln vor (28 Tage alt) und eine Woche nach dem Absetzen (35 Tage alt) zu beobachten. Die 35 Tage alten Probiotikatiere kommen dabei (7 Tage nach dem Absetzen) in den Bereich der Empfindlichkeit von 14 Tage alten Tieren beider Fütterungsgruppen. Des Weiteren zeigt sich generell eine stabilisierende Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* durch eine Harmonisierung der interindividuellen Schwankungen.

Es gibt in der Literatur Untersuchungen über toxininduzierte Schädigungen (z.B. Cholera toxin, hitzestabiles oder hitzelabiles *E. coli* - Enterotoxin) bzw. Effekte von Probiotika am Darmepithel. Modelluntersuchungen über die Wirkung von Probiotika auf transportphysiologische Vorgänge bei solchen induzierten Schädigungen sind in der Literatur jedoch bisher nicht zu finden. Möglicherweise lässt sich mit Hilfe solcher Untersuchungen die Wirkungsweise von Probiotika zur Unterstützung der Darmgesundheit detaillierter verstehen.

Die Untersuchungen der Na<sup>+</sup>-gekoppelten Glutamin- und Glukoseabsorption zeigen, dass *Bacillus cereus var. toyoi* bei Ferkeln, die unter optimalen Haltungsbedingungen aufgezogen wurden, ggr. Effekte erzielt, die eine Leistungs- bzw. Gesundheitssteigerung bewirken könnten, jedoch nur bei jüngeren Tieren bzw. nach dem Absetzen. Bei 56 Tage alten Tieren ist ein Effekt fast gänzlich aufgehoben. Auch bei der Absorption zeigt sich durch *Bacillus cereus var. toyoi* überwiegend eine Harmonisierung der interindividuellen Streuungen.

Dagegen scheint *Bacillus cereus var. toyoi* in der vorliegenden Untersuchung keinen Effekt auf die Barrierefunktion des mittleren Jejunums des Schweines zu haben.

Der Gehalt von *Bacillus cereus var. toyoi* im Jejunum des Schweines steigt mit zunehmendem Alter an (TARAS et al., 2005). Trotzdem zeigt der Keim in der eigenen Untersuchung, wie auch in der Literatur (DAENICKE, R und FLACHOWSKY, 2002), überwiegend in den ersten Lebenswochen Effekte. Möglicherweise tritt eine Adaptation an den Keim nach einer bestimmten Gabeldauer auf, wonach dann allein die harmonisierende Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* im Vordergrund steht.

Die 14 Tage alten Ferkel unterscheiden sich von den übrigen Ferkeln vor allem dadurch, dass sie auf PGE<sub>2</sub> besser ansprechen, also mehr Flüssigkeit sezernieren bzw. Glukose und Glutamin schlechter transportieren und damit weniger Flüssigkeit rückresorbieren können als die älteren Tiere. Möglicherweise ist das eine Erklärung für die heftigere Ausprägung des Durchfalles bei jüngeren Schweinen (MCEWAN et al., 1990). Dabei hat *Bacillus cereus var. toyoi* hier eine die Sekretion abschwächende und die Absorption z.T. steigernde Wirkung.

Am deutlichsten zeigt *Bacillus cereus var. toyoi* jedoch in der vorliegenden Arbeit einen interindividuell vereinheitlichenden Effekt auf die zellulären Transportmechanismen Na<sup>+</sup>-gekoppelter Glukose- und Glutaminabsorption sowie PGE<sub>2</sub>-stimulierter Sekretion.

Das selektive Wirken von *Bacillus cereus var. toyoi* auf zelluläre Transportmechanismen und nicht auf die Barrierefunktion des Jejunumepithels kann möglicherweise unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass *Bacillus cereus var. toyoi* ein transienter und kein lokal in der Mikrobiologie des Darmes etablierter Mikroorganismus ist. Er haftet nicht an der Darmwand, kann also nur indirekt durch die von ihm abgegebenen Substanzen auf das Epithel einwirken (JADAMUS, 2001). Möglicherweise wirken diese Substanzen vorrangig auf die Epithelzelle und deren Transportmechanismen und weniger auf die parazellulären Strukturen der Darmbarriere ein.

In der vorliegenden Arbeit kristallisiert sich eine Harmonisierung der interindividuellen Schwankungen als hauptsächliche Wirkung von *Bacillus cereus var. toyoi* heraus. Dies weist auf einen die Mikroökologie des Darmes, in der sowohl die gesamte Ingesta mit ihrer Mikrobiologie als auch die Darmwand mit ihren physiologischen Mechanismen eingeschlossen sind, 'stabilisierenden' Effekt hin.

Dazu möchte ich einen fachfremden aber sehr bildhaften Vergleich anstellen. Übertragen vom Finanzmarkt sind Probiotika eine sichere Anlage mit relativ geringen, aber garantierten Renditen, die also in schlechten Zeiten höhere Erträge bringen als unsichere Anlagen mit eventuell hohen Renditen aber auch hohem Verlustrisiko.

Zuletzt sollen noch Ausblicke auf noch mögliche und noch zu untersuchende Zusammenhänge gegeben werden.

Aus einer erhöhten Nährstoffabsorption im Dünndarm könnte eine erhöhte präzäkale Verdaulichkeit resultieren. Dies bedarf einer interdisziplinären Auswertung der Daten zu denen auch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse gehören.

Glutamin hat einen die Barrierefunktion des Epithels verstärkenden Effekt (FOITZIK et al., 1999). Die Untersuchung dieses Effektes übersteigt leider den Umfang dieser Arbeit. Jedoch könnte die Barriere des Darmes durch Probiotika indirekt unterstützt werden, sollten sie eventuell diesen Effekt von Glutamin triggern.