

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operativen Intensivmedizin der Medizinischen  
Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Perioperativ verabreichte Milchsäurebakterien und ihr Einfluss auf Parameter des  
Immunsystems bei Patienten mit abdominal-chirurgischen Eingriffen:  
Ergebnisse einer prospektiven, randomisierten und placebokontrollierten Studie

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Synke Lüdemann  
aus Wismar in Mecklenburg-Vorpommern

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. med. H. Gerlach
2. Prof. Dr. med. N. Weiler
3. Prof. Dr. K. Mayer

Datum der Promotion: 05.06.2011

Für meine Eltern

# 1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS .....	4
2	EINLEITUNG .....	7
2.1	Einführung .....	7
2.2	Das adaptive Immunsystem .....	11
2.3	Abwehrmechanismen des Gastrointestinaltraktes .....	14
2.4	Fragestellung .....	18
3	MATERIAL UND METHODEN .....	19
3.1	Patientenkollektiv .....	19
3.1.1	Einschlusskriterien .....	19
3.1.2	Ausschlusskriterien .....	19
3.1.3	Abbruchkriterien .....	19
3.2	Erkrankungen, Operationen und Anästhesie .....	20
3.2.1	Pankreaskarzinom .....	20
3.2.2	Chronische Pankreatitis .....	20
3.2.3	Klassische Operation nach Kausch und Whipple .....	21
3.2.4	Pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie .....	21
3.2.5	Postoperative Periduralanästhesie .....	21
3.3	Studienprotokoll .....	22
3.4	Geräte .....	23
3.5	Monoklonale Antikörper .....	24
3.6	Durchflusszytometrische Analyse .....	25
3.6.1	Vorbereitung der Blutproben .....	25
3.6.2	Prinzip der Oberflächenantigenbestimmung .....	25
3.6.3	Messprotokoll der durchflusszytometrischen Bestimmung .....	26
3.7	Immunologische Bestimmung der Plasmazytokinspiegel .....	28
3.7.1	Vorbereitung der Blutproben .....	28
3.7.2	Prinzip der immunologischen Zytokinbestimmung .....	28
3.7.3	Messprotokoll der immunologischen Zytokinbestimmung .....	30
3.8	Statistische Methoden .....	32
4	ERGEBNISSE .....	33
4.1	Epidemiologische Daten .....	33
4.2	Leukozyten und ihre Subpopulationen .....	35
4.2.1	Leukozyten .....	35

4.2.2	Lymphozyten.....	36
4.2.3	B-Lymphozyten .....	37
4.2.4	T-Lymphozyten .....	38
4.2.5	CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten.....	39
4.2.6	T4/T8-Ratio .....	40
4.2.7	$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten .....	41
4.2.8	Natürliche Killerzellen.....	42
4.3	Aktivierungsmarker.....	43
4.3.1	HLA-DR- und CD25-positive T-Zellen .....	43
4.3.2	CD45RA- und CD45RO-positive T4-Zellen.....	44
4.3.3	CD45RA- und CD45RO-positive T8-Zellen.....	45
4.4	Zytokine.....	46
4.4.1	Interleukin 10 und Interleukin 12 .....	46
4.4.2	Interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ ).....	47
4.5	IgA-Konzentration im Serum .....	48
5	DISKUSSION.....	49
5.1	Studiendesign .....	49
5.2	Perioperative Medikation.....	50
5.3	Patientenabhängige Faktoren .....	51
5.4	Präbiotika, Probiotika und Synbiotika.....	55
5.5	Messmethoden.....	60
5.6	Zellen des spezifischen Immunsystems .....	62
5.6.1	Leukozyten.....	62
5.6.2	Lymphozyten.....	63
5.6.3	CD4- und CD8-positive T-Zellen .....	65
5.6.4	$\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen .....	67
5.7	Aktivierungsmarker.....	69
5.7.1	CD25-positive T-Zellen und HLA-DR-positive T-Zellen.....	69
5.7.2	CD45RA- und CD45RO-positive T-Zellen.....	72
5.8	Zytokine.....	74
5.8.1	Interleukin 10.....	75
5.8.2	Interleukin 12.....	76
5.8.3	Interferon $\gamma$ .....	77
5.9	IgA im Serum .....	79

6	KLINISCHER AUSBLICK.....	81
7	ZUSAMMENFASSUNG .....	84
8	ANHANG.....	85
8.1	Abkürzungen.....	85
8.2	Literaturverzeichnis .....	87
8.3	Danksagung .....	99
8.4	Lebenslauf.....	100
8.5	Erklärung an Eides Statt.....	101

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Einführung

In den letzten fünf Jahrzehnten sind oral aufgenommene Mikroorganismen und ihr humoraler therapeutischer Effekt gegenüber bakteriellen Infektionen Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen geworden. Für das aufflammende Interesse an einer „microbial interference therapy“ (MIT) werden folgende Ursachen in Erwägung gezogen:

- ◆ die durch die ausgedehnte Anwendung von Antibiotika nicht nur als Therapeutikum, sondern auch als Wachstumsstimulator für Nutztiere stetig zunehmenden Antibiotikaresistenzen,
- ◆ die während einer Antibiose auftretenden Prädispositionen für andere Infektionen wie z.B. der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe oder Pilzinfektionen,
- ◆ die trotz antibiotischer Therapieoptionen seit mehr als 50 Jahren unverändert hohe Mortalität einer Bakteriämie durch Gram-negative Keime von 20-40% und
- ◆ das allgemein zunehmende Interesse an alternativen Therapieoptionen [16, 60].

Vor allem die zunehmende Resistenzentwicklung gegenüber einer antibiotischen Therapie gibt Anlass zur Sorge. In den 40er Jahren wurde eine Streptokokkenpneumonie mit einer viertägigen Therapie mit 10000 Einheiten Penicillin geheilt. In den 90er Jahren benötigten Patienten 24 Millionen Einheiten Penicillin und verstarben trotzdem oft an einer Pneumokokkenmeningitis. Zudem wurde in den frühen 80er Jahren erstmals ein Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*-Stamm nachgewiesen. Zur Eindämmung der Resistenzentwicklung werden Antibiotika mit Hilfe von Antibiogrammen gezielt eingesetzt. Für eine Zuordnung der Erreger mittels standardisierter Testverfahren in die Kategorien sensibel, intermediär und resistent beschäftigt sich seit über 40 Jahren der Arbeitsausschuss „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ des Normausschusses Medizin im Deutschen Institut für Normung [8]. Trotz einer so verbesserten Kategorisierung von Erregern und Weiterentwicklung antibiotischer Wirkstoffe ist es bis heute nicht gelungen, die Resistenzentwicklung wesentlich einzudämmen.

Auf der Suche nach Alternativen einer antibiotischen Therapie wurde 1965 das im 19. Jahrhundert von Elie Metchnikoff entwickelte Konzept der „microbial interference therapy“ in einer Veröffentlichung von Lilly und Stillwell aufgegriffen [94, 56].

Metchnikoff (1845-1916, Nobelpreisträger für die Entdeckung der Phagozytose) gelangte bei der Untersuchung des Alterungsprozesses zu der Ansicht, dass mikrobielle Organismen des Magen-Darmtraktes toxische Substanzen wie Ammoniak, Indole oder Amine produzieren und so durch Schädigung der Gefäße und Nerven den Alterungsprozess des Menschen mitbestimmen. Als präventive Maßnahme erachtete Metchnikoff, die schädigenden Organismen durch Milchsäureproduzierende Mikroorganismen zu ersetzen. Lilly und Stillwell beschrieben in ihrem Aufsatz Bakterien, deren Sekretionsprodukte das Wachstum anderer Bakterien stimulieren. Sie nannten diese Organismen „Probiotika“, um sie in ihrer Wirkungsweise von den „Antibiotika“ zu differenzieren. Im Verlauf wurde der Begriff „Probiotika“ angewandt, um Organismen oder Substanzen zu beschreiben, die die Balance der natürlichen Mikroben im Gastrointestinaltrakt (GIT) aufrecht erhalten. Mit fortschreitenden Forschungsergebnissen wurde der Begriff „Probiotika“ wiederholt durch kleinere Veränderungen neu definiert [147, 16, 157, 77, 149, 75, 100]. Die Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization definiert Probiotika als „Live microorganism which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host“ [191].

Es wurden zunächst Bakterien untersucht, die ohnehin Bestandteil unseres GIT sind und solche, die bereits seit Jahrzehnten z.B. bei der Vergärung von Milchprodukten verwendet wurden. Hierzu gehörten Laktobazillen, Bifidobakterien, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Saccharomyces boulardii und Escherichia coli [150, 171]. Ihnen sind folgende Eigenschaften gemein: Sie sind resistent gegenüber Pankreasenzymen, Magen- und Gallensäuren. Durch ihre Haftung an Epithelzellen können pathogene Keime kompetitiv verdrängt, das gastrointestinale Immunsystem stimuliert bzw. moduliert und ein vorzeitiges Ausscheiden der Probiotika infolge der Peristaltik verhindert werden [154, 56]. Die Adhäsion an den Epithelzellen kann nur gewährleistet werden, wenn Probiotika gegenüber den von Epithelzellen gebildeten zytotoxischen Defensinen resistent sind [188]. Zur Vernichtung pathogener Keime sind einige Milchsäurebakterien (Lactic acid bacterium, LAB) zudem befähigt, antimikrobielle Substanzen wie Säuren, Bakteriozine, Biosurfactans oder Wasserstoffperoxid zu produzieren. Zudem besitzen einige Milchsäurebakterien durch Bindung und Abtransport von Karzinogenen antimutagene Effekte [41, 16, 169, 172, 173]. Die bei der Vergärung von Kohlenhydraten gebildete Milchsäure und das entstandene Kohlendioxid schafft saure anaerobe Verhältnisse und unterstützt das

Wachstum und die Ansiedlung von anderen LAB. Die meist tierexperimentell und *in vitro* nachgewiesenen gesundheitsfördernden Eigenschaften sind nur vereinzelt in klinischen Studien aus den 80er und 90er Jahren bestätigt worden. Hierunter fallen eine gesteigerte Zytokin- und Antikörperproduktion, eine erhöhte Phagozytosefähigkeit und T-Zell-Funktion sowie eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität durch Joghurtkonsum [117]. Aufgrund der eingeschränkten Datenlage wird die Anwendung von LAB bei nur wenigen Erkrankungen empfohlen:

- ◆ bestimmte chronisch-entzündliche Darmerkrankungen [160]
- ◆ verschiedene Durchfallerkrankungen z.B. Reisediarrhoe, Rotavirus Infektion oder Antibiotika-assoziierte Diarrhoe [74, 80, 123, 48]
- ◆ Vorbeugung einer Neurodermitis [91].

Im Verlauf der Untersuchungen zum Thema Probiotika wurden Substrate ermittelt, welche selektiv das Wachstum von Probiotika stimulieren und so, die Verweildauer und die Konzentration von bestimmten Probiotika im GIT verlängern können. Diese Substrate werden „Präbiotika“ genannt und erst im Kolon von spezifischen gesundheitsfördernden Mikroben vergärt [140].

Die in dieser Studie verwendeten Präbiotika sind Fructooligosaccharide, Betaglucan, Inulin und resistente Stärke. Letztere kommt u.a. in rohem Gemüse, Bananen oder Vollkorn-Haferbrot vor. Fructooligosaccharide sind in vielen Pflanzen wie Zwiebeln, Bananen und Artischocken sowie in Bier und Honig zu finden. Betaglucan ist ebenfalls ein Polysaccharid und kann z.B. aus der Bäckerhefe, Hafer und Pilzen gewonnen werden. Seine gesundheitsfördernden Eigenschaften sind u.a. die Stimulation des Immunsystems, die Senkung des Cholesterinspiegels und eine Verbesserung der Blutzuckerkontrolle. Zudem scheint es ein wirkungsvoller Radikalfänger zu sein. Inulin (Fructan, Fructosan) und Oligofruktose sind die am besten untersuchten Präbiotika. Es handelt sich um Kohlenhydrate, welche v.a. das Wachstum von Bifido- und Milchsäurebakterien stimulieren.

Der Effekt von Präbiotika auf die Mikroben des Darmes wurde erstmals in einer Studie von Wang und Gibson 1993 genauer beschrieben. Sie beobachteten, dass Bifidobakterien auf Kosten anderer Mikroorganismen, wie Bacteriodes, Clostridien und E. coli nach *in vitro* Zugabe von Fructooligosacchariden wuchsen. Das Ergebnis wurde in einer *in vivo* Studie bei der Untersuchung von Stuhlproben gesunder Probanden, die 14 Tage Präbiotika zu sich nahmen, bestätigt [58]. Großes Interesse

erlangten Präbiotika als Bestandteil von Babynahrung, da sie dosisabhängig die Konzentrationen von Milchsäurebakterien und Bifidobakterien im Stuhl erhöhten und zudem die Absorption von Mineralien (Kalzium und Magnesium) verbesserten [156]. Die ESPGHAN (European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) sieht allerdings aufgrund der begrenzten Datenlage von einer generellen Gebrauchsempfehlung für Babynahrung ab [30].

Im klinischen Alltag zählt Laktulose, welches bei Obstipationsbeschwerden Anwendung findet, zu dem bekanntesten Präbiotika. Zudem werden Präbiotika in Sondenkostpräparaten vermehrt eingesetzt. Bei Traumapatienten führte dies zu einer Reduktion der nosokomialen Infektionsrate [15]. In einer Studie von Bouthnik et al. zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von Präbiotika auf die Kolonisation von LAB, d.h. je mehr Präbiotika verabreicht wurden, desto mehr LAB konnten im Stuhl nachgewiesen werden [23]. Im Gegensatz dazu konnten Okguin et al. 2005 in einer randomisierten doppelt geblindeten Studie an 40 Patienten mit hochgradigen Verbrennungen keine Vorteile einer 14-tägigen Präbiotikaadministration nachweisen [127]. Die Autoren führten das negative Ergebnis auf die gleichzeitige hochdosierte Gabe von Antibiotika zurück. Macfarlane et al. fassten in einem Übersichtartikel von 2006 die Effekte von Präbiotika auf die gastrointestinale Funktion und die Gesundheit des Menschen zusammen [101].

Kombinationspräparate bestehend aus Pro- und Präbiotika werden unter dem Begriff „Synbiotika“ zusammengefasst. Für die in dieser Studie gewählten Synbiotika wurden positive Effekte bei Arteriosklerose, Morbus Crohn und chronischen Lebererkrankungen nachgewiesen [89, 96]. Zudem beobachteten Bengmark et al. und Rayes et al. bei der Verwendung von Synbiotika (Synbiotic2000®) eine Reduktion der Morbidität von Traumapatienten bei früher enteraler Applikation [136, 14, 126]. Olah et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen bei Patienten mit akuter Pankreatitis [126].

Abgesehen von einer gezielten LAB-Auswahl ist der Zeitpunkt der ersten Einnahme von Bedeutung. Es hat sich herausgestellt, dass ein möglichst früher Einsatz den größten immunmodulatorischen Effekt bewirkt. Ein möglichst früher Therapiebeginn wird zudem plausibel, wenn bedacht wird, dass sich tierexperimentell innerhalb von 6 bis 12 Stunden nach Induzieren einer Pankreatitis die Konzentration von Anaerobiern und Milchsäurebakterien im GIT signifikant reduziert und infolge dessen die Anzahl der potentiell pathogenen Keime innerhalb von Stunden signifikant steigt. Letzteres

ging mit einer massiven Beeinträchtigung der mukosalen Barrierefunktion einher [86]. Das Patientenkollektiv unserer Studie erhielt erstmalig einen Tag vor der Operation die Studiennahrung.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse von tierischen und humoralen Studien häufig widersprüchlich. In tierischen Studien mit *L. plantarum* beispielsweise konnte bei Mäusen mit induzierter chronisch entzündlicher Darmerkrankung ein positiver Effekt auf histologischer Ebene nachgewiesen werden [158, 113]. Im Gegensatz hierzu konnte in der klinischen Studie von Sen et al. nach 4-wöchiger Behandlung mit Synbiotika bei Patienten mit chronisch entzündlicher Darmerkrankung weder eine Verbesserung der Symptomatik noch eine Veränderung der Stuhlzusammensetzung eruiert werden [159]. 2001 beenden Prantera et al. eine placebo-kontrollierte Studie an 37 operierten Patienten mit Morbus Crohn. Nach 52 Wochen oraler *L. casei* sub. rhamnosus Einnahme zeigte sich kein Unterschied des postoperativen Verlaufes zwischen der Placebo- und der Verumgruppe [133]. Widersprüchliche Ergebnisse ergaben sich auch in den *in vivo* Studien, welche Immunparameter des adaptiven und unspezifischen Immunsystems untersuchten [64, 136, 141, 66, 135, 47].

## **2.2 Das adaptive Immunsystem**

Die Abwehr eines Organismus gegenüber einem Krankheitserreger erfolgt über drei sich ergänzende Systeme: dem erworbenen, adaptiven Immunsystem (lymphatisches System), dem unspezifischen, zellulären (Makrophagen) Immunsystem und dem unspezifischen, humoralen Immunsystem (Komplementssystem).

Den größten Anteil des lymphatischen Immunsystems bilden die drei Hauptgruppen der lymphozytenartigen Zellen: B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und Null-Zellen. Diese Zellen entwickeln sich im Rahmen der sogenannten Lymphozytenprägung in den primären lymphatischen Organen (Knochenmark, Thymus). Eine Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Zellen zeigt Abbildung 1.

Im Thymus exprimieren T-Zellen zunächst einen T-Zell-Rezeptor (T-cell-receptor, TCR), welcher Peptide von Zelloberflächen zusammen mit HLA-Strukturen (HLA-Moleküle, MHC-Moleküle, humane leucozyte antigen, major histocompatibility complex) erkennt. HLA der Klasse I werden auf allen kernhaltigen Zellen nachgewiesen und von CD8-positiven T-Zellen erkannt. HLA der Klasse II befinden sich in den Membranen von antigenpräsentierenden Zellen wie Phagozyten oder

B-Lymphozyten und werden von CD4-positiven T-Zellen erkannt. Die Bezeichnung CD („cluster of differentiation“) kennzeichnet hierbei ein Oberflächenmolekül der Leukozyten und dient der Beschreibung von Zellpopulationen und ihren Aktivierungszuständen. CD4-positive T-Lymphozyten (T4-Zellen) erkennen z.B. exogene Antigene, die mit HLA-II-Molekülen von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden. CD8-positive T-Zellen erkennen mit Hilfe von HLA der Klasse I dargebotene Peptide zelleigenen oder viralen Ursprunges. Ob sich ein CD4- oder CD8-positiver T-Lymphozyt entwickelt, ist abhängig davon, ob der erste Antigenkontakt durch HLA-I oder HLA-II geschieht. Anschließend haben je nach charakteristischem sezerniertem Zytokinmuster T4-Zellen eine unterschiedliche Immunreaktion zur Folge und können deshalb in Abhängigkeit ihres Zytokinmusters in TH0, TH1 und TH2-Zellen (TH-Zellen, T-Helfer-Zellen) unterteilt werden. Eine strikte Trennung ist wegen Überschneidungen der Zytokinmuster nicht möglich.

Des Weiteren werden T-Zellen durch eine unterschiedliche Expression von CD45-Isoformen identifiziert. Ruhende, naive T-Zellen exprimieren CD45RA und Gedächtnis-T-Zellen das Oberflächenmolekül CD45RO. CD45RA ist stärker auf TH1-Zellen vertreten, während CD45RO vermehrt auf TH2-Zellen zu finden ist.

Ein weiteres wichtiges Adhäsionsmolekül der T-Zellen ist CD25, welches die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors darstellt. In vielen Studien konnte mit Hilfe von „Knock-out-Mäusen“ nachgewiesen werden, dass nach Aktivierung über den TCR die eigene Proliferation gestoppt, die IL-2 Produktion eingestellt und so die Aktivierung von CD4- und CD8-positiven T-Zellen verhindert wird. Das Fehlen von CD25-positiven T-Zellen führt zu schweren Autoimmunerkrankungen, weswegen CD25-positive T-Zellen auch Suppressor-T-Zellen genannt werden.

Eine fast eigenständige Lymphozytengruppe stellen die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die  $\gamma\delta$ -T-Zellen dar. Beide Zellreihen entwickeln sich thymus-unabhängig und sind v.a. für das Erkennen und Abtöten von autologen und allogenen Tumorzellen sowie von virusinfizierten Zellen zuständig. Charakterisiert werden sie durch die Membranmoleküle CD2, CD3, CD16 und CD56. Die physiologische Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und der NK-Zellen ist noch nicht abschließend geklärt.  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind v.a. in Epithelien zu finden und tragen den  $\gamma\delta$ -TCR und CD3. NK-Zellen machen ca. 5% der peripheren Blutzellen aus. Sie tragen keinen TCR, dafür aber eine Vielzahl von CD-Molekülen, wie zum Beispiel CD2, CD16 und CD56.

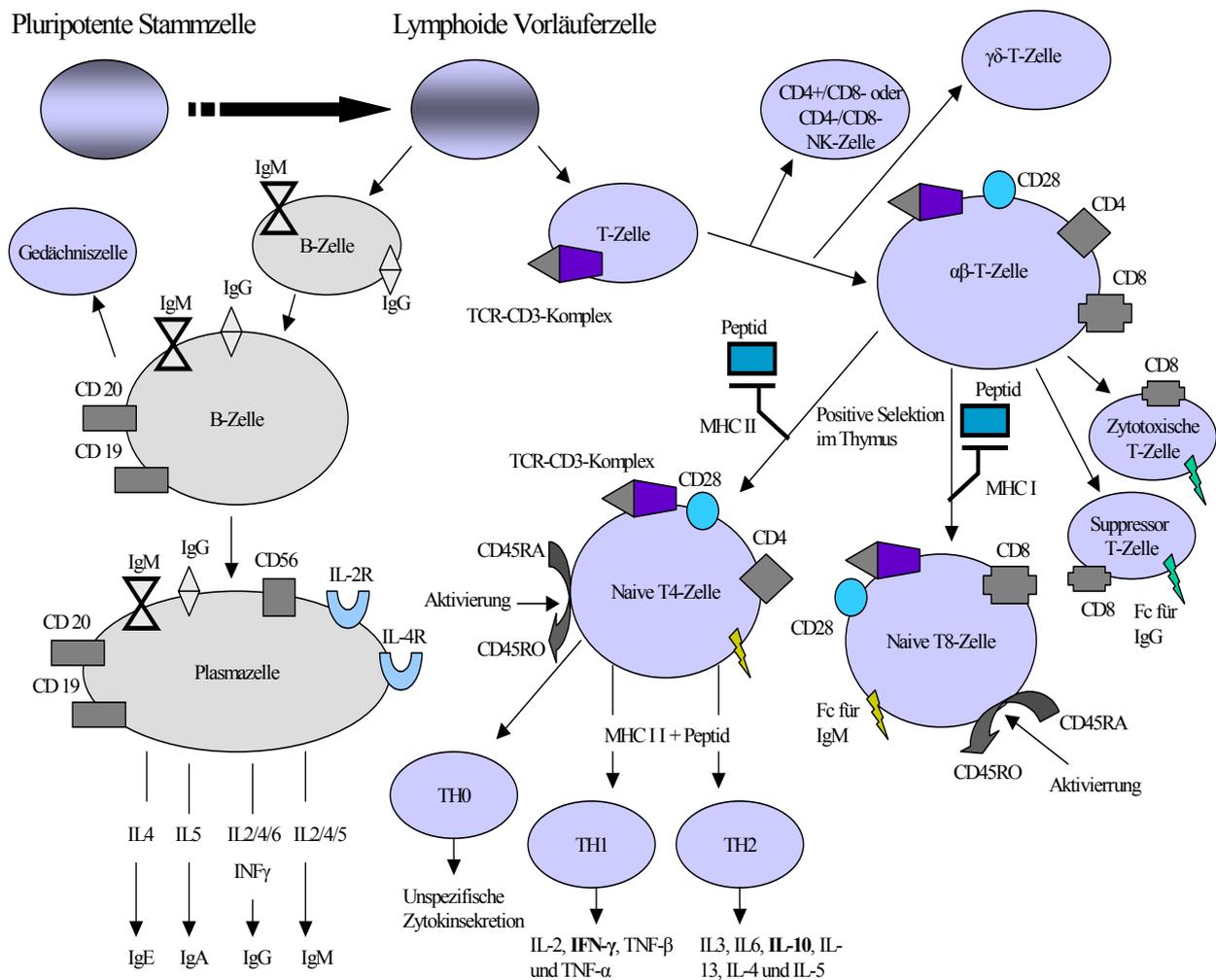


Abbildung 1: Übersicht der T- und B-Zell-Reifung mit Einordnung der wichtigsten in dieser Arbeit untersuchten Parameter des adaptiven Immunsystems.

TH0-Zellen: Erstmalige oder kurzfristige Stimulation von T4-Zellen führt zur Ausschüttung einer breiten Palette von Zytokinen

TH1-Zellen: Wiederholte bzw. chronische Stimulation von T4-Zellen mit starker Affinität zu TCR/MHC II führt zu einer Sekretion von IL2, IFN $\gamma$ , TNF $\beta$  und TNF $\alpha$

TH2-Zellen: Eine schwache Affinität mit dem TCR führt zur Sekretion von IL3 bis IL6, IL10 und IL13

Die Aufgabe der B-Lymphozyten als Funktionseinheit der humoralen Immunantwort ist die Produktion und Sekretion von antigenspezifischen Antikörpern, wobei die Entwicklung der B-Lymphozyten zunächst antigenunabhängig im Knochenmark erfolgt. Die für die Antigenerkennung notwendigen Rezeptormoleküle werden dort durch Rekombination variabler Domäne und im Verlauf durch Basenaustausch bei Antigenkontakt vielfältig gebildet.

Die wichtigsten nur auf B-Zellen vorhandenen Oberflächenmoleküle sind CD19 und CD20, welche bei einer Aktivierung phosphoryliert werden und eher eine kostimulierende Funktion ausüben. Die sich aus aktivierten B-Zellen entwickelnden reifen, immunoglobulinproduzierenden Plasmazellen sind während ihrer zwei- bis dreitägigen Lebenszeit in der Regel gewebeständig und zirkulieren im Gegensatz zu ihren sezernierten Antikörpern nicht im Blut.

### **2.3 Abwehrmechanismen des Gastrointestinaltraktes**

Der Gastrointestinaltrakt (GIT) eines gesunden Menschen ist ein offenes System bestehend aus der physiologischen Darmflora und dem Magen-Darm-Trakt als ihren Lebensraum. Insgesamt beherbergt der menschliche GIT 10x mehr eukaryote Zellen als der gesamte übrige menschliche Körper [153, 16]. Bis zu 500 verschiedene Bakterienarten konnten bei Untersuchungen von Stuhlproben identifiziert werden, wobei allein 30-40 Arten 99% der Gesamtmenge ausmachen [169, 51, 171, 179]. In einem Verhältnis von 100:1 bis 1000:1 dominieren Bakterien mit anaeroben Stoffwechsel wie Bacteroides, Bifidobacterium, Clostridien, Enterococcus, Enterobacter, Escherichia, Lactobacillus, Peptostreptococcus und Klebsiella [76, 170, 189]. Die im GIT konstant vorkommenden Bakterienarten sind essentiell für die Bereitstellung von Energieressourcen. 50% des täglichen Energiebedarfs der Dickdarmzellen werden allein beim Abbau von Kohlenhydraten durch die physiologische Darmflora abgedeckt. Zudem synthetisieren einige Mikroorganismen Vitamin K bzw. E und fördern die intestinale Resorption von Elektrolyten [179].

Eine weitere wichtige Funktion der intestinalen Mikroben ist die Hemmung der Kolonisation von obligat, pathogenen und opportunistisch, pathogenen Keimen. Durch Sekretion von wachstumsinhibierenden Komponenten und durch das Konkurrieren um Bindungsstellen und Nährstoffe können die intestinalen Mikroben die Ansiedlung, das Wachstum und die Vermehrung von pathogenen Keimen erschweren oder verhindern. Zudem leisten die intestinalen Mikroben durch eine kontinuierliche Stimulation des gastrointestinalen Immunsystems einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung und Aufrechterhaltung des darmassoziierten Immunsystems, welches funktionell eng mit den Schleimhäuten von Respirationstrakt, Urogenitaltrakt und Milchdrüse verbunden ist. Durch diese enge Verknüpfung wird z.B. die Antikörperübertragung von der Mutter zum Kind über die Milchdrüse gewährleistet [25]. Epidemiologische Daten suggerieren zudem, dass das Ernährungsverhalten



In unserer Gesellschaft nimmt jeder Mensch bis zu 2 kg Nahrung täglich zu sich. Die intestinale Schleimhaut muss hiervon auf einer Kontaktfläche von ca. 200-400 qm pathogene Bestandteile herausfiltern und vernichten [41, 16]. Zu diesem Zweck haben sich im Verlaufe der Evolution lokale immunabhängige und immununabhängige Abwehrmechanismen herausgebildet

Zu den immununabhängigen Mechanismen zählen die physiologischen Mikroben des Magen- und Darmtraktes, Enzyme, Proteasen, die Mukosa selbst und die gastrointestinale Motilität [41, 186, 162]. Die Mukosa wird von Epithelzellen gebildet, die durch „tight junctions“ eng miteinander verknüpft sind und so als eine rein physikalische Barriere zwischen luminalen und extraintestinalen Raum anzusehen ist. Den Epithelzellen aufgelagert ist eine maximal 450 µm dicke Schleimschicht, die Bestandteile im Lumen des GIT von der Epithelschicht fern hält. Intraluminal werden eine Vielzahl von Antigenen von immununabhängigen Faktoren vernichtet, wie z.B. durch Säuren und proteolytischen Enzymen. Rund 10 Liter Flüssigkeit werden deshalb von Speicheldrüsen, Magen, Galle und Pankreas täglich sezerniert. Die gastrointestinale Peristaltik reduziert zusätzlich die Kontaktzeit der Nahrungsbestandteile mit der Schleimhaut [49]. Gelingt einem Antigen die Bindung an eine Epithelzelle, macht die schnelle Replikationszeit der Epithelzellen von 3 bis 4 Tagen eine Kolonisation des Antigens fast unmöglich [16, 189].

Gegenüber den immununabhängigen Faktoren funktionieren die Mechanismen der immunabhängigen Abwehr in allen Schleimhäuten nach dem selben Grundprinzip. Das Immunsystem der Schleimhaut wird morphologisch als Schleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT = Mucosa-Associated Lymphoid Tissue) bezeichnet und den sekundären Lymphorganen zugeordnet. Prozentual nimmt das Immunsystem des Darmtraktes (GALT = Gut-Associated Lymphoid Tissue) mit einer Fläche von etwa 200 qm den größten Teil des MALT ein. Bis zu 80 % der gesamten Immunglobulin-produzierenden Zellen eines Individuums befinden sich im Darmtrakt [26]. Wichtige diffus in der Schleimhaut verteilte Bestandteile des GALT sind die Peyer-Plaques (Noduli lymphatici aggregate), die mesenterialen Lymphknoten, die intraepithelialen Lymphozyten und die immunkompetente Zellen [134] (Abbildung 2). Aktivierte B- und T-Zellen migrieren über die Lymphbahnen in die Lymphknoten und gelangen über den Ductus thoracicus in die Blutbahn. Über darmspezifische postkapilläre Venolen („High Endothelial Venule“, HEV) gelangen die aktivierten T- und B-Zellen in die Darmschleimhaut zurück. Diese Rezirkulation wird als „homing“

bezeichnet und durch spezielle Oberflächenrezeptoren der Lymphozyten und mukosale Adressine gewährleistet [57]. Erst nach Erreichen der Darmmukosa erfolgt die terminale Differenzierung der Immunozyten, d.h. die B-Zellen werden zu ortsständigen AK-produzierenden Plasmazellen und die weniger rezirkulierenden T-Zellen formen ihre unterschiedlichen Funktionen als T-Effektorzellen aus.

Überwindet ein Antigen die lokalen Barrieren kann es zu einer systemischen Infektion kommen. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff „Translokation“ eines Antigens geformt und erstmals im Rahmen von tierexperimentellen Untersuchungen um 1900 von Ford und Wolbach beschrieben [53, 192]. Heutzutage wird die Passage von Bakterien und/oder deren Produkte in sterile extraintestinale Bereiche als bakterielle Translokation bezeichnet [19]. Die drei wichtigsten Mechanismen, die zu einer Translokation führen sind: eine übermäßige Vermehrung intestinaler Bakterien, eine Permeabilitätssteigerung der intestinalen Mukosabarriere und vorhandene Immundefizite [124, 166, 27, 189]. Eine bakterielle Translokation gilt als sicher, wenn gastrointestinale Mikroben bzw. Bestandteile dieser in mesenterialen Lymphknoten oder nachgeschalteten lymphatischen Organen wie Milz, Leber, Niere oder Blut nachgewiesen werden.

Ein Ungleichgewicht zu Gunsten einer oder mehrerer Bakterienstämme kann z.B. mittels Antibiotikagabe oder Mangelernährung hervorgerufen werden [104, 18, 189]. Funktionsstörungen der tight junctions und/oder ein vermehrter Verlust von Epithelzellen in einem bestimmten Schleimhautareal führen zu einer Permeabilitätssteigerung [93, 67]. Die Porengröße der tight junctions liegt bei einem Durchmesser von ca. 5 nm, d.h. nur kleinere Makromoleküle oder Polypeptide aus max. 11 Aminosäuren können unter physiologischen Bedingungen parazellulär penetrieren [10]. Der Zusammenhang einer erhöhten Porengröße mit verschiedenen Krankheitsbildern konnte in einigen Studien nachgewiesen werden [40, 22, 127, 95]. Ein weiterer sich negativ auf die Permeabilität auswirkender Aspekt ist ein verlangsamter Blutfluss, wie er z.B. bei einem hämorrhagischen Schock zu beobachten ist [107, 45, 104, 105, 189, 70].

Das Risiko einer Translokation steigt bei Zusammentreffen verschiedener negativer Einflüsse. So wurde in einem Tiermodell beobachtet, dass die höchste Inzidenz einer Translokation bei E. coli-infizierten Ratten nach Verbrennungen von 40% und zusätzlicher Gabe von Penicillin auftrat [43]. Bei gesunden Individuen wurde bisher keine bakterielle Translokation nachgewiesen [17, 67, 27, 143, 87, 44].

In einer Studie von Spindler-Vesel an über 100 Traumapatienten konnte erst nach 7 Tagen Behandlung mit Synbiotic2000® eine Reduktion der intestinalen Permeabilität beobachtet werden [164]. Einen klinischen Zusammenhang zwischen einer präoperativ nachgewiesenen gesteigerten Permeabilität und der Entwicklung einer Sepsis nach großen abdominalen Operationen konnte Kanwar et al. allerdings nicht bestätigen [81]. Zudem wies Kennedy et al. in einer tierexperimentellen Studie eine gesteigerte Permeabilität bei induzierter Kolitis nach, konnte jedoch keine Verringerung der Permeabilität durch Administration von *L. plantarum* 299 in Kombination mit oder durch alleinige Gabe von Haferfasern feststellen [83].

## **2.4 Fragestellung**

Diese an 33 Patienten durchgeführte prospektive, randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie soll klären, ob der Zusatz von Synbiotika zu einer perioperativen enteralen Ernährung bei Patienten mit großen abdominalchirurgischen Eingriffen das Immunsystem beeinflusst. Zu diesem Zweck erhielten die Verumgruppe eine Mixtur aus lebenden Milchsäurebakterien plus Präbiotika und die Placebogruppe nur Präbiotika. An vier Messtagen wurden die frisch entnommenen Blutproben laborchemisch aufgearbeitet und ausgewählte Parameter des Immunsystems anhand standardisierter Messverfahren untersucht.

Zu den Parametern gehören die Leukozyten und einige ihrer Subpopulationen wie B- und T-Lymphozyten, ausgewählte Aktivierungsmarker, die Konzentrationen von Interleukin- 10, -12 sowie Interferon- $\gamma$  und IgA im Serum.

Folgende Fragen werden in dieser Arbeit diskutiert:

1. Beeinflussen enteral aufgenommene Synbiotika die Konzentration von CD4- und CD8-positiven T-Zellen?
2. Kann die enterale Aufnahme von Synbiotika die T-Zell-Subpopulationen CD45RO und CD45RA in ihrem Verhältnis zueinander beeinträchtigen?
3. Führt die enterale Einnahme von Synbiotika zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten gemessen an den Aktivierungsmarkern CD25 und HLA-DR?
4. Wie verhalten sich die Transmitterstoffe IL-10, IL-12 und Interferon- $\gamma$  während des Untersuchungszeitraumes?
5. Welchen Einfluss hat die perioperative Gabe von Synbiotika auf die IgA-Konzentration im Serum?

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Patientenkollektiv**

In dem Zeitraum von Juni 2001 bis April 2002 wurden 40 Patienten der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité, Campus-Virchow Klinikum in diese von der Ethikkommission genehmigten Studie eingeschlossen. Die Aufteilung des rekrutierten Patientenkollektives erfolgte bei Erfüllung der Einschlusskriterien randomisiert in die Gruppe A (Verum) und Gruppe B (Placebo) mit jeweils 20 Probanden. Perioperativ erhielten 3 Patienten aus der Gruppe A und 4 Patienten aus der Gruppe B keinen periduralen Dauerkatheter (PDK). Diese 7 Patienten wurden aus der Studie ausgeschlossen. Es verblieb somit ein verwertbares Patientenkollektiv von 33.

#### **3.1.1 Einschlusskriterien**

- ◆ Mindestalter 18 Jahre
- ◆ Schriftliche Einwilligung des Patienten zur Teilnahme an dieser Studie
- ◆ Erkrankung: chronische Pankreatitis, Pankreaskopf- o. Gallengangskarzinom
- ◆ Therapie: Operation nach Whipple oder PPPD
- ◆ Anästhesie: ITN und Periduralkatheter

#### **3.1.2 Ausschlusskriterien**

- ◆ Patienten mit dekompensierter Niereninsuffizienz / dialysepflichtige Patienten
- ◆ Patienten mit manifestem Ileus
- ◆ Patienten mit Bewusstseinsstörungen und Aspirationsgefahr
- ◆ Patienten mit manifester systemischer Infektion, die die enterale Resorption beeinträchtigen könnte
- ◆ Schwangere und stillende Patientinnen

#### **3.1.3 Abbruchkriterien**

- ◆ Anastomoseninsuffizienz oder Manifester Ileus
- ◆ Schwerwiegende unerwünschte perioperative Ereignisse (Sepsis, Ileus)
- ◆ Unterbrechung der Studienernährung
- ◆ Auf Wunsch des Patienten, Widerruf der Einverständniserklärung

## 3.2 Erkrankungen, Operationen und Anästhesie

### 3.2.1 Pankreaskarzinom

Das Pankreaskopfkarzinom tritt mit einer Inzidenz von 10 Fällen pro 100 000 Einwohner pro Jahr auf und ist nach dem Kolon- und Magenkarzinom der dritthäufigste Tumor des Verdauungstraktes. Betroffen sind meist Männer im Alter zwischen 40 und 60 Jahren ( $\text{♂}:\text{♀} = 1,5:1$ ), bei denen eine chronische Pankreatitis, ein chronischer Nikotin- und/oder Alkoholabusus vorliegen. Zu 80-90% handelt es sich um ein duktales Karzinom, das am häufigsten vom Drüsengewebe ausgeht und in 70% der Fälle im Pankreaskopf lokalisiert ist. Bei Diagnosestellung sind aufgrund der Lokalisation und des fortgeschrittenen Stadiums noch ca. 20% der Tumore in toto resezierbar. Als Therapie der Wahl ist die klassische Operation nach Whipple oder die PPPD (Pylorus-Preserving Pancreaticoduodenectomy, pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie) indiziert. Trotz Resektion hat das Pankreaskarzinom mit einer 5 Jahres Überlebensrate von 5% eine schlechte Prognose. Wird der Tumor im Stadium  $T_1N_0M_0$  reseziert, liegt die Überlebenschance für 5 Jahre bei 30%.

### 3.2.2 Chronische Pankreatitis

Mit einer Inzidenz von 8 pro 100 000 Einwohnern sind die Neuerkrankungen einer chronischen Pankreatitis mit denen des Pankreaskopfkarzinoms zu vergleichen. Auch hier sind Männer häufiger betroffen als Frauen. Eine chronische Pankreatitis entwickelt sich meist aus einer nicht oder nur unzureichend behandelten akuten Pankreatitis, wobei bis zu 80% mit einem chronischen Alkoholkonsum assoziiert sind. Das initiale Hauptsymptom sind Schmerzen. Im Verlauf kommt es aufgrund einer Pankreasinsuffizienz zu einem vermehrten Ausscheiden von Fett und Eiweißen über den Stuhl. Dies wiederum geht mit Gewichtsverlust und Verdauungsstörungen einher. Falls durch Nahrungsumstellungen, Analgetika und oral verabreichten Pankreasenzymen keine Besserung erreicht werden kann, ist eine chirurgische Intervention nicht zu umgehen. Zunächst stehen drainierende Verfahren im Vordergrund. Sollte sich hieraus keine Heilung ergeben, sind die Operation nach Kausch und Whipple oder eine PPPD die Therapieverfahren der 1. Wahl.

### 3.2.3 Klassische Operation nach Kausch und Whipple

Walter Kausch berichtete 1912 unter dem Titel „Das Karzinom der Papilla duodeni und seine radikale Entfernung“ über eine erfolgreich durchgeführte Pankreatikoduodenektomie. Im Verlauf wurde die Operation nur in Einzelfällen durchgeführt, da sie mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate verbunden war. Im Jahre 1935 optimierte Allen O. Whipple dieses Verfahren und senkte mit seiner Methode die Morbiditäts- und Mortalitätsrate. Der „klassische Whipple“ hat sich seither als Standardoperation beim Pankreaskopfkarzinom bewährt.

Die Operation besteht aus einer kompletten Entfernung des Pankreaskopfes, des Duodenums und der Gallenblase einschließlich des distalen Ductus choledochus. Weiterhin werden die distale Hälfte bzw. das distale Zweidrittel des Magens mit dem rechtsseitigen Omentum majus, den peripankreatischen Lymphknoten und den Lymphknoten im Bereich des Ligamentum hepatoduodenale entfernt.

### 3.2.4 Pyloruserhaltende partielle Duodenopankreatektomie

Die PPPD ist eine Weiterentwicklung der klassischen Kausch-Whipple-Operation und wurde erstmals von Kenneth Watson 1942 durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird durch den Erhalt der Magenintegrität und der Pylorusfunktion die Inzidenz von postoperativen jejunalen Ulzerationen reduziert. Gegenüber der klassischen Whipple-Methode wurde so ein Vorteil für den Patienten geschaffen. Die PPPD gilt neben der klassischen Whippel-Operation als Standardverfahren bei einem Karzinom des Pankreaskopfes. Beide Operationsmethoden weisen hinsichtlich des Langzeitüberlebens statistisch keinen Unterschied auf.

### 3.2.5 Postoperative Periduralanästhesie

Für eine optimale postoperative Analgesie wird bei der Periduralanästhesie ein Lokalanästhetikum zwischen Dura mater und Ligamentum flavum mit Hilfe eines periduralen Katheters in den Epiduralraum appliziert. Die Anlage eines PDK erfolgte nach den Leitlinien der Klinik für Anästhesiologie und operativen Intensivmedizin der Charité. Hierbei wurde kurz vor Beendigung der Intubationsnarkose 5 ml Ropivacain 0,75% (Naropin®) und 50 µg Sulfentanil (Sufenta mite®) in NaCl 0,9 % gelöst über den PDK verabreicht. Die weitere Analgesie erfolgte über einen Perfusor schmerzadaptiert. Die maximale Dauer der Periduralanästhesie betrug 5 Tage.

### 3.3 Studienprotokoll

Alle für diese Untersuchung in Frage kommenden Patienten wurden zunächst über die Studie aufgeklärt und nach ihrer schriftlichen Einwilligung ab Juni 2001 in diese eingeschlossen. Die Randomisierung in die Gruppen A und B erfolgte mittels verschlossenem Umschlag durch eine unabhängige Mitarbeiterin der Abteilung für Chirurgie. Bis zum Ende der Ernährungsstudie am 30.04.2002 hatte nur diese Mitarbeiterin Kenntnis über den Randomisierungscode. Es handelte sich um eine randomisierte doppelt geblindete klinisch- experimentelle Interventionsstudie. Nach Erhebung einer ausführlichen Anamnese und Durchführung der klinischen Untersuchung wurden alle Patienten der ASA-Klassifikation zugeordnet.

Am Abend vor dem geplanten abdominal-chirurgischen Eingriff nahmen die Patienten in Tee oder Wasser gelöst einen Beutel des Gemisches A oder B zu sich. Dabei enthielt die Studiennahrung der Verumgruppe Präbiotika und lebende Milchsäurebakterien. Die Placebogruppe enthielt hingegen nur Präbiotika (Tabelle 1). Präoperativ erhielten die Patienten bei geplanter pankreatikojejunaler und biliodigestiver Anastomose sowie retrokolischer oder anterokolischer Gastroenterostomie zur Darmreinigung das Laxantium Bisocodyl (Prepacol®). Eine single-shot-Antibiose mit 1,5 g Cefuroxim (Zinacef®) und 0,5 g Metronidazol (Clont®) wurde kurz vor Hautschnitt intravenös injiziert. Danach wurden Antibiotika nur bei nachgewiesener bakterieller Infektion verabreicht.

Während der Operation wurde unter Sicht eine Jejunalsonde bis unterhalb des Treitzbandes gelegt, über die ab der ersten Stunde nach der Operation bis einschließlich dem 4. postoperativen Tag zweimal täglich ein Beutel Studiennahrung substituiert wurde. Die enterale Ernährung über die Ernährungssonde begann mit 25 ml/h Stresson (Frimmer Nutricia, Erlangen) pro Tag und wurde toleranzabhängig während der folgenden fünf Tage auf 1 ml/kg KG/h erhöht. Pro Liter enthielt die Sondennahrung 1250 kcal und war zusammengesetzt aus: 75 g Protein, 145 g Kohlenhydrate und 42 g Lipide. Die Entfernung der Sonde erfolgte nach der Blutentnahme frühestens am 4. postoperativen Tag. Am vierten oder spätestens am fünften postoperativen Tag wurde mit dem oralen Kostaufbau begonnen und der Flüssigkeitshaushalt bei klinischer Indikation durch kristalloide Lösungen ausgeglichen.

Probiotika	Präbiotika
Lactobacillus paracasei ssp paracasei F19	2,5 g Inulin
Lactobacillus plantarum 2362	2,5 g Pectin
Leuconostoc mesenteroides 32-77:1	2,5 g Betaglucan
Pediococcus pentosaceus 5-33:3	2,5 g Glukagon

Tabelle 1: Zusammensetzung der enteralen Studienkost

(Synbiotic®2000 Medipharm, Kageröd, Schweden und Des Moines, IA, USA).

Die verwendeten Mikroorganismen wurden hergestellt von „Belgian Coordinated Collection of Microorganisms“.

Die Blutentnahmen erfolgten am Morgen kurz vor dem operativen Eingriff und am Morgen des ersten, vierten und achten postoperativen Tages. Die entnommenen venösen Vollblutproben (2,7ml und 9ml EDTA-Monovetten) wurden unverzüglich auf Eis gelegt und innerhalb von 30 min verarbeitet.

### 3.4 Geräte

Gerät	Firma
Durchflusszytometer	FACScan®, Becton Dickinson, San Jose, USA
Computer	Power Macintosh G3, Apple Computer, Cupertino, USA
Inkubator	Inkubator/Shaker, Amersham Intern., Amersham, England
Mikrotiterplatten	Steril, Flachboden, Nunc GmbH Wiesbaden
Mikrotiterplatten- waschgerät	Mikrotiterplatten-Waschgerät, SLT Labinstruments 812 SW 1, Straßburg, Frankreich
Photometer	MR5000®, Dynatech, Billingshurst, England
Pipetten	Eppendorfpipetten, Eppendorf, Hamburg Serologische Pipetten, Becton Dickinson, Heidelberg Mehrkanalpipetten, Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reagenzgläser	Polystyrol, Becton Dickinson, Heidelberg Polypropylen Röhrchen, Sarstedt, Nümbrecht
Vortex	Vortex Genie2, Scientific Industries, Bohemia, USA
Zellzähler	Cell-Dyn 1600®, Abbott Diagnostics, Abbott Park, USA
Zentrifuge	Megafuge® 1.0R., Heraeus Instruments, Berlin

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte und der entsprechenden Hersteller

### 3.5 Monoklonale Antikörper

Bei allen in der unteren Tabelle aufgeführten Antikörpern handelt es sich um monoklonale Antikörper der Maus, hergestellt von Becton Dickinson (Heidelberg).

Probe	Antikörperpaar	Markierung / Immunglobinklasse und Verdünnung	Spezifität
1	Simultantest® CD45/CD14	IgG1-FITC/IgG2a-PE 1 : 2	Leukozyten, Monozyten
2	Simultantest® CD3/CD4	IgG1-FITC/IgG1-PE 1 : 10	T-Helfer-Zellen TH2-Zellen
3	Simultantest® CD3/CD8	IgG1-FITC/IgG1-PE 1 : 10	Supressor/ Zyto- toxische T-Zellen
4	Simultantest® CD3/CD19	IgG1-FITC/IgG1-PE 1 : 10	B- und T- Lymphozyten
5	Simultantest® CD3/CD16+56	IgG1-FITC/IgG1+IgG1- PE 1 : 2	Natürliche Killer Zellen
6	Simultantest® CD8/CD38	IgG1-FITC/IgG1-PE 1 : 4	Aktivierte T-Lymphozyten
7	CD25	IgG1-FITC 1 : 20	Aktivierte
	CD3	IgG1-PE 1 : 4	T-Lymphozyten
8	TCR $\gamma\delta$	IgG1-FITC 1 : 20	$\gamma\delta$ -T-Zellen
	CD3	IgG1-PE 1 : 5	
9	CD4	IgG1-FITC 1 : 4	
	CD45RA	IgG2a-PE 1 : 4	Naive T4-Zellen
	CD45RO	PerCP 1 : 8	Gedächtniszellen
10	CD8	IgG1-FITC 1 : 4	
	CD45RA	IgG2a-PE 1 : 4	Naive T8-Zellen
	CD45RO	PerCP 1 : 8	Gedächtniszellen

Tabelle 3:

FITC = Flurescein-Isothiacyanat (maximale Emission  $EM_{max} = 530nm$ )

PE = Phycoerythrin ( $EM_{max} = 575nm$ )

PerCP = Peridinin-Chlorophyll-A ( $EM_{max} = 680nm$ )

## 3.6 Durchflusszytometrische Analyse

### 3.6.1 Vorbereitung der Blutproben

Vor der eigentlichen Verarbeitung der EDTA-Vollblutproben wurde die absolute Leukozytenzahl in 1/nl mittels Zellzähler (Cell Dyn®1600) bestimmt. Anschließend erfolgte die Präparation der Blutproben wie folgt:

Von den gewonnen 3 ml EDTA-Vollblut wurden je 100 µl in jeweils 11 verschiedene Reagenzgläser (5 ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 12 mm x 75 mm) pipettiert, mit je 20 µl spezifischer monoklonaler Antikörperpaare (Tabelle 3) versetzt und nach gründlicher Durchmischung mittels Vortex bei 4°C für 20 min inkubiert. Im Anschluss wurden 2 ml einer 10fach verdünnten Rob-Lyse (80,2 g NH<sub>4</sub>Cl+8,4 g NaHCO<sub>3</sub>+3,7 g Na<sub>2</sub>EDTA) auf einen Liter destilliertem Wasser (Becton Dickinson, Heidelberg) hinzugegeben, erneut kurz durchmischt und bei Raumtemperatur und Dunkelheit für 10 min inkubiert. Die Proben wurden dann abermals für 5 min mit 1200 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Satz mit jeweils 3 ml Waschlösung (Cell wash®, Becton Dickinson, Heidelberg) versetzt. Nach erneuter Durchmischung wurde die Probe 5 min mit 1200 U/min zentrifugiert, dekantiert und mit 500 µl Waschlösung vermischt. Mit einer letzten Durchmischung waren die Blutproben für die durchflusszytometrische Analyse präpariert.

### 3.6.2 Prinzip der Oberflächenantigenbestimmung

Bei der Durchflusszytometrie werden Lichtstreuung und Fluoreszenzeigenschaften von Zellen bestimmt, die in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. Die Fluoreszenz beschreibt die Emission von Licht durch eine Substanz, die durch kürzerwelliges Licht (Anregungslicht) angeregt wurde.

Die Messung der Lichtstreuung ermöglicht die Bestimmung von Größe und Granularität einer Zelle. Dabei passieren die Zellen einzeln einen Argon-Ionen-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm. Bei diesem Vorgang absorbieren und reflektieren die Zellen das einfallende Licht je nach Größe und Granularität in einer bestimmten Menge. Diese Lichtabsorption wird durch Messung der Lichtstreuung in Vorwärtsrichtung (Aufwärtsstreulicht, engl. „forward scatter“, FSC) abgeleitet und gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gemessene Seitwärtsstreulicht (Orthogonalstreulicht, engl. „side scatter“, SSC) kennzeichnet die Lichtreflektion und ist ein Maß für die optische Dichte bzw. für die Granularität einer Zelle. Werden die erfassten Streulichtsignale in einem

Diagramm (SSC über FSC) dargestellt, erscheinen die einzelnen Zellpopulationen ähnlicher Größe und Granularität in Form von Punktwolken.

Zur Untersuchung der Fluoreszenzeigenschaften der Zellen werden diese mit Antikörpern (Tabelle 3) beladen, die mit einem fluoreszierenden Farbstoff (z.B. Fluorescein-Isothiocyanat und/oder Phycoerythrin) gekoppelt und spezifisch für Zelloberflächenmarker (z.B. CD-Moleküle) sind. Der an den Oberflächenrezeptor gebundene Farbstoff wird durch das kürzerwellige Licht des Argon-Ionen-Laserstrahls angeregt und fluoresziert. Hierbei korreliert die vom Durchflusszytometer registrierte Stärke des emittierten Lichtes (Fluoreszenz) mit der Dichte der Oberflächenrezeptoren.

### 3.6.3 Messprotokoll der durchflusszytometrischen Bestimmung

Zunächst wurde ein Differentialblutbild erstellt, um den prozentualen Lymphozytenanteil in der Leukozytenpopulation zu ermitteln. Hierzu wurde die Probe 1 im Durchflusszytometer analysiert und mit Hilfe der CellQuest® Software des Power Macintosh G3 (Apple Computer) wie folgt ausgewertet:

Das in der Abbildung 3A dargestellte Diagramm zeigt die ungefilterten Bestandteile des Differentialblutbildes mit allen CD14- und CD45- positiven Zellen.

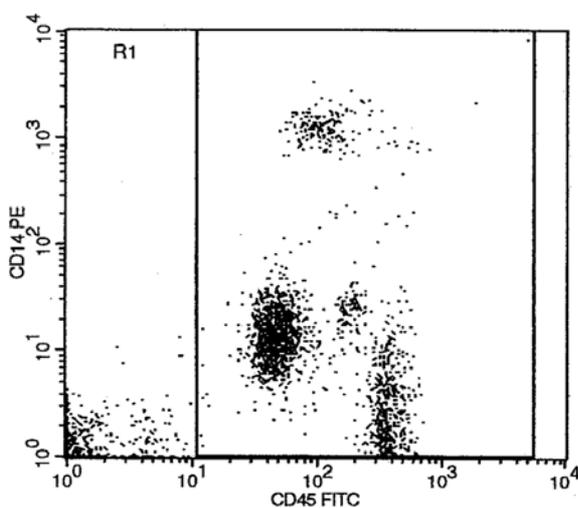


Abbildung 3A: Darstellung der ungefilterten CD45- und CD14-positiven Zellen

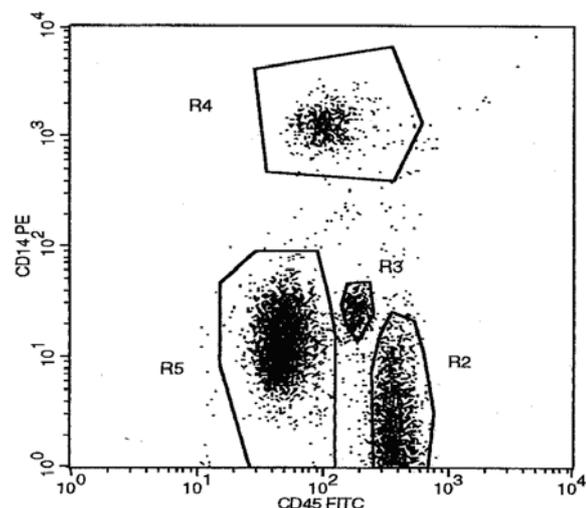


Abbildung 3B: Darstellung der gefilterten CD45- und CD14-positiven Zellen

x-Achse mit CD45- und y-Achse mit CD14-positiven Lymphozyten. Die Achsenskalierung ist logarithmisch. CD14 ist ein Rezeptorprotein, welches Lipopolysaccharide (LPS) bindet und auf Makrophagen, Monozyten und myelomonozytischen Zellen ist. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase und Bestandteil hämatopoetischer Zellen.

Die im linken Bildrand gesichteten unspezifischen Fluoreszenzen (z.B. von Erythrozytenbestandteilen) wurden durch Setzen eines Softwarefensters R1 (Software - Fenster = „Gate“) ausgeblendet und die verbliebenen Zellen in ein anderes Diagramm übertragen (Abbildung 3B). Die einzelnen Zellpopulationen wurden anschließend mittels „Gating“ von R2, R3, R4 und R5 erfasst und ihr prozentualer Anteil berechnet. Die Zellen in R2 sind die für diese Studie interessanten Lymphozyten und wurden in einem neuen Diagramm dargestellt (Abbildung 4).

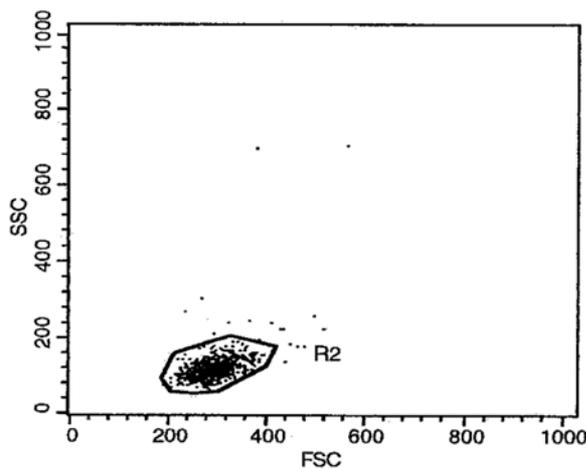


Abbildung 4:  
Darstellung der ausgewählten Zellen  
von Gate R2 der Abbildung 3B  
X-Achse: FSC  
y-Achse: SSC

Zur genaueren Abgrenzung gegenüber Zellen mit ähnlichen strukturellen Eigenschaften wurde das Gate R2 manuell so verkleinert, dass mindestens 90% der ursprünglichen Zellen darin vorhanden waren. Die in R2 dargestellten Lymphozyten wurden 100% gesetzt und bildeten so die Grundlage für die Analyse und Berechnung der lymphozytären Subpopulationen der Proben 2 bis 10.

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Proben 2 bis 10 zur Identifizierung der Lymphozytensubpopulationen erfolgte nach dem gleichen Prinzip, so dass die Bestimmung der CD8-positiven T-Zellen im Folgenden beispielhaft beschrieben wird. Grundlage für die analytischen Bestimmungen ist die Kenntnis der spezifischen Oberflächenmarker der verschiedenen Subpopulationen. T8-Zellen tragen z.B. auf ihrer Oberfläche die Rezeptoren CD3 und CD8.

Die Messung der Probe 3 ergab das in Abbildung 5 dargestellte Diagramm, worin im oberen rechten Quadranten die CD3- und CD8-positiven T-Zellen befindlich sind. Der prozentuale Anteil dieser Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation konnte durch erneutes Gatten wie bei R2 berechnet werden.

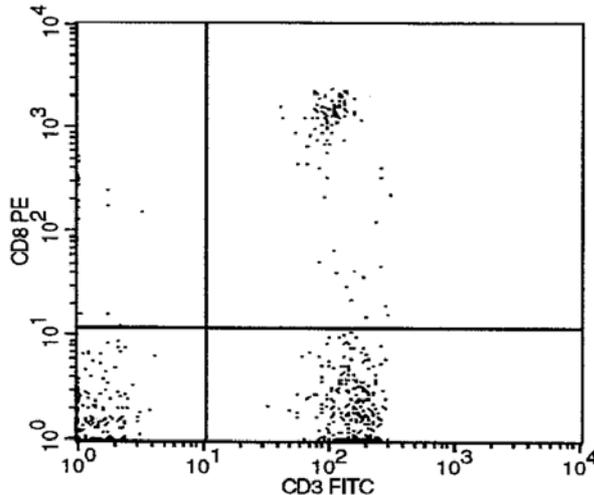


Abbildung 5:  
Darstellung der CD3- und CD8-  
positiven Lymphozyten im rechten  
oberen Quadranten.  
Achsenkalierung ist logarithmisch.  
X-Achse: CD3 FITC  
y-Achse: CD8 PE

Durch Einteilung in Quadranten kann jede Zelle einem Quadranten zugeordnet werden:

Quadrant unten links: CD3- und CD8-positive T-Zellen

Quadrant unten rechts: CD3-positive und CD8-negative T-Zellen

Quadrant oben rechts: CD3-positive und CD8-positive T-Zellen.

CD3-negative und CD8-positive Zellpopulation sind nicht bekannt.

### 3.7 Immunologische Bestimmung der Plasmazytokinspiegel

#### 3.7.1 Vorbereitung der Blutproben

Zur Bestimmung des Plasma-Zytokinspiegels entnehmen wir den Patienten 9 ml EDTA-Vollblut und zentrifugierten es innerhalb von 30 min bei 4°C mit 2000 U/min für 10 min. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und jeweils 300 µl in mindestens 7 Eppendorfröhrchen (Safe-Lock Eppendorf Tubes; 1,5 ml) gegeben. Diese wurden dann bis zum Messzeitpunkt bei -70°C gelagert.

#### 3.7.2 Prinzip der immunologischen Zytokinbestimmung

Zu der quantitativen Bestimmung des Zytokinspiegels wurde die Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay-Technik (ELISA-Technik) vom Sandwich-Typ angewandt. Grundlage dieser immunologischen Nachweismethode ist die Bindung eines enzymgekoppelten und eines unmarkierten Antikörpers an ein und dasselbe Antigen (AG) zu einem „Sandwich-Komplex“ (Abbildung 6). Mittels enzymatischer Farbreaktion wird das Antigen am Ende der Reaktion quantitativ bestimmt.

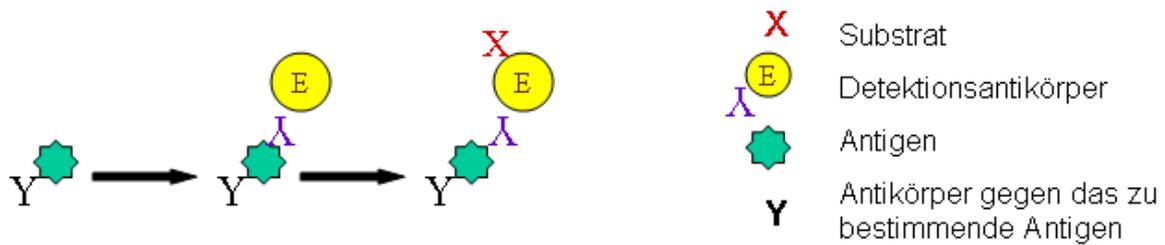


Abbildung 6: Darstellung des angewendeten ELISA-Verfahrens

Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexen mit Hilfe eines spezifischen enzymkonjugierten Antikörpers (Detektionsantikörper) und eines Färbereagens (Substrat).

In Vertiefungen einer eigens für ELISA entwickelten „96-well-Mikrotiterplatte“ werden Antikörper (AK), auch „coating-AK“ genannt, gegen das zu bestimmenden Antigen (AG) pipettiert. Das anschließend hinzugefügte Patientenserum mit den AG führt zur Bildung von AG-AK-Komplexen. Die überschüssigen AK werden durch mehrere Waschvorgänge entfernt. Ein enzymgekoppelter zweiter Antikörper (AK\*, Detektionsantikörper) bindet ebenfalls an das Antigen. Das AG ist zwischen den beiden Antikörpern wie in einem Sandwich eingeschlossen. Überschüssige Proteine werden erneut durch mehrere Waschvorgänge entfernt.

Das Enzym (z.B. horseradish peroxidase = HRP) des Detektionsantikörpers wandelt das im nächsten Schritt hinzugegebene Substrat in einen Farbstoff um. Die Menge des entstehenden Farbstoffes kann quantitativ photometrisch gemessen werden.

Zwischen Enzymaktivität bzw. Farbstoffmenge und Konzentration der AK-AG-AK\*-Komplexe besteht eine lineare Beziehung. Nach einem gewissen Zeitraum würde das Enzym den gesamten Farbstoff spalten, so dass alle Proben die gleiche optische Dichte aufweisen und eine Quantifizierung damit unmöglich wäre. Deshalb wird das Enzym bei Erreichen guter Kontraste zerstört. Im Falle von HRP geschieht dies mittels Oxalsäurelösung. Mit Hilfe einer Standardkurve (Eichkurve), die aus der optischen Dichte bekannter Konzentrationen einer Verdünnungsreihe gefertigt wurde, kann die unbekannte Serumkonzentration bestimmt werden.

### 3.7.3 Messprotokoll der immunologischen Zytokinbestimmung

#### Tag I

1. Auftauen des bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagerte Plasmas bei Raumtemperatur (RT)
2. Herstellung des ELISA-Kopplungspuffers („Coatingpuffer“ oder „Karbonpuffer“) bestehend aus: 0,1 M Karbon-Puffer aus 4,2 g  $\text{NaHCO}_3$  + 1,78 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 500 ml Aqua bidest mit  $\text{pH} = 9,5$
3. ELISA-Kopplungspuffer mit Capture-AK (ELISA sets) im Verhältnis 1:250 verdünnen und mittels Mehrkanalpipette 100 $\mu\text{l}$  der verdünnten Capture-AK in Vertiefungen einer ELISA-Platte geben und bei  $4^{\circ}\text{C}$  abgedeckt über Nacht inkubieren.

#### Tag II

1. Herstellung von PBS = Phosphat buffered Saline (PAA Laboratories, Linz, Österreich): 1 Liter PBS = 8 g NaCl + 1,16 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  + 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 0,2 g KCL
2. Herstellung des ELISA-Waschpuffers: 1 Liter PBS + 0,5 ml 0,05% Tween 20 (Sigma Chemical, St. Louis, USA) und des Blockingpuffers: 45 ml PBS und 5 ml 10% inaktives Fetalkälberserum (PAA Laboratories, Linz)
3. 3-maliges Waschen der ELISA-Platten mit 300  $\mu\text{l}$  ELISA-Waschpuffer pro well und Ausklopfen der ELISA-Platte
4. Hinzufügen von 200  $\mu\text{l}$  Blockingpuffer pro Well und bei RT und unter Schütteln 1h inkubieren
5. 3-maliges Waschen wie unter 3. beschrieben
6. Hinzufügen von 1ml destilliertem Wasser pro Well
7. Herstellung einer Standardreihe: 40  $\mu\text{l}$  des rekombinanten Zytokins mit 360  $\mu\text{l}$  Blockingpuffer verdünnen und mischen. 40  $\mu\text{l}$  von dieser Vorverdünnung in 1032  $\mu\text{l}$  Blockingpuffer pipettieren (höchste Standardkonzentration mit 500 pg/ml) und von insgesamt sieben Eppendorfhütchen das zweite bis siebte mit 300  $\mu\text{l}$  Blockingpuffer füllen. Anschließend in das erste und zweite 300  $\mu\text{l}$  Lösung der höchsten Standardkonzentration geben und vortexen. Dann 300  $\mu\text{l}$  des zweiten Eppendorfhütchens in das dritte pipettieren, danach 300  $\mu\text{l}$  des dritten Eppendorfhütchens in das vierte u.s.w. Auf diese Weise entstehen die

Standardlösungen mit Konzentrationen des rekombinanten Zytokins von 500; 250; 125; 62,5; 31,5; 15,6; und 7,8 pg/ml.

8. Je 100µl des aufgetauten Plasmas bzw. je 100µl der Standardlösungen in die Kavitäten der ELISA-Platte geben und 2 h bei RT inkubieren
9. Herstellen des Detektionsreagenzes: 24 µl Detektionsantikörpers und 48 µl Detektionsenzym mit 11,95 ml Blockingspuffer mischen (1:250)
10. 5-maliges Waschen wie unter 3. beschrieben
11. 100 µl Detektionsreagenz pro Well hinzugeben und 1 h bei RT und Dunkelheit inkubieren
12. Herstellung des Färbereagenzes = „Substrat solution“: 6 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 6 ml Tetramethylbenzidine (TMB-Set, Pharmingen, San Diego, USA) mischen
13. 7-maliges Waschen wie unter 3. beschrieben
14. 100 µl Färbereagenz in jedes Well hinzugeben und 30 min bei RT und Dunkelheit inkubieren
15. Enzymreaktion mit je 50 µl „Stop Solution“: 2%ige Oxalsäure: 27,47 ml 97% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 472 ml Aqua bidest (DeltaSelect, Pfullingen, Deutschland) pro Well stoppen.
16. Messung der Extinktion im Plattenphotometer bei 450 nm innerhalb von 30 min und Bestimmung der Zytokinkonzentration mit Hilfe der Eichkurve, die sich aus den Messungen der Standardlösungen ergibt.

ELISA-set	Capture Antikörper und Detektionsantikörper	Detektionsenzym	Standard
OptEIA™ Set Human IL-10	Anti-humanes IL-10	Streptavidin-HRP	Rekombinantes IL-10
OptEIA™ Set Human IL-12	Anti-humanes IL-12	Avidin-HRP	Rekombinantes IL-12
OptEIA™ Set IFN-γ	Anti-humanes IFN-γ	Avidin-HRP	Rekombinantes IFN-γ

Tabelle 4:

ELISA-set = BD OptEIA™ Set (Human Biosciences , San Diego, USA)

Der Detektionsantikörper ist die biotinylierte Form des zu bestimmenden Anti-humanen Zytokins.

### **3.8 Statistische Methoden**

Die statistischen Analysen erfolgten mittels Tabellenkalkulations-Programm Microsoft® Excel 2000 und dem Programmsystem SPSS Version 11 („Statistical Package for the Social Sciences“). Bei allen Berechnungen wurde ein statistisches Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt.

#### Epidemiologische Daten

Zunächst wurden die nominal skalierten Daten der Gruppen A und B mit dem Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ ) verglichen und so Häufigkeitsunterschiede festgestellt. Wiesen die Parameter eine Fallzahl kleiner 5 auf, wurden die Ergebnisse mittels exaktem Test nach Fisher berechnet. Bei den restlichen nicht normal verteilten Parametern wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt.

#### Immunologische Parameter

Die Berechnung der Daten im Gruppenvergleich erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Mit Hilfe des Friedman-Tests konnten genauere statistische Angaben zum Verlauf der Messwertreihen erhoben werden. Falls hier Signifikanzen auftraten, wurden diese mittels Wilcoxon-Rangsummen-Test genauer analysiert.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Epidemiologische Daten

Insgesamt beendeten 33 Patienten diese Studie, von denen der Verumgruppe 17 und der Placebogruppe 16 Probanden angehörten. In beiden Studiengruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich epidemiologischer Daten, wie Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht oder Krankenhausaufenthalt (Tabelle 5). Ebenfalls vergleichbar waren die Daten der Diagnosen, der Therapien und der postoperativen Komplikationen (Tabelle 6).

Epidemiologische Daten		Verum	Placebo	p
Geschlecht	♀	6	6	1,000 <sup>o</sup>
	♂	11	10	
Alter [Jahren]		59,65 ± 12,03	58,25 ± 13,67	0,69 <sup>a</sup>
Größe [m]		1,70 ± 0,26	1,74 ± 0,21	0,43 <sup>a</sup>
Gewicht [kg]		69,39 ± 2,46	64,72 ± 2,84	0,23 <sup>a</sup>
ICU-Tage [d]		3,59 ± 0,41	3,38 ± 0,33	0,88 <sup>a</sup>
Krankenhausaufenthalt [d]		28,00 ± 4,07	25,56 ± 3,45	0,73 <sup>a</sup>
OP-Zeit [d]		360,41 ± 13,28	346,25 ± 18,52	0,47 <sup>a</sup>

Tabelle 5: Epidemiologische Daten berechnet mit dem Mann-Whitney-U-Test<sup>a</sup> bzw. mittels exaktem Test nach Fisher<sup>o</sup>. Alle Werte sind als MW ± SEM angegeben.

Diagnose	Gruppe A	Gruppe B	p
Pankreaskarzinom	9	11	0,636 <sup>o</sup>
Chronische Pankreatitis	6	4	
Gallengangskarzinom	2	1	
Therapie			
PPPD	15	13	0,656 <sup>*</sup>
Whipple-OP	2	3	
Postoperative Infektionen			
Wundinfektionen	2	1	1,000 <sup>*</sup>
Harnwegsinfekt	1	1	1,000 <sup>*</sup>

Tabelle 6: Darstellung der spezifischen Risikofaktoren berechnet mit dem exakten Test nach Fisher oder nach dem Chi-Quadrat – Test.

Eine präoperative Abschätzung des Anästhesierisikos ermöglicht die Einteilung nach der ASA-Klassifikation (ASA = American Society of Anaesthesiologists). Da in dieser Klassifikation insbesondere Nebenerkrankungen berücksichtigt werden, ist sie zusätzlich ein grobes Maß für die Morbidität eines Patienten.

Die ASA – Schweregrade wurden wie folgt definiert:

- ◆ ASA 1: gesunder Patient ohne medizinische Probleme
- ◆ ASA 2: milde Systemerkrankung ohne Leistungsminderung
- ◆ ASA 3: ernste leistungsmindernde Systemerkrankung, Arbeitsfähigkeit
- ◆ ASA 4: schwere lebensbedrohliche Systemerkrankung
- ◆ ASA 5: morbider Patient, der voraussichtlich mit oder ohne Operation innerhalb der nächsten 24 Stunden versterben wird.
- ◆ ASA 6: hirntoter Patient oder Organspender

Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Nikotin- oder Alkoholabusus wurden protokolliert und die Daten mit dem exaktem Test nach Fisher auf statistische Unterschiede überprüft. In beiden Gruppen war das Auftreten von Risikofaktoren und die Zuordnung der ASA-Klassifikationen gleich verteilt (Tabelle 7).

ASA - Klassifikation	Gruppe A / Verum	Gruppe B / Placebo	p
1	1	1	0,642 °
2	8	10	0,465 a
3	8	5	
<b>Risikofaktoren</b>			
Diabetes mellitus	7	4	0,465*
Alkoholkonsum	5	3	0,688*
Nikotinabusus	7	4	0,465*

Tabelle 7: Darstellung möglicher Faktoren, angegeben in Absolutzahlen, welche das spezifische Immunsystems beeinflussen können. Die statistischen Ergebnisse wurden mittels exaktem Test nach Fisher (\*), Chi-Quadrat-Test (°) und Mann-Whitney-U-Test (a) berechnet.

## 4.2 Leukozyten und ihre Subpopulationen

### 4.2.1 Leukozyten

Am ersten Messtag und im Verlauf ergaben sich im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede der absoluten Leukozytenanzahlen ( $p > 0,05$ ).

Die Berechnungen mittels Wilcoxon-Test zeigten in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg vom präoperativen zum 1. postoperativen Tag (Placebo:  $p < 0,0001$ ; Verum:  $p = 0,005$ ). Im Gegensatz zur Verumgruppe war der Abfall der Leukozytenanzahl innerhalb der Placebogruppe zwischen den 1. und 4. postoperativen Tag signifikant ( $p = 0,01$ ).

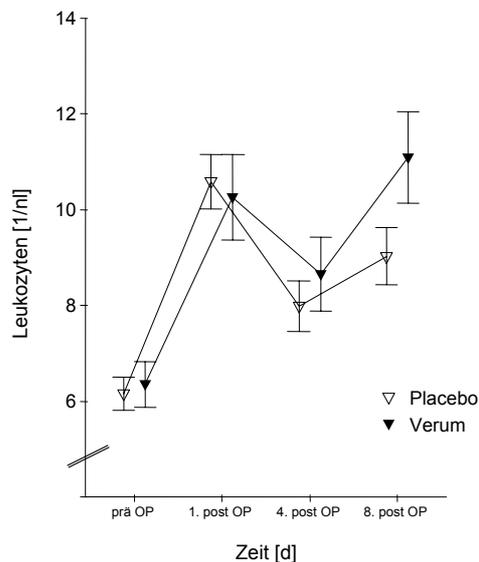


Abbildung 7:  
Darstellung der absoluten  
Leukozytenzahl  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen  
auf den Operationstag,  
y-Achse:  
Leukozytenzahl in 1/nl  
angeben als MW  $\pm$  SEM

## 4.2.2 Lymphozyten

Die absolute Anzahl der Lymphozyten und der prozentuale Anteil dieser an der Leukozytenpopulation waren im Gruppenvergleich an allen Messtagen nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ). Der prozentuale Anteil der Lymphozyten zeigte bei Berechnungen mittels Wilcoxon-Test innerhalb der Placebogruppe zwischen dem 1. und 4. postoperativen Tag einen signifikanten Anstieg ( $p = 0,01$ ). Mit dem signifikanten Abfall der absoluten Lymphozytenanzahl vom präoperativen zum 1. postoperativen Tag sank auch der prozentuale Anteil an der Leukozytenpopulation in diesem Zeitraum signifikant ( $p < 0,001$ ).

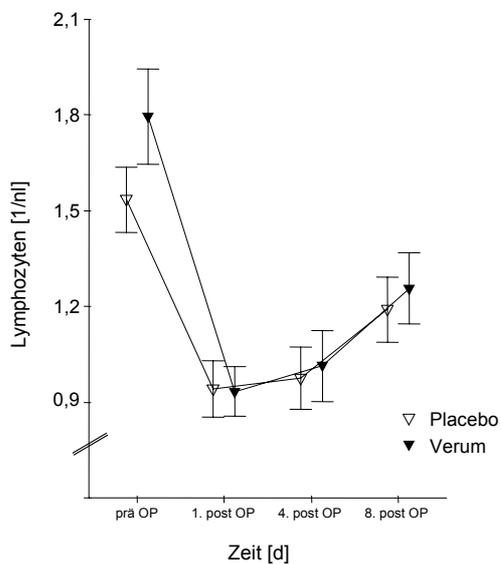


Abbildung 8:  
Darstellung der absoluten Lymphozytenanzahl  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag  
y-Achse:  
Lymphozytenzahl in 1/nl angeben als MW  $\pm$  SEM

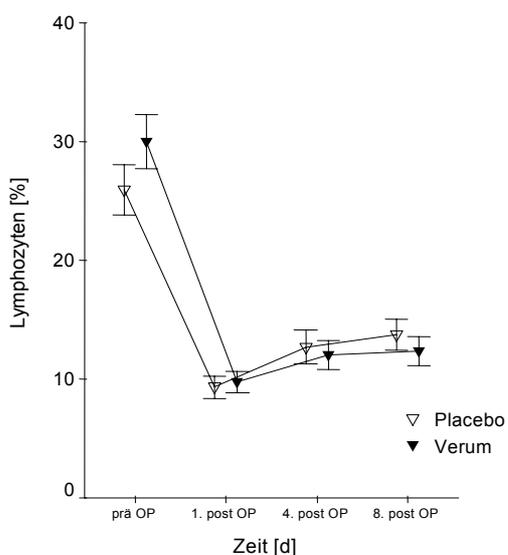


Abbildung 9:  
Darstellung des prozentualen Lymphozytenanteiles an der Leukozytenpopulation  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag  
y-Achse:  
Lymphozyten in % angeben als MW  $\pm$  SEM

### 4.2.3 B-Lymphozyten

Die absolute Anzahl der B-Lymphozyten und der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten waren im Gruppenvergleich an allen Messtagen nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ).

Im Wilcoxon-Test zeigte sich in der Verumgruppe ein signifikanter Abfall der absoluten B-Lymphozytenanzahl zwischen dem präoperativen und dem 1. postoperativen Tag ( $p = 0,02$ ). Der prozentuale Anteil der B-Lymphozyten hat in beiden Gruppen einen signifikanten Anstieg zwischen dem präoperativen und dem 1. postoperativen Tag (Placebo:  $p = 0,02$ ; Verum:  $p = 0,005$ ). Zudem war der Abfall des prozentualen Anteiles der B-Lymphozyten vom 1. bis zum 4. postoperativen Tag innerhalb der Placebogruppe signifikant ( $p = 0,04$ ).

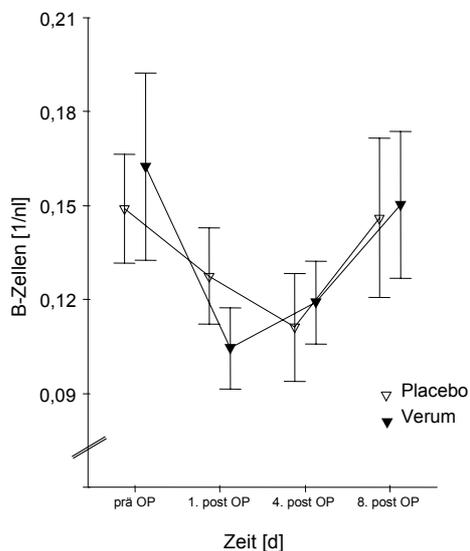


Abbildung 10:  
Darstellung der B-Lymphozytenzahl  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen  
auf den Operationstag  
y-Achse:  
Lymphozytenzahl in 1/ml  
angeben als MW  $\pm$  SEM

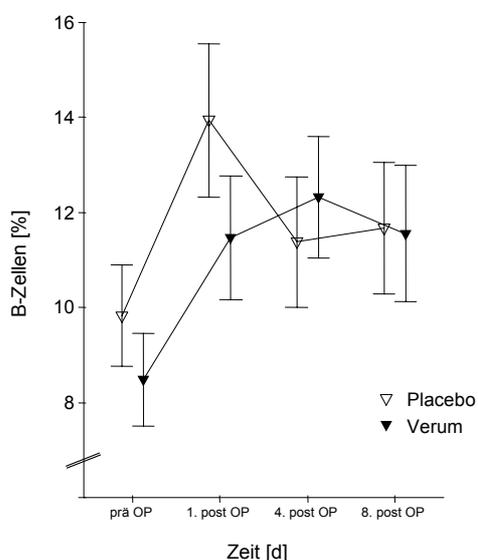


Abbildung 11:  
Darstellung des B-Lymphozytenanteiles  
an der gesamten Lymphozytenpopulation  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen  
auf den Operationstag  
y-Achse:  
B-Lymphozyten in %  
angeben als MW  $\pm$  SEM

#### 4.2.4 T-Lymphozyten

Die absolute Anzahl der T-Lymphozyten und der prozentuale Anteil an der Lymphozytenpopulation waren im Gruppenvergleich an allen Messtagen nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ). Mit dem signifikanten Abfall der absoluten T-Lymphozytenzahl beider Gruppen vom präoperativen zum 1. postoperativen Tag (Placebo  $p = 0,01$ ; Verum  $p < 0,001$ ) nahm auch der prozentuale Anteil der T-Zellen an der Leukozytenpopulation in beiden Gruppen ab, signifikant jedoch nur in der Placebogruppe ( $p = 0,045$ ).

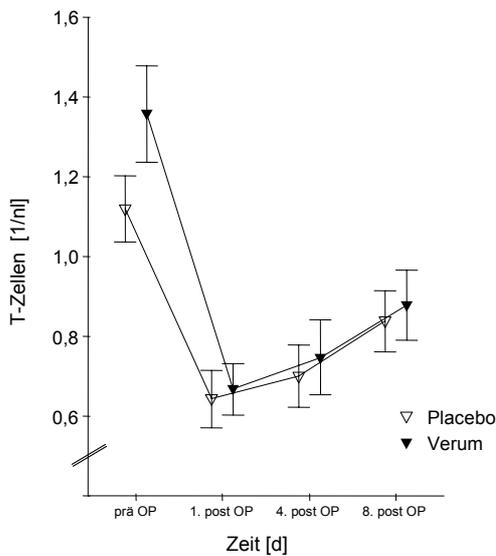


Abbildung 12:  
Darstellung der T-Lymphozytenzahl  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen auf  
den Operationstag  
y-Achse:  
Lymphozytenzahl in 1/nl angeben  
als MW  $\pm$  SEM

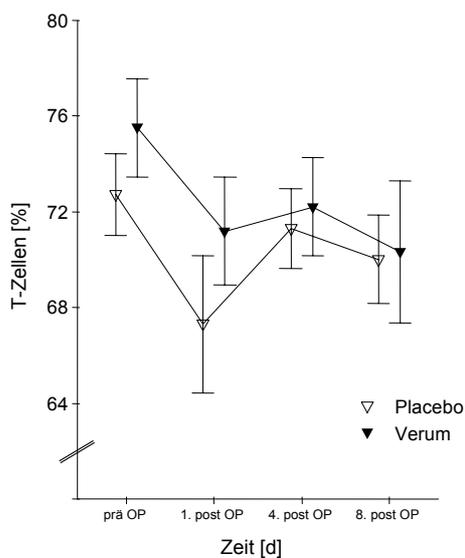


Abbildung 13:  
Darstellung des T-Lymphozytenanteils  
an der Lymphozytenpopulation  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen auf  
den Operationstag  
y-Achse:  
T-Lymphozyten in % angeben  
als MW  $\pm$  SEM

#### 4.2.5 CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten

Im Mann-Whitney-U-Test wurde das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  für beide Variablen nicht erreicht. Der prozentuale Anteil der CD4-positiven T-Zellen an der Lymphozytenpopulation fiel zwischen dem präoperativen und dem 1. postoperativen Tag stark ab, erreichte jedoch nur in der Verumgruppe Signifikanzniveau ( $p = 0,02$ ). Trotz fast gleicher Ausgangswerte verlief der prozentuale Anteil der T8-Zellen an der Lymphozytenpopulation vom 1. Messtag zum 1. postoperativen Tag gegenläufig mit einem nicht signifikanten Anstieg in der Verumgruppe und einem nicht signifikanten Abfall in der Placebogruppe. Ab dem 1. postoperativen Tag sank in beiden Gruppen der prozentuale Anteil kontinuierlich ab. Innerhalb der Verumgruppe war dieser Verlauf zwischen dem 1. und 4. ( $p = 0,005$ ) und zwischen den 1. und 8. postoperativen Tag signifikant ( $p = 0,005$ ).

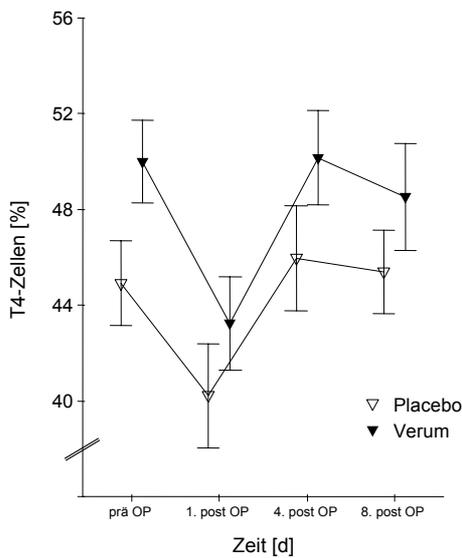


Abbildung 14:

Darstellung des prozentualen Anteiles der CD4-positive T-Lymphozyten an der gesamten Lymphozytenpopulation

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag

y-Achse:

T4-Lymphozyten in %

angeben als MW  $\pm$  SEM

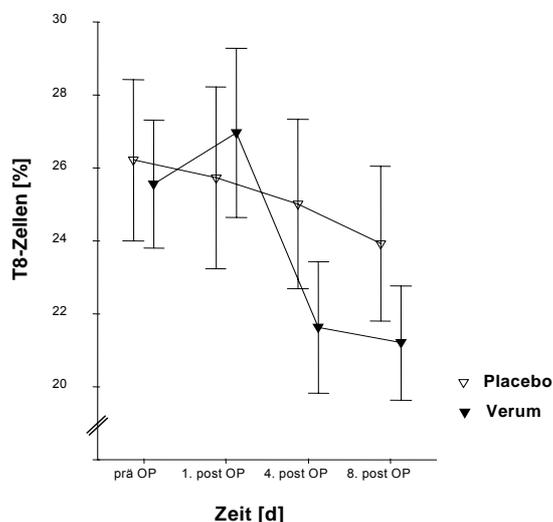


Abbildung 15:

Darstellung des prozentualen Anteiles der CD8-positive T-Lymphozyten an der gesamten Lymphozytenpopulation

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag

y-Achse:

T8-Lymphozyten in %

angeben als MW  $\pm$  SEM

#### 4.2.6 T4/T8-Ratio

Der Verlauf des T4/T8-Ratio war in beiden Gruppen annähernd parallel, so dass im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied ermittelt werden konnte.

Bei Anwendung des Wilcoxon-Tests waren der Anstieg zwischen dem 1. und 4. postoperativen Tag (Placebo:  $p = 0,05$ ; Verum:  $p = 0,01$ ) und der Verlauf zwischen dem 1. und 8. postoperativen Tag (Placebo:  $p = 0,02$ ; Verum:  $p = 0,005$ ) in beiden Gruppen signifikant. Zudem war der Abfall des T4/T8-Zell-Ratios vom präoperativen zum 1. postoperativen Tag in der Verumgruppe signifikant ( $p = 0,02$ ).

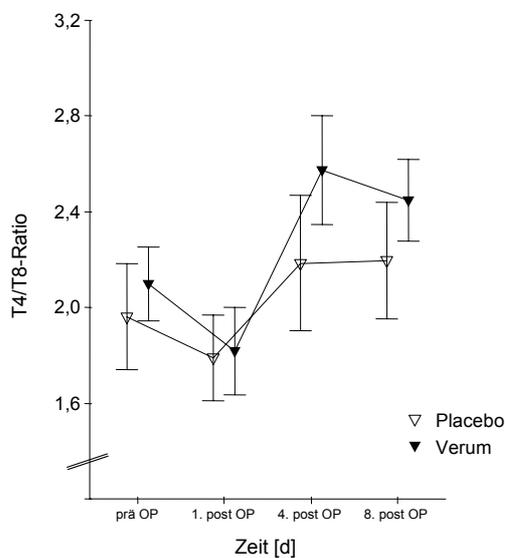


Abbildung 16:

Darstellung des T4/T8-Ratios

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen  
auf den Operationstag

y-Achse:

T4/T8-Ratio angeben  
als MW ± SEM

#### 4.2.7 $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

Die absolute Anzahl der  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten sank zunächst in beiden Gruppen bis zum 4. postoperativen Tag nicht signifikant ab und verlief anschließend in beiden Gruppen ansteigend ohne im Mann-Whitney-U-Test das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zu erreichen. Trotz fast gleicher Ausgangswerte war der prozentuale Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Lymphozytenpopulation vom 1. Messtag zum 1. postoperativen Tag fast gegenläufig mit einem nicht signifikanten Anstieg in der Verumgruppe und einem eher gleichbleibenden Verlauf in der Placebogruppe. Ab dem 1. postoperativen Tag sank in beiden Gruppen der prozentuale Anteil ab. Im Gegensatz zur Placebogruppe war dieser Verlauf innerhalb der Verumgruppe zwischen dem 1. und 4. postoperativen Tag signifikant ( $p = 0,04$ ). Zum 8. postoperativen Tag stieg der prozentuale Anteil in beiden Gruppen wieder dezent an.

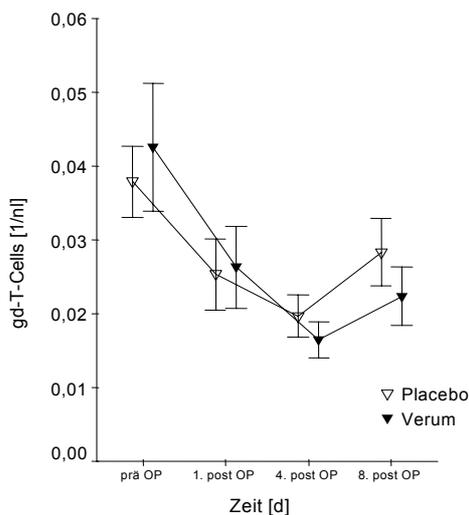


Abbildung 17:

Darstellung der  $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf

den Operationstag

y-Achse:

$\gamma\delta$ -T- Lymphozyten in 1/nl angeben

als MW  $\pm$  SEM

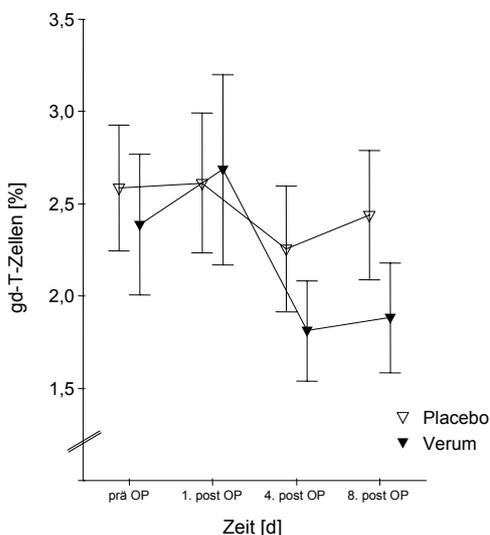


Abbildung 18:

Darstellung des prozentualen Anteiles der

$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten an der gesamten

Lymphozytenpopulation

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf

den Operationstag

y-Achse:

$\gamma\delta$ -T-Lymphozyten in % angeben

als MW  $\pm$  SEM

#### 4.2.8 Natürliche Killerzellen

Die absolute Anzahl der Natürlichen Killerzellen (NK) und der prozentuale Anteil der NK an der Lymphozytenpopulation zeigten keine signifikanten Unterschiede weder im Vergleich der Gruppen mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests noch im Anstiegsverlauf innerhalb beider Gruppen. Zu beachten ist jedoch, dass trotz bis zum 4. postoperativen Tag kontinuierlich sinkenden Absolutzahlen der prozentuale Anteil der NK-Zellen an der Lymphozytenpopulation zum 1. postoperativen Tag steigt und zum 4. postoperativen Tag auf ein Niveau unterhalb des Ausgangswertes wieder absinkt. Am 8. postoperativen Tag sind beide Variablen in der Placebo- als auch in der Verumgruppe wieder angestiegen.

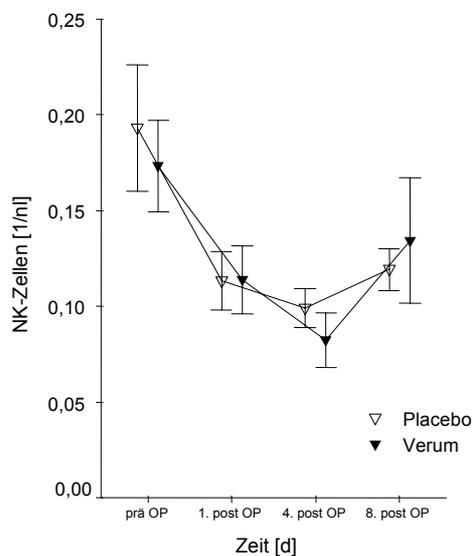


Abbildung 19:

Darstellung der absoluten NK-Zellanzahl

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag

y-Achse:

Anzahl der NK-Zellen in 1/nl angeben als MW  $\pm$  SEM

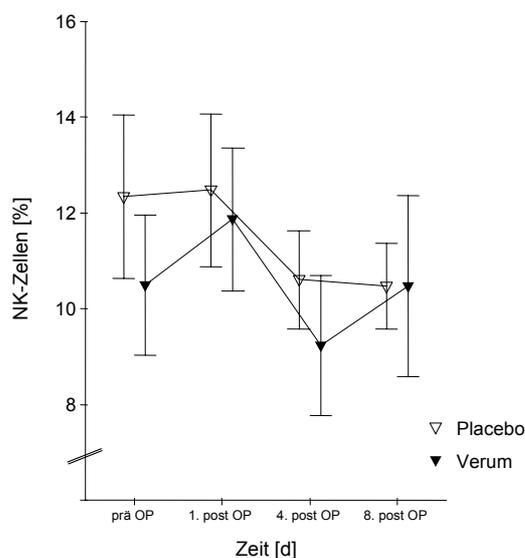


Abbildung 20:

Darstellung des prozentualen Anteiles der

NK-Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag

y-Achse:

NK-Zellen in % angeben als MW  $\pm$  SEM

## 4.3 Aktivierungsmarker

### 4.3.1 HLA-DR- und CD25-positive T-Zellen

Der prozentuale Anteil der HLA-DR-positiven T-Zellen und der prozentuale Anteil der CD25-positiven T-Zellen an der gesamten T-Zellpopulation zeigten im Mann-Whitney-U-Test zum 1. postoperativen Tag einen signifikanten Anstieg der Messwerte (Verum und Placebo:  $p = 0,041$ ). In der Verumgruppe steigt der prozentuale Anteil der CD25-positiven T-Zellen kontinuierlich an, wohingegen in der Placebogruppe ein Wechsel zwischen An- und Abstieg zu beobachten ist. Der Verlauf der HLA-DR-positiven T-Zellen ist in beiden Gruppen annähernd gleich. Die Berechnungen mittels Wilcoxon-Test ergaben für beide Variablen keine signifikanten Verläufe innerhalb der Gruppen.

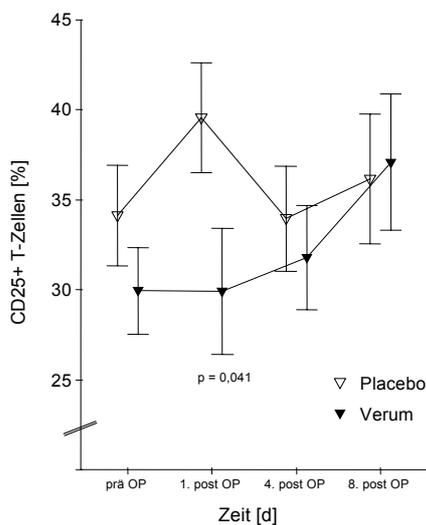


Abbildung 21:

Darstellung des prozentualen Anteiles der CD25-positiven T-Zellen an der gesamten T-Lymphozytenpopulation  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag  
y-Achse:  
CD25-positiven T-Lymphozyten in % angeben als MW ± SEM

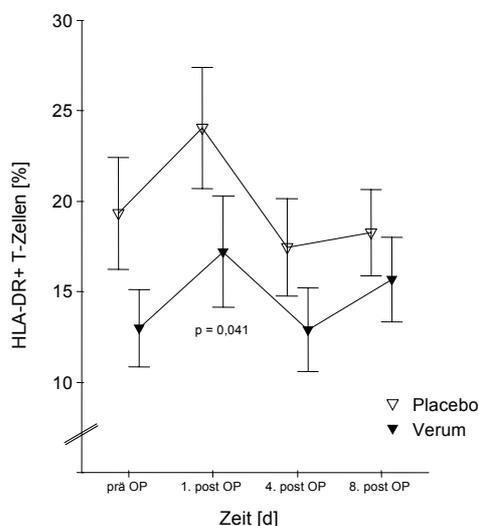


Abbildung 22:

Darstellung des prozentualen Anteiles der HLA-DR-positiven T-Lymphozyten an der gesamten T-Lymphozytenpopulation  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag  
y-Achse:  
HLA-DR-positiven T-Lymphozyten in % angeben als MW ± SEM

### 4.3.2 CD45RA- und CD45RO-positive T4-Zellen

Im Gruppenvergleich konnte im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied der Ergebnisse ermittelt werden. Auch zeigte sich in den Berechnungen mittels Wilcoxon-Test kein signifikanter Anstieg bzw. Abfall der Variablen innerhalb der Gruppen. Beide Parameter zeigen im Gruppenvergleich zwischen den präoperativen und dem 1. postoperativen als auch vom 4. zum 8. postoperativen Tag einen gegensinnigen Verlauf.

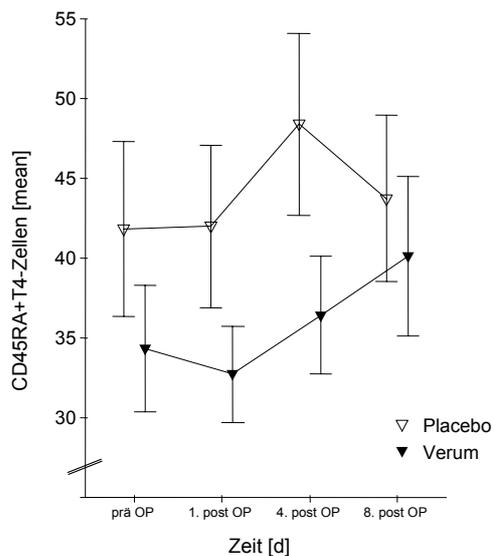


Abbildung 23:  
Darstellung der CD45RA-positive T4-Zellen  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen  
auf den Operationstag  
y-Achse:  
CD45RA-positive  
T4- Lymphozyten in mean angeben  
als MW  $\pm$  SEM

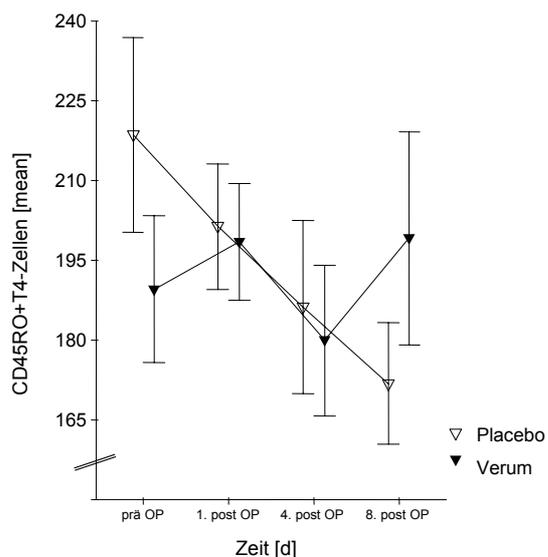


Abbildung 24:  
Darstellung der CD45RO-positive T4-Zellen  
x-Achse:  
Messzeitpunkt bezogen  
auf den Operationstag  
y-Achse:  
CD45RO-positive  
T4- Lymphozyten in mean angeben  
als MW  $\pm$  SEM

### 4.3.3 CD45RA- und CD45RO-positive T8-Zellen

Im Gruppenvergleich konnte im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied der Ergebnisse ermittelt werden. Auch zeigte sich in den Berechnungen mittels Wilcoxon-Test kein signifikanter Anstieg bzw. Abfall der Variablen innerhalb der Gruppen. Im Verlauf ist zu erkennen, dass der mean Wert von den CD45RA-positiven T8-Zellen in beiden Gruppen tendenziell ansteigt und der mean Wert der CD45RO-positiven T8-Zellen tendenziell absinkt.

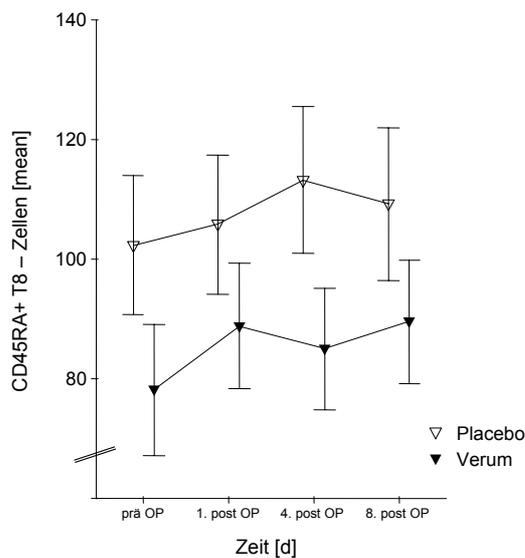


Abbildung 25:

Darstellung der CD45RA-positive T8-Zellen

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen

auf den Operationstag

y-Achse:

CD45RA-positive T8- Lymphozyten

in mean angeben als MW  $\pm$  SEM

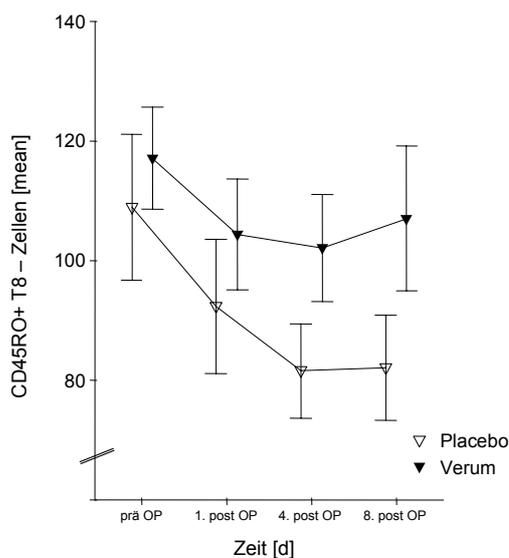


Abbildung 26:

Darstellung der CD45RO-positive T8-Zellen

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen

auf den Operationstag

y-Achse:

CD45RO-positive T8-Lymphozyten

in mean angeben als MW  $\pm$  SEM.

## 4.4 Zytokine

### 4.4.1 Interleukin 10 und Interleukin 12

Im Gruppenvergleich konnte im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied der Ergebnisse ermittelt werden. Berechnungen mittels Wilcoxon-Tests ergaben für die Interleukin-10 Konzentration einen signifikanten Anstieg innerhalb der Verumgruppe zwischen dem präoperativen und 1. postoperativen Tag ( $p = 0,04$ ). Die Konzentration von Interleukin-12 zeigte in keinen Berechnungen signifikante Ergebnisse. Auffällig ist eine große Streubreite insbesondere der Verumgruppe von IL10 am 2. und 4. Messtag sowie am ersten Messtag von IL12 in der Verumgruppe.

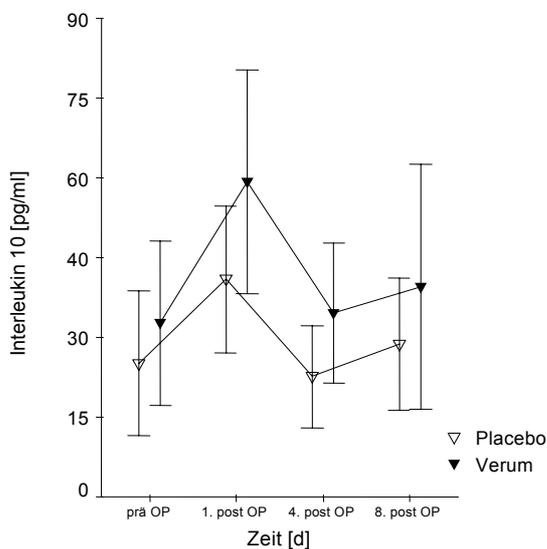


Abbildung 27:

Darstellung der Konzentration von Interleukin-10

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag

y-Achse:

Interleukin-10 Konzentration

in pg/ml angeben als MW  $\pm$  SEM

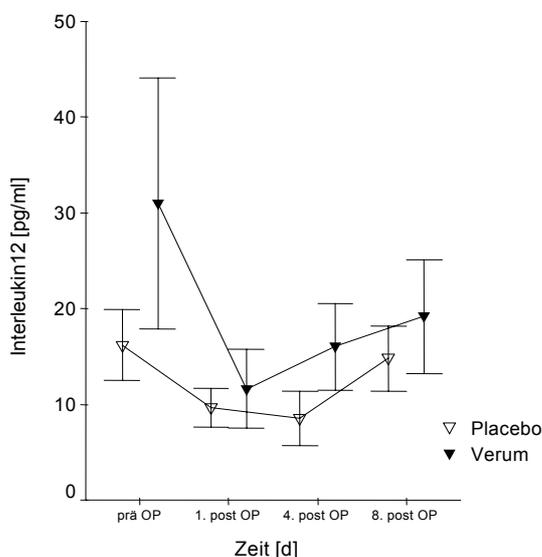


Abbildung 28:

Darstellung der Konzentration von Interleukin-12

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag

y-Achse:

Interleukin-12 Konzentration in pg/ml

angeben als MW  $\pm$  SEM

#### 4.4.2 Interferon- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )

Es konnten weder im Mann-Whitney-U-Test noch im Wilcoxon-Test signifikante Ergebnisse ermittelt werden. Im Verlauf ist ersichtlich, dass nach einem kontinuierlichen Absinken der INF- $\gamma$  Konzentration bis zum 4. postoperativen Tag am 8. postoperativen Tag die Ausgangswerte wieder annähernd erreicht werden.

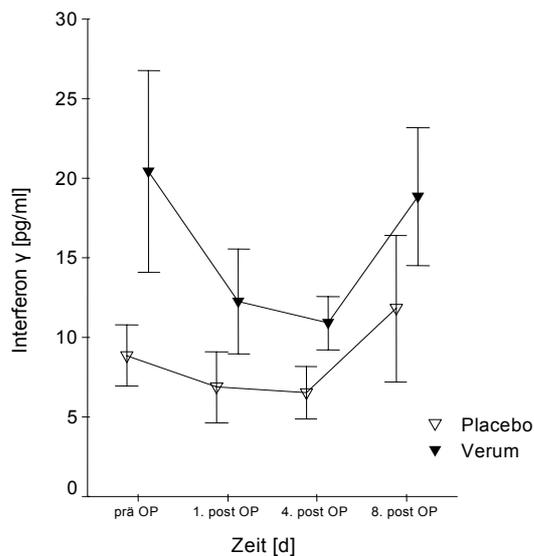


Abbildung 29:

Darstellung der INF- $\gamma$  Konzentration

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen

auf den Operationstag

y-Achse:

INF-  $\gamma$  Konzentration

in pg/ml angeben als MW  $\pm$  SEM

#### 4.5 IgA-Konzentration im Serum

Die Ausgangswerte der IgA-Konzentrationen liegen in beiden Gruppen im oberen Normbereich (Placebo:  $c = 271,61$  mg/dL, Verum:  $c = 288,21$  mg/dl, normal: 70-315 mg/dl) und fallen zum 1. postoperativen Tag mit im Wilcoxon-Test berechneten Signifikanzen ab (Placebo:  $p = 0,01$ ; Verum:  $p = 0,005$ ). Ab dem 4. postoperativen Tag steigt die Konzentration in beiden Gruppen wieder an. Die Konzentrationen erreichen die Ausgangswerte am 8. postoperativen Tag nicht. Im Gruppenvergleich ergaben sich im Mann-Whitney-U-Test keine signifikanten Unterschiede.

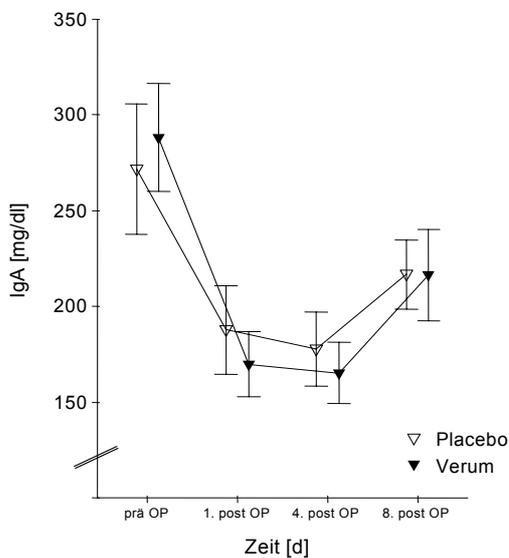


Abbildung 30:

Darstellung der IgA-Konzentration im Serum

x-Achse:

Messzeitpunkt bezogen auf den Operationstag

y-Achse:

Serum-IgA in pg/ml

angeben als MW  $\pm$  SEM

## **5 DISKUSSION**

In dieser Studie wurde untersucht, ob eine perioperative Gabe von Synbiotika bei Patienten mit großen abdominal-chirurgischen Eingriffen serologische Parameter des Immunsystems beeinflusst. Hierbei konnte keine wesentliche Beeinflussung des Immunsystems durch Milchsäurebakterien nachgewiesen werden.

Es werden folgende Faktoren diskutiert: das Studiendesign, die Wahl der Messparameter und Messmethoden sowie Patienten-, Behandlungs- und Substanz-abhängige Faktoren.

### **5.1 Studiendesign**

Das Studiendesign ist neben finanziellen, organisatorischen und personellen Fragen wichtiger Bestandteil der Studienplanung. Treten hier Fehler auf, können diese im Verlauf nicht mehr korrigiert werden. Wichtige Aspekte sind die Fragestellung, die Studienpopulation, der Studientyp, der Beobachtungszeitraum, die Messverfahren und die Fallzahlplanung.

Zur Beantwortung der Fragestellung wurden aufgrund der Komplexität des humoralen Immunsystems nur ausgewählte Parameter herangezogen. Aus den erlangten Ergebnissen lassen sich somit keine Schlussfolgerungen für andere Parameter ableiten. Da es sich zudem um Bestandteile des venösen Vollblutes handelt, werden nur mögliche systemische Wirkungen der Synbiotika erfasst.

Die vorliegende Untersuchung ist eine zweiarmige, doppelblinde, randomisierte und placebokontrollierte klinische Studie. Sie erfüllt somit den Goldstandard bei der Prüfung von Wirksamkeit und Verträglichkeit therapeutischer Maßnahmen [78, 79].

Bezüglich der Studienpopulation wurden Ein- und Ausschlusskriterien festgelegt. Es handelt sich somit um eine selektive Stichprobenauswahl, welche nur Aussagen über eine Grundgesamtheit zulässt, die die Auswahlkriterien erfüllt. Da es sich um eine unizentrische Untersuchung handelt, sinkt die Generalisierbarkeit der Ergebnisse. Es wurde ein Beobachtungszeitraum von 8 Tagen mit einer Studienkosteneinnahme von mindestens 5 Tagen gewählt. Im Vergleich zu anderen Studien ist dies ein relativ kurzer Zeitraum. Border et al. beobachteten 1987, dass sich eine Sepsis oft erst nach zehn Tagen intensivmedizinischer Behandlung manifestiert. Veränderungen von Immunparametern nach Ablauf von 8 Tagen werden in dieser Arbeit nicht erfasst. Zudem ist eine Stichprobe von 33 Probanden relativ klein, so dass mögliche Einflüsse der Synbiotika auf das Immunsystems nicht ermittelt werden können oder

nur eine Tendenz zu erkennen ist. Bezüglich der Messverfahren und Messmethodik wurden die standardisierten ELISA-Messungen von einer einzigen Laborassistentin an denselben Geräten durchgeführt. Zur Bestimmung der restlichen Parameter wurden die entsprechenden Blutproben im Labor kurz nach Entnahme untersucht bzw. vorbereitet. Die Genauigkeit der Geräte wurde regelmäßig durch standardisierte Verfahren überprüft. Faktoren, die nicht einer statistischen Untersuchung zugeführt worden waren, sind z.B. die Dauer der zugrunde liegenden Erkrankung, das sozioökonomische Umfeld der rekrutierten Patienten und die nicht erfassten Nebenerkrankungen z.B. aus dem rheumatischen oder allergischen Formenkreis. Eine Gleichverteilung dieser Faktoren in den Gruppen A und B wurde durch die Randomisierung gewährleistet.

Zusammenfassend sind als Kritikpunkte dieser Studie die niedrige Fallzahl von 33 Patienten, die Einnahmedauer der Studienkost von nur 5 Tagen und die kurze Beobachtungszeit von 8 Tagen zu nennen.

## **5.2 Perioperative Medikation**

Die Zusammensetzung der gastrointestinalen Mikrobiota ist u.a. abhängig von einer Antibiotikagabe und variiert in ihrem Ausmaß von der Dauer und Art der Verabreichung. Im schlimmsten Fall treten sprue-ähnliche Symptome mit den Folgen eines Malabsorptionssyndroms auf. Auch ohne die Entwicklung eines solchen Syndroms wird der Metabolismus und die Absorption von z.B. Vitaminen, Hormonen und Elektrolyten durch Antibiotika beeinträchtigt [92].

Der Einfluss einer single-shot-Antibiose auf das Überleben von LAB im GIT kann nicht konkretisiert werden, da sich die bisher durchgeführten Studien nur auf eine längere Gabe von Antibiotika (AB) beziehen. McNaught et al. verzichteten in einer *in vivo* Untersuchung zur Ermittlung einer bakteriellen Translokation bei großen abdominalen Operationen auf eine single-shot-Antibiose. Die betroffenen Patienten entwickelten deutlich mehr septische Komplikationen, so dass im Studienverlauf jeder Patient eine single-shot-Antibiose erhielt [115].

Die Patienten unserer Studie erhielten gemäß den aktuellen Leitlinien eine perioperative Antibiose. *In vitro* sind die verwendeten LAB resistent gegenüber Metronidazol und Cefuroxim und werden dementsprechend nicht von der single-shot-Antibiose zerstört.

Neben einer antibiotischen Behandlung erhielten die Probanden Opioide und Anästhetika. Der Einfluss dieser Substanzen auf das Immunsystem wird seit vielen Jahren untersucht [195, 190, 165]. In der klinischen Studie von Yokoyama et al. sank bereits 30 Minuten nach einem epiduralen Lidokain-Block die Blutkonzentration von Epinephrin, Norepinephrin und Kortisol signifikant unabhängig von der Schmerzintensität. Die NK-Zellaktivität und Lymphozytenpopulationen sank ebenfalls in beiden Gruppen jedoch nicht signifikant. Der Autor schlussfolgerte, dass allein die Blockade des Sympathikus und nicht der Schmerz den Hormonstatus und die Modifizierung der Lymphozyten und NK-Zellen steuert. Ursächlich könnte eine gesteigerte oder verminderte Sensitivität von  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptoren auf Lymphozyten sein. Da trotz Anstieg von Adrenalin und Kortisol die ACTH-Konzentration gleich blieb, scheint eine Periduralanästhesie die Funktion der Hypophyse nicht direkt zu beeinflussen [195]. Eine Übersichtsarbeit zum Thema „Opioide und Immunsuppression“ veröffentlichte PD. Dr. I. Welters im Jahre 2003. Zusammenfassend beschreibt die Autorin, dass eine Aktivierung oder Suppression des Immunsystems von den jeweils verwendeten Opioiden und den aktivierten Opioidrezeptorsubtypen, der Applikationsform des Opioids und der Dauer der Exposition abhängig ist. Im Rahmen einer Reduktion der perioperativen Stressantwort durch Narkosen auf Morphinbasis steht insgesamt der inhibierender Effekt auf das Immunsystem im Vordergrund. Endogen produziertes Morphin scheint zudem zu einer Normalisierung übermäßig aktivierter Immunmechanismen beizutragen [190].

Da eine Antibiose und Anästhesie bzw. Analgesie nachweislich das Immunsystem beeinflusst, erhielten alle Probanden dieser Studie eine single-shot-Antibiose und eine Periduralanästhesie (PDA) [180, 69, 12].

### **5.3 Patientenabhängige Faktoren**

Zu den Patienten-spezifischen Einflussfaktoren zählen die Mitarbeit des Patienten, der Ernährungszustand der Probanden, vorhandene Vorerkrankungen, die individuellen Möglichkeiten der Stressbewältigung und epidemiologische Daten.

Bezüglich der Patientenmitarbeit ergaben sich keine Komplikationen. Die Probanden erhielten die entsprechenden Nahrungstüten unter Aufsicht des Pflegepersonals einen Tag vor der Operation und über eine nasogastrale Sonde für mindestens 5 Tage postoperativ. Zum Thema Ernährungszustand veröffentlichten Tannock et al.

1974 eine Studie an Mäusen [174]. Im Vergleich zur Kontroll-Gruppe sank die Konzentration der verschiedenen Lactobacillen im GIT dramatisch in der Mäusepopulation, welche für 48 Stunden nicht ruhen durften und weder Nahrung noch Wasser erhalten hatten. Dies wurde auf eine hormonelle Imbalance, eine kompetitive Adhäsion der LAB und auf Eigenschaften des Wirts, wie die individuelle Antikörperproduktion, zurückgeführt.

Ein weiterer Faktor, welcher die Darmflora in Ihrer Zusammensetzung verändert und so eine nicht konkret abschätzbare Fehlerquelle darstellt, ist der Einfluss von negativem Stress. Zu den wichtigsten Botenstoffen, welche im Rahmen von psychischen und physischem Stress endogen freigesetzt werden, zählen Katecholamine und Glukokortikoide. Es ist davon auszugehen, dass Patienten vor einer großen Operation psychischem Stress ausgesetzt sind. Bereits 1974 wiesen Tannock et al. nach, dass Stress die Konzentration der Milchsäurebakterien im Darm reduziert und die Konzentration koliformer Bakterien steigert [174]. Söderholm et al. erläuterten in ihrer Arbeit von 2001 die neurohormonelle Kontrolle der gastrointestinalen Barriere mit ihren physikalischen, enzymatischen und immunologischen Schutzmechanismen und der daraus resultierenden Abhängigkeit der Barrierefunktion von psychologischen und physiologischen Faktoren [163].

Ein psychologischer Aspekt wird u.a. bei der Nahrungsmittelallergie und bei chronischen Magendarmkrankungen wie dem Morbus Crohn angenommen. Die meisten Studien wurden hierzu an Tiermodellen vorgenommen. Saunders et al. beispielsweise konnten nachweisen, dass unter „restraint stress“ und „cold restraint stress“ die Permeabilität für große Moleküle im Jejunum trotz mikroskopisch intakter Mukosa zunahm. Da sich diese „Dysfunktion“ unter Gabe von Atropin weitgehend verhindern ließ, scheinen cholinerge Transmitter eine modulierende Funktion auf die Darmmukosa auszuüben. Eine abnorme parazelluläre Permeabilitätssteigerung wurde von Swain et al. nach „restraint stress“ und „swimmung stress“ *in vivo* nachgewiesen. Dieser Barrieredefekt konnte durch Antagonisierung der Adrenalin- und Glukokortikoidrezeptoren aufgehoben werden.

Insbesondere Glukokortikoide, welche innerhalb weniger Minuten nach einem Trauma ausgeschüttet werden, beeinflussen das Immunsystem, indem sie die Freisetzung von pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Mediatoren stimulieren oder supprimieren. Die Produktion von IL-12 wird beispielsweise durch Glukokortikoide gehemmt und die von IL-10 gefördert. Auf der anderen Seite werden

Rezeptoren von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch Glukokortikoide stimuliert. Aufgrund der kontinuierlichen Hemmung der Arachidonsäuremetaboliten, der freien Sauerstoffradikale und Stickstoffoxid zählen Glukokortikoide auch zu den potentesten anti-inflammatorischen Verbindungen [54]. Grzelak et al. konnten in diesem Rahmen keine signifikante Steigerung der IL-10 und INF- $\gamma$  Konzentration nach kleineren operativen Eingriffen feststellen, so dass das Ausmaß der bevorstehenden Operation von Bedeutung zu sein scheint [62].

Um die Assoziation zwischen Immunsystem und zentralem Nervensystem zu verdeutlichen, ist zu erwähnen, dass beide Systeme entwicklungsgeschichtlich zusammenhängen. Gliazellen sind mit Makrophagen embryonal verwandt und produzieren wie diese unter bestimmten Konditionen verschiedenste Zytokine. Des Weiteren stehen die immunregulatorischen Organe, wie Peyer Plaques, LK, Thymus oder Milz mit dem Parasympathikus und Sympathikus anatomisch in Verbindung.

Die an dieser Studie teilnehmenden Patienten befinden sich in einer individuell stark empfundenen Stresssituation. Es ist davon auszugehen, dass u.a. durch die Aktivierung des Hypothalamus-Hypophysen-Systems, Stresshormone wie Adrenalin und Glukokortikoide vermehrt im Blut zirkulierten und so das Immunsystem beeinflussen.

In Betrachtung unserer Ergebnisse wird deutlich, dass die IL-12-Konzentration am ersten postoperativen Tag in beiden Gruppen deutlich sinkt ohne das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zu erreichen. Dies könnte u.a. auf eine steigende Glukokortikoidkonzentration zurückzuführen sein, wobei insbesondere die IL-12-Supprimierung zu einer massiven Inhibition der TH1-Immunantwort führt. Dies kann in einem ineffektiven Schutz gegenüber intrazellulären und opportunistischen Infektionen münden und verhindert gleichzeitig eine überschießende Immunantwort. Die IL-10-Konzentration steigt im Gegensatz zur IL-12-Konzentration in beiden Gruppen deutlich an. Unabhängig von Makrophagen oder dendritischen Zellen stimulieren Glukokortikoide die Differenzierung der T-Zellen zu TH2-Zellen und führen zu einer vermehrten Freisetzung von IL-10 aus naiven T-Zellen und Gedächtnis-T-Zellen. IL-10 wiederum stimuliert die TH2-Zellen im Sinne eines positiven feedbacks, was für die IL-10-Konzentrationssteigerung verantwortlich sein kann.

Ein weiteres Stresshormon ist Adrenalin, welches u.a. im Rahmen von Angst, Wut, Sauerstoffmangel und Schmerz vermehrt aus der Nebenniere ausgeschüttet wird.

Selbst bei anästhesierten Tieren verursachte die Reizung des N. ischiadicus eine deutliche Steigerung der AdrenalinKonzentration im venösem Vollblut [31]. Es ist davon auszugehen, dass Patienten unserer Studie trotz adäquater Anästhesie und Analgesie eine erhöhte AdrenalinKonzentration im Blut aufweisen.

Da Lymphozyten und Monozyten  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren mit hoher Affinität exprimieren, beeinflusst eine steigende KatecholaminKonzentration das Immunsystem. Es wurde *in vivo* beobachtet, dass Katecholamine die Konzentration der Lymphozyten, insbesondere der CD8-positiven T-Zellen und der NK-Zellen, erhöht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Katecholamine die Bindung von Lymphozyten an Endothelzellen hemmen und so die Migration verhindern [33].

Glukokortikoide und Adrenalin zirkulieren zudem aufgrund der starken physischen Belastung infolge der malignen bzw. chronischen Erkrankung vermehrt im Blut. Physischer Stress kann z.B. durch lokale Entzündungsreaktionen, Blutverluste, Medikamente, Gewebsverletzungen, Blutdruck- und Temperaturveränderungen ausgelöst werden.

Interessant ist, dass zum Beispiel Angst ähnlich prozentuale Verschiebungen bezüglich der Konzentration und Aktivität von NK-Zellen, CD8- und CD4-positiver T-Zellen macht, wie Entzündungsreaktionen. Dies konnten Breznitz et al. in einer experimentellen Untersuchung von 1998 belegen. Allein die Ankündigung eines zwar nicht lebensbedrohlichen aber sehr schmerzhaften Elektroschocks führte bei gesunden Probanden zu einem Anstieg des prozentualen NK-Zellanteils, einer Reduktion des prozentualen Anteils der CD4-positiven T-Zellen und einem Anstieg der CD8-positiven T-Zellen [28]. Bemerkenswert ist, dass die Verschiebungen innerhalb von wenigen Minuten eintraten und wenige Minuten nach Ankündigung, dass die Untersuchung nun vorbei sein würde, wieder ihren Ursprungswert erreichten. Diese möglichen Veränderungen sind in unserer Studie nicht zu erfassen, da unsere Messzeitpunkte zu weit auseinander liegen.

Bezüglich der epidemiologischen Daten ist zu vermuten, dass z.B. das Geschlecht mit einem veränderten Immunstatus einhergeht. Diese Vermutung konnte in der Studie von Mazari et al. widerlegt werden [112]. Allerdings bestätigte die Untersuchung, dass die Ernährung und das Alter v.a. die Konzentrationen von Subpopulationen der T-Lymphozyten beeinflussen.

Zusammenfassend ist es schwierig, den Einfluss von psychischen und physischen Stressfaktoren auf das Immunsystem in Zahlen auszudrücken. Anhand des in dieser Studie gewählten Studiendesigns wurden mögliche Einflussfaktoren gleich verteilt.

#### **5.4 Präbiotika, Probiotika und Synbiotika**

Die in dieser Studie verabreichte Kombination aus Präbiotika mit den Milchsäurebakterien *Lactobacillus casei* susp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* und *Pediococcus pentosaceus* (Synbiotic2000®) wurde im Jahre 2000 erstmalig in einer *in vivo* Studie mit einer täglichen Dosis von 40 Billionen LAB angewendet. Inzwischen wurde diese Kombination in einigen Arbeiten untersucht und der positive Effekt v.a. auf klinische Parameter dokumentiert [138, 137, 164, 88]. Allerdings konnte in einer neueren Untersuchung das Wiederauftreten eines postoperativen Rezidives bei Morbus Crohn durch Synbiotic2000® nicht beeinflusst werden [36]. Die Einnahme anderer Synbiotika mit den Milchsäurebakterien *L. acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* und *Streptococcus thermophilus* erbrachte ebenfalls keinen Vorteil gegenüber Placebo bezüglich klinischer Aspekte und der Dauer des Krankenhausaufenthaltes [187].

Aktuell laufen Studien, in welchen täglich 800 bis 1200 Billionen LAB (Synbiotic2000 forte®) verabreicht werden. In Anbetracht der steigenden Dosierungen und der neu zugelassenen Milchsäurebakterienstämme müssen z.B. pathogene Eigenschaften der Bakterien unbedingt ausgeschlossen werden. Bei der seit Jahrzehnten bestehenden Anwendung von bestimmten Milchsäurebakterien in der Herstellung von Sauerkraut, Milchprodukten, Salzgurken, Oliven u.v.a. wird die Sicherheit dieser Stämme kaum in Frage gestellt. Die meisten der heute verwendeten Probiotika gelten aufgrund ihrer lang zurückreichenden Anwendung im alltäglichen Leben als „generally regarded as safe“. Hierzu gehören zum Beispiel Laktobazillen, Bifidobakterien und einige Hefen. Der Übersichtsartikel von Salminen et al. fasst Empfehlungen bezüglich der Sicherheitsbestimmungen bei der Verwendung von probiotischen Kulturen zusammen [148]. Nach ihren Aussagen sollten drei Säulen bei der Auswahl geeigneter Probiotika bedacht werden. Zunächst sind generelle Aspekte zu bedenken, wie artspezifische Eigenschaften zum Thema Sicherheit und ob es sich definitionsgemäß um ein Probiotikum handelt. Die zweite Säule umfasst die Stabilität des Bakteriums und beinhaltet u.a. die physikalischen Eigenschaften z.B. in Bezug auf die Überlebenschance im GIT. Die dritte Säule beschreibt die

physiologischen und funktionellen Fähigkeiten der Probiotika. Hier werden die antimikrobielle Aktivität, die Fähigkeit der Immunstimulation oder klinische Effekte betrachtet.

Der unbedenkliche Einsatz von Probiotika wurde erstmals in den 70er Jahren angezweifelt, als Erkrankungen, die durch Lactobacillen hervorgerufen worden waren, auftraten [11]. Hierzu gehörten Krankheitsbilder wie Endokarditiden, Pneumonien und Septikämien [128, 1, 39, 72, 9]. Mit genaueren Nachweismethoden wurde in einer finnischen Studie aus den 90er Jahren festgestellt, dass die im Blut nachgewiesenen Verursacher von Milchsäurebakteriämien genotypisch nicht zu den oral zugeführten Probiotika gehörten. Zudem blieben in Finnland trotz einer deutlichen Konsumzunahme von Probiotika die Zahlen der nachgewiesenen Bakteriämien innerhalb der untersuchten 10 Jahre stabil [145, 146].

Im Gegenzug beobachteten Patel et al. eine Zunahme von Milchsäurebakteriämien bei Lebertransplantationen von 1988 bis 1994. Sie begründeten dies mit der Einführung der präoperativen Gabe von Vancomycin und der damit verbundenen deutlich gestiegenen LAB-Konzentration im GIT, da Vancomycin-resistente Laktobazillen als Urheber überproportional häufig nachweisbar waren [128]. In einer Studie von Besselink et al. erhöhte die Einnahme von Probiotika signifikant die Mortalität bei Patienten mit einer akuten Pankreatitis [21]. Zu den gleichen Ergebnissen gelangte Shaoling Sun 2008 in einer Metaanalyse [167]. Florescu et al. untersuchten Leuconostoc-Bakteriämien bei Patienten im Alter unter 18 Monate mit einem short-bowel-Syndrom. Abgesehen von dieser Grunderkrankung waren das Vorhandensein eines zentralen Venenkatheters (ZVK) und eine verletzte Darmmukosa mit einer erhöhten Rate von Bakteriämien durch LAB verbunden [52]. Die Einnahme von Probiotika im Rahmen einer Antibiotikatherapie verhinderte wiederum das Auftreten einer Antibiotika-assoziierten Diarrhoe durch *C. difficile* [68]. Boyle et al. teilten die Prädispositionen für Komplikationen im Zusammenhang mit Probiotika in schwerwiegende und leichtgradige Risikofaktoren ein [24]. Ein hohes Risiko eine Probiotika-assoziierte Erkrankung zu entwickeln, haben Frühgeborene und immunsupprimierte Patienten mit Debilität und malignen Vorerkrankungen. Als weniger risikoreich gelten ein ZVK, vorbestehende funktionseingeschränkte Barrierefunktionen des GIT, eine Jejunostomie, die Gabe von Breitbandantibiotika wie z.B. Vancomycin und invasive Eingriffe im Respirations- und Gastrointestinaltrakt

[145, 128, 152, 6, 5, 9]. Die Patienten in unserer Studie hatten somit ein hohes Risiko Komplikationen im Rahmen der Probiotikaadministration zu entwickeln.

Es wird angenommen, dass die Fähigkeit der Lactobacillen, an der Mukosa zu haften, Ursache für die Pathogenität ist [84]. Die Fähigkeit der LAB zur Adhäsion an der gastrointestinalen Mukosa hängt wiederum von der Konkurrenzfähigkeit gegenüber anderen GIT-Bakterien, von der Wachstums- und Teilungsrate der Lactobacillen und ihrer Generationszeit ab [98]. Gleichzeitig ist gerade die Adhäsionsfähigkeit Voraussetzung für die positive Wirkung der Probiotika auf das Immunsystem. Denn hauptsächlich durch die Bindung an Epithelzellen wird die Ausscheidung der LAB im Rahmen der Peristaltik verzögert, eine positive Interaktion mit immunkompetenten Zellen gewährleistet und andere obligat pathogene Keime von den Epithelzellen kompetitiv verdrängt. Es wird vermutet, dass die Stärke der Adhäsion mit der Fähigkeit einer möglichen Translokation einhergeht, was wiederum eine Schädigung des Wirtes verursachen kann [7]. Allerdings sind auch Probiotika mit einer geringen Adhäsionsfähigkeit in Blutkulturen erkrankter Personen isoliert worden, so dass es andere Faktoren für LAB-bedingte Erkrankungen geben muss [84]. Nach einer Untersuchung von Prioult et al. konnten nicht alleine die Adhäsion und die Kolonisation von Probiotika für die Immunstimulation verantwortlich sein. In ihrer tierexperimentellen Untersuchung siedelte sich *L. johnsonii* zehnmal stärker im Darm an als *L. paracasei*, führte aber zu einer deutlich geringeren Stimulation des Immunsystems. Somit scheinen vor allem spezifische Bestandteile der Probiotika wie Zellwandmaterial, zytoplasmatische Strukturen, Peptidoglykan (Murein) oder Teichonsäuren für die beobachteten Immunreaktionen verantwortlich zu sein.

Die Tatsache, dass noch weitere Faktoren zu bedenken sind, wird durch die Studienergebnisse von Salminen et al. und Cunningham-Rundles et al. untermauert. In Finnland wurde trotz allgemein gesteigertem LAB-Konsums und einer sich daraus ergebenden erhöhten intestinalen Konzentration von Lactobacillen und Bifidobakterien kein vermehrtes Auftreten von opportunistischen Infektionen mit diesen Bakterien registriert [146]. Cunningham-Rundles et al. untersuchten 1999 zudem, in wieweit die Gabe von Probiotika (*L. plantarum*) die Abwehrfunktionen von HIV infizierten Kindern beeinträchtigt [42]. Erkrankungen verursacht durch *L. plantarum* wurden nicht beobachtet. Das Immunsystem wurde sogar positiv durch die Gabe von *L. plantarum* beeinflusst. Mangiante et al. zeigten, dass trotz nachgewiesener Translokation von pathogenen koliformen Bakterien, das verabreichte Probiotikum *L. plantarum* 299v

nicht außerhalb des GIT nachzuweisen war [107]. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte eine Studie von McNaught et al. [115]. Des Weiteren konnte in einem Tiermodell mit IL-10 knock-out-Mäusen, in welche eine manifeste Kolitis induziert worden war, eine massive mukosale Adhärenz und Translokation von Aerobiern nachgewiesen werden. Die Adhäsion von Lactobacillen in der selben Population war jedoch mit denen von gesunden Mäusen vergleichbar [103]. In einer Untersuchung von Apostolou et al. korrelierte die Adhäsion und die Fähigkeit der Thrombozytenaggregation von Milchsäurebakterien nicht mit einer Zunahme systemischer Infektionen [7].

Zusammenfassend konnten in Fällen, wo Probiotika verantwortlich für Infektionen waren, vorbestehende Immundefekte, chemotherapeutische Behandlungen oder andere schwere Funktionseinschränkungen des GIT nachgewiesen werden.

Ist die Wahl der zur Anwendung kommenden Probiotika getroffen, stellt sich die Frage, in welcher Dosis und wie lange die probiotischen Bakterien eingenommen werden sollten. Im Rahmen der Studienplanung war es schwierig, die täglichen Einzeldosen der Synbiotika festzusetzen, da eindeutige Empfehlungen für die Dosis und Anzahl der täglichen Einzeldosen nicht vorlagen. Die Dosis scheint jedoch ein wichtiger Aspekt für die Wirksamkeit von Synbiotika zu sein, was Spindler-Vesel et al. und Woodcock et al. in ihren Arbeiten diskutieren [164, 193]. Donnet-Hughes et al. führten diesbezüglich tierexperimentelle Studien durch und beobachteten u.a. eine dosisabhängige Phagozytoseaktivität von Immunzellen unter Einnahme von LAB [46]. Nach ihrer Einschätzung sollte die oral zugeführte Menge von *L. johnsonii* La1  $10^8$  cfu nicht unterschreiten. In unserer Studie erhielten die Patienten zweimal täglich jeweils  $10^{10}$  cfu der vier verschiedenen LAB.

Die Einschätzung der optimalen Dosis wurde des Weiteren durch die Tatsache erschwert, dass je nach Milchsäurebakterienstamm und je nach gastrointestinalen Voraussetzungen die effektiven Dosen differieren können und unterschiedliche LAB-Stämme eine differente Immunantwort bewirken. Zeuthen et al. verglichen zum Beispiel *in vitro* die Zytokinproduktion von dendritischen Zellen, welche durch einzelne Milchsäurebakterien stimuliert wurden und fanden heraus, dass es deutliche Unterschiede abhängig vom LAB-Stamm gibt [196]. Die Probiotika unserer Studiennahrung sind *Leuconostoc mesenteroides* 32-77:1, *L. paracasei* susp. *paracasei* F19, *Pediococcus pentosaceus* 5-33:3 und *L. plantarum* 2362.

*Lactobacillus plantarum* ist ein gram-positives, fakultativ, homofermentatives Milchsäurebakterium, welches sehr niedrige pH-Werte toleriert. Es ist maßgeblich an der Herstellung von Sauerkraut beteiligt und befähigt, die Thrombozytenaggregation zu fördern sowie Kollagen zu binden [1]. *L. plantarum* verstoffwechselt zusätzlich Arginin zu Stickstoffmonoxid, welches u.a. die Bakteriostasis, die mukosale Sekretion und die Immunstimulation im GIT beeinflusst. Allerdings beziehen sich die meisten nachgewiesenen Fähigkeiten von *L. plantarum* auf *in vitro* Studien und Tiermodelle. Dies betrifft auch Untersuchungen bezüglich der Blutkonzentrationen von HDL und Entzündungsparametern (CRP, IL-6) im Rahmen der Arterioskleroseprävention [122]. *Lactobacillus paracasei* susp. *paracasei* F19 wird zusammen mit *L. acidophiles* für die Vergärung von Milch verwendet. Da insbesondere *L. paracasei* im Vergleich zu anderen LAB eine hohe Bindungsfähigkeit gegenüber Aflatoxin B1 hat und *E. coli* effektiv hemmt, eignet es sich sehr gut für die Herstellung von Joghurt, Babynahrung oder Ähnlichem [32].

*Pediococcus pentosaceus* 5-33:3: ähnelt in seinen Eigenschaften und Nutzen dem von *Lactobacillus plantarum*. Es ist ein homofermentierendes Bakterium und ist häufig Bestandteil von Tiernahrungsmitteln in der Landwirtschaft. Zudem wird es bei der Herstellung von Wurst (Salami) verwendet. Es hat mit vier Stunden eine längere Generationszeit gegenüber *L. plantarum*. Als Bestandteil von Synbiotic2000® forte konnte ein positiver Effekt auf das Immunsystem bei Traumapatienten und im Tiermodell nachgewiesen werden [176, 88].

*Leuconostoc mesenteroides* 77:1 ist ein obligat heterofermentatives Milchsäurebakterium und wird u.a. mit Sauerkraut und gepöckelten Nahrungsmitteln (Salzgurken) oral aufgenommen. *Leuconostoc* ist vor allem Bestandteil von Joghurt und Kefir. Im Vergleich zu anderen Bakterien kann *Leuconostoc* in Medien mit hohem Salz- und Zuckerkonzentrationen überleben und ist gegenüber Vancomycin resistent. Es wurde in einer Korrespondenz von 2005 vermutet, dass *Leuconostoc* in laborchemischen Routineuntersuchungen vereinzelt als Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) falsch identifiziert wurde und deshalb Harnwegsinfektionen häufiger als bisher durch *Leuconostoc* und nicht durch VRE verursacht wurden. Da *Leuconostoc* im GIT physiologisch vorkommt, wurde eine exogen bedingte Besiedlung der Blase durch unzureichende Hygiene, zum Beispiel beim Einführen eines transurethralen Dauerkatheters angenommen. Mitte der 80er Jahre wurden die ersten Fälle an *Leuconostoc* assoziierten Septikämien und Meningitiden bekannt.

Betroffen waren Frühgeborene, Immunsupprimierte und Patienten mit einem zentralen Venenzugang. Letzteres führte zu dem begründeten Verdacht, dass *Leuconostoc* via Haut in die Blutbahn gelangt. Unterstützt wurde diese Theorie durch den parallelen Nachweis von Staphylokokken im Blut [168]. Zudem bestätigte diese Arbeit die erwähnten Schlussfolgerungen von Florescu et al. [52].

Zusammenfassend zeigte die Kombination aus den oben genannten Probiotica positive Wirkungen in der Arterioskleroseprävention, beim Morbus Crohn und bei chronischen Lebererkrankungen. Zudem sind sie in ihrer Darreichungsform, der Dosis und ihrer Sicherheit erprobt [89, 96, 136, 14, 97].

In Bezug auf Parameter des Immunsystems, wurden u.a. ein positiver Effekt auf die Phagozytosefähigkeit von Abwehrzellen, der Interleukinproduktion und der Zelldifferenzierungen nachgewiesen. Des Weiteren konnte in vorangegangenen Studien mit Synbiotic2000® von Rayes et al. das Auftreten postoperativer Infektionen reduziert werden, obwohl die Probanden nach Boyle et al. zu den Hochrisikopatienten gehörten. Die bisher aufgetretenen systemischen Infektionen, die durch die orale Einnahme von Probiotika hervorgerufen wurden, beschränkten sich auf wenige Einzelfälle. Bei vielen Untersuchungen war der nachgewiesene LAB-Stamm nicht mit den verabreichten Probiotika identisch. Demnach scheinen die natürlich in unserem GIT vorkommenden Mikroorganismen als fakultativ pathogene Keime im Vordergrund zu stehen und nicht die verabreichten Probiotika [1].

## **5.5 Messmethoden**

Das Prinzip der durchflusszytometrischen Messungen beruht auf physikalische und biochemische Eigenschaften biologischer Substanzen und ist ein seit mehreren Jahrzehnten bekanntes und etabliertes Verfahren zur Identifizierung von markierten Partikeln bzw. Zellen.

Um 1900 beschrieb Paul Ehrlich die extrinsischen Eigenschaften von Leukozyten und legte unwissend den Grundstein der Zelldifferenzierung mittels Durchflusszytometrie. 1940 wurde von Coons, Creech und Jones die Technologie eines Fluoreszenzmikroskopes vorgestellt und zwanzig Jahre später konstruierte Mack Fulwyler eine der ersten Durchflusszytometer. Zu diesem Zeitpunkt, d.h. Mitte der 60er Jahre, waren Technologie, statistische Analysen und spezifische Zellmarker z.B. in Form von Antikörpern noch nicht ausgereift, so dass eine spezifische und breite Anwendung noch nicht möglich war. Als in den 70er Jahren monoklonale

Antikörper, zuverlässige Laser und finanzierbare Computer mit entsprechender Software erhältlich waren, begann die kommerzielle Herstellung von Flowzytometern [106, 29].

Im Rahmen der Weiterentwicklung wurden Methoden erarbeitet, welche Fehlerquellen während der Messung vermeiden. Zum Beispiel bestand ein hinzugeführter Untersuchungsgang darin, Ammonium-Chlorid-Stock-Lösung der zu untersuchenden Probe hinzuzufügen, um Erythrozyten und Thrombozyten zu lysieren, welche sonst mitmarkiert und mitgezählt wurden. Bereits lysierte Zellen und Zellbestandteile wurden mittels wiederholter Zentrifugierung und Dekantierung dem weiteren Untersuchungsgang entzogen. Die Bindung der spezifischen monoklonalen Antikörper an die zu messenden Zellen wurde durch eine definierte Inkubationszeit von zehn Minuten in Dunkelheit gewährleistet, da Licht zu einer Zerstörung der Antigen-Antikörper-Bindung führt.

In dieser Studie wurde für die Bestimmung von Parametern des spezifischen Immunsystems die in Tabelle 3 dargestellten monoklonalen Antikörper verwandt. Da die Messungen von den firmenspezifischen Antikörperklonen und Fluoreszenzfarbstoffen sowie von der Geräteeinstellung abhängig ist, können die Ergebnisse nicht mit Daten anderer Labore verglichen werden.

Die Zytokine IL-10 und IL-12 sowie INF- $\gamma$  wurden mittels sandwich-ELISA bestimmt. Dieses Verfahren beruht auf eine spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion und einer am Ende der Messung stattfindenden enzymatischen Farbreaktion. Interessant ist, dass Jules Bordet, ein Schüler Mechnikoff's und späterer Nobelpreisträger, 1901 erstmalig ein Indikatorsystem aus Komplement und Antigen vorstellte, welches als Vorreiter der heutigen Immunassays gilt.

Bei der Bestimmung von Transmitterstoffen mittels ELISA ist zu bedenken, dass Zytokine an Plasmaproteine, wie z.B. IgM oder  $\alpha_2$ -Makroglobulin gebunden sein können. Dies beeinflusst nicht nur die Pharmakokinetik, sondern auch die Zytokin-ELISA-Messung. Zudem sind Zytokine nur als Dimer oder Trimer aktiv. Die Bestimmung mittels ELISA misst aber auch inaktive Monomere oder Spaltprodukte. Die Konzentrationen könnten demnach tendenziell zu hoch gemessen sein und so als systemischer Fehler auftreten. Zu hohe Werte können ebenfalls durch die Aktivierung von Immunzellen im Rahmen einer gesteigerten Blutgerinnung durch z.B. Spritzenmaterial vorkommen. Um solche systemischen Fehler zu vermeiden, wurden bei unseren Messungen die Vorschriften der ELISA-Kit-Hersteller befolgt. Zudem

wurde das Plasma von den Zellen innerhalb von 30 min getrennt und bis zum Messzeitpunkt kühl gelagert.

## **5.6 Zellen des spezifischen Immunsystems**

### 5.6.1 Leukozyten

Unter dem Begriff „Leukozyten“ werden alle Blutzellen zusammengefasst, welche kein Hämoglobin enthalten. Hierzu gehören die Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Die Konzentrationen der Zellpopulationen im peripheren Blut ist altersabhängig, was in den Studien zu beachten ist. Sofern keine Immundefizienz vorliegt, führt der Kontakt mit Antigenen z.B. im Rahmen eines Traumas oder einer Infektion zur Aktivierung des Immunsystems. Folge sind eine vermehrte Differenzierung und Proliferation sowie eine verstärkte Zytokinproduktion der Leukozyten. Nach Antigenkontakt tritt zunächst eine neutrophile Leukozytose bei gleichzeitiger Abnahme der Lymphozyten- und Eosinophilenzahlen auf. Im Anschluss ist eine Monozytose nachweisbar, und bei Abklingen des akuten Infektes oder Traumas kommt es zur Lymphozytose und Eosinophilie. Allerdings können viele andere Faktoren wie Medikamente, Hormone und Stress eine Leukozytose verursachen. Des weiteren kann eine bestehende bzw. passagere Azidose z.B. während einer Operation zu einer Modulation der Stressreaktion im Sinne einer Leukozytose führen.

In unserer Studie ergaben sich an allen vier Messzeitpunkten keine signifikanten Unterschiede der Leukozytenkonzentrationen in der Placebo- und Verumgruppe. Am präoperativen Tag wurden Normwerte von ca. 6000 Leukozyten/ $\mu$ l gemessen, welche am ersten postoperativen Tag innerhalb der Gruppen signifikant auf etwa das Doppelte anstiegen. Dies ist v.a. Folge der Operationswunde und die allgemeine Immunantwort auf Stressfaktoren, wie der kurzfristigen Nahrungskarenz, Schmerzen und Angst. Am vierten postoperativen Tag sank die Anzahl der Leukozyten wieder auf ca. 8000 Leukozyten/ $\mu$ l, wobei der Abfall innerhalb der Placebogruppe signifikant war. Zu diesem 3. Messzeitpunkt ist die akute Immunaktivierung überwunden, und die Werte nähern sich auf dem Boden intensivmedizinischer Maßnahmen den Normwerten an. Zudem erfolgte eine Schmerztherapie mittels Morphinpumpe. Eine immunsupprimierende Wirkung von Morphinen wurde in mehreren Studien beschrieben, wobei Welters et al. in einem Übersichtsartikel „Opioide und Immunsuppression“ von 2003 verschiedene Wirkungsmechanismen darstellten [190].

Dass Morphine, welche peridural im LWS-Bereich verabreicht werden, den Hirnstamm erreichen und somit direkt über die hypothalamo-hypophysäre Achse Stressreaktionen und somit auch die Immunreaktion modulieren können, wies Bernards 1999 nach [20].

In beiden Gruppen wurde am 8. postoperativen Tag ein erneuter Anstieg der Leukozytenzahl registriert. Da die Patienten zwischen dem 4. und 8. postoperativen Tag auf eine periphere Station verlegt worden waren, könnte der Anstieg auf eine erneute Zunahme von äußeren Stressfaktoren und ggf. auch auf eine veränderte Wundversorgung zurückzuführen sein. Zudem war zu diesem Zeitpunkt die peridurale Morphinsubstitution beendet worden. Der Verlauf deckt sich mit den Ergebnissen von Rayes et al. bei Patienten mit Lebertransplantationen [136, 138].

### 5.6.2 Lymphozyten

Lymphozyten und ihre Untergruppen sind Zellen des adaptiven, d.h. des erworbenen Immunsystems. Sie erkennen mit Hilfe bestimmter zelleigener Erkennungsstrukturen spezifische Antigene. Die Lymphozytenkonzentration im peripheren Blut eines gesunden Menschen liegt zwischen 1000 und 5000 Zellen/ $\mu$ l. Das entspricht bis zu 55% der weißen Blutzellen.

Unsere Ausgangswerte lagen mit 1500 und 1800 Zellen/ $\mu$ l im Normbereich. Dies entspricht einem Lymphozytenanteil von ca. 25 und 30% der Leukozyten. Am ersten postoperativen Tag sanken in beiden Gruppen der absolute Anteil der Lymphozyten und der prozentuale Anteil an der gesamten Leukozytenzahl signifikant und erreichten mit ca. 100 Zellen/ $\mu$ l fast lymphopenische Werte. Im Vergleich mit der Gesamtleukozytenzahl, welche einen starken Anstieg am ersten postoperativen Tag aufwies, ist von einer Umverteilung der Subpopulationen auf Kosten der Lymphozyten auszugehen. Die Studienergebnisse von Möller et al. zeigten einen deutlichen Anstieg der neutrophilen polymorphkernigen Granulozyten und der Monozyten am ersten postoperativen Tag [120]. Diese sind antigenpräsentierende Zellen, welche durch Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen Lymphozyten anlocken und z.T. aktivieren. Es ist zu vermuten, dass bis zum ersten postoperativen Tag, Zellen des unspezifischen Immunsystems dominieren. Diesbezüglich wird in einer Darstellung von Peter und Pichler deutlich, dass in den ersten 24 Stunden die Aktivierung der T-Lymphozyten erfolgt und erst nach Ablauf von etwa 24 Stunden die Proliferation der T-Lymphozyten einsetzt [134]. Die

Mobilisation und Differenzierung der T-Zellen aus den sekundären Lymphorganen wie Milz benötigt wenigstens 72 Stunden. Eine Zunahme der peripheren Lymphozyten innerhalb von 24 Stunden ist durch eine Umverteilung aus den sekundären Lymphorganen oder durch eine Proliferation somit nicht zu erwarten.

Die absolute Menge der T-Lymphozyten beider Gruppen und die der B-Lymphozyten in der Verumgruppe zeigen in dieser Studie einen ähnlichen Verlauf wie die gesamte Lymphozytenanzahl. Das heißt, am ersten postoperativen Tag sinkt die T- und B-Lymphozytenanzahl in beiden Gruppen deutlich ab und steigt im Anschluss kontinuierlich an. Die B-Zellen angegeben in  $1/nl$  erreichen am 4. Messtag annähernd den präoperativen Wert, während die T-Zellzahl bis zum letzten Messtag ihre präoperative Menge nicht erreicht.

Signifikant war der Abfall der B-Lymphozytenzahl innerhalb der Verumgruppe zum ersten postoperativen Tag ( $p = 0,02$ ). Ein ähnliches Phänomen verursacht durch LAB wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Allerdings konnte in Tierversuchen gesichert werden, dass u.a. *L. casei* die Zahl der IgA-produzierenden B-Zellen in der Lamina propria steigert und dieser Effekt dosisabhängig ist [130]. Spekulativ könnte dem B-Zell-Abfall am ersten postoperativen Tag eine Umverteilung der peripheren B-Zellen in die Darmmukosa oder eine Umwandlung in AG-produzierende Plasmazellen zugrunde liegen. Im weiteren Verlauf steigt die Konzentration der B-Zellen in der Placebogruppe erst ab dem achten postoperativen Tag, während in der Verumgruppe bereits am vierten postoperativen Tag die Zahl gestiegen ist. Ursächlich kann die einsetzende Migration der stimulierten B-Zellen von den sekundären Lymphorganen zurück in die Lamina propria und den anderen exokrinen Geweben via Blutsystem sein. Dieser Vorgang wird auch als „homing“ bezeichnet.

Der prozentuale Anteil der B- und T-Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenpopulation verläuft zwischen dem präoperativen und dem ersten postoperativen Tag gegenläufig. Der B-Lymphozytenanteil steigt und der T-Lymphozytenanteil sinkt. Beide Zellpopulationen nähern sich in beiden Gruppen am vierten und achten postoperativen Tag wieder einander an. Das heißt, obwohl die Anzahl der B-Lymphozyten sinkt, steigt deren prozentualer Anteil an der Gesamtlymphozytenpopulation. Dies mag darin begründet sein, dass am ersten postoperativen Tag die Anzahl der T-Zellen, der NK-Zellen und der  $\gamma\delta$ -Zellen im Blut deutlich sinkt. Der Verlauf der B- und T-Lymphozyten ist mit den Ergebnissen der Studie von Yokoyama et al. vergleichbar. Letzterer untersuchte Immunparameter im

Zusammenhang mit einer Ösophagusektomie und perioperativer Anästhesie [194]. Der Verlauf der B- und T-Zellkonzentrationen entspricht einer physiologischen Immunantwort bei großen Operationen unabhängig von einer perioperativen Milchsäurebakterienadministration. Rayes et al. konnten bei Patienten mit großen abdominal-chirurgischen Eingriffen und einer perioperativen Synbioic2000®-Administration weder im Gruppenvergleich noch im Verlauf der einzelnen Gruppen signifikante Veränderungen der B-Zell-Konzentrationen ermitteln [136]. Auch an gesunden Probanden, welche für drei Wochen *L. casei* oral zu sich nahmen, konnten Nagao et al. keine Beeinflussung der T-Zellkonzentration feststellen [121].

### 5.6.3 CD4- und CD8-positive T-Zellen

Allgemein wurde bereits vor 50 Jahren angenommen, dass große Operationen oder andere Traumata eine Immunsuppression verursachen. Die ersten aussagekräftigen *in vitro* und *in vivo* Studien an Patienten, welche sich einer Nephrektomie unterziehen mussten, wurden von Slade et al. 1975 durchgeführt. Neben Untersuchungen an Lymphozytensubpopulationen führten sie bis einschließlich dem 5. postoperativen Tag Hauttests durch und beobachteten, dass die T-zellvermittelten Überempfindlichkeitsreaktionen noch am letzten Messtag sank, d.h. eine Immunsuppression über mehrere Tage postoperativ anhielt [161].

Diese Beobachtungen sind mit unseren Ergebnissen vereinbar und verdeutlichen nochmals die Wichtigkeit einer T-Zell-unabhängigen Immunität, welche früher einsetzt. Hinzu kommt, dass TH-Zellen beispielsweise erst vier Tage nach AG-Reiz ihre Funktion als Antigen-presentierende Zellen (APC) ausüben können. Makrophagen sezernieren deshalb sobald sie ein AG registriert haben IL-1, IL-6 und TNF. Die Transmitterstoffe führen zunächst zu einer lokalen Infektbekämpfung, bewirken allerdings keine komplette Elimination des Infektionsherdes. Diese Aufgabe übernehmen vor allem CD4-positive und CD8-positive Lymphozyten. Das Verhältnis dieser Zellgruppen zueinander wird T4/T8-Ratio genannt. In älteren Artikeln wird auch der Begriff T-Helfer/T-Suppressor Ratio gebraucht.

Eine Studie an Patienten mit abdominalen Operationen führten Grzelak et al. 1984 durch. In ihren Untersuchungen sanken am ersten postoperativen Tag der prozentuale und der absolute Anteil der Lymphozyten, der T4- und der T8-Zellen deutlich ab. Die T-Lymphozyten erreichten den Ausgangswert, wie auch in unserer Studie, innerhalb des Beobachtungszeitraumes nicht mehr. Des weiteren decken

sich die Untersuchungen von Grzelak et al. mit unseren Messungen bezüglich der T4- und T8-Zellzahl. Am 4. postoperativen Tag stieg der prozentuale Anteil der T4-Zellen während die T8-Zellen in Prozent am 4. und 8. postoperativen Tag supprimiert waren. Parallel dazu und in Einstimmigkeit mit den Ergebnissen von Grzelak et al. stieg der T4/T8-Ratio ab dem 4. postoperativen Tag. Den deutlichen Abfall der Lymphozyten und ihrer gemessenen Subpopulationen am ersten postoperativen Tag führten sie auf die Migration der Lymphozyten in das Rückenmark zurück. Des Weiteren wird eine lokale Anhäufung von Lymphozyten im Operationsgebiet als wahrscheinliche Ursache für die geringere Präsenz der Lymphozyten im peripheren Blut angenommen. Auch in Studien aus den 70er Jahren bei Patienten mit Verbrennungen konnte innerhalb von 48 Stunden ein deutlicher Abfall der T4-Zellen und nur eine geringe bzw. gar keine Veränderung der T8-Zellkonzentration beobachtet werden [50]. In der Studie von Rayes et al. war zwar die T4/T8-Ratio zu allen Messzeitpunkten höher als in der Placebogruppe, erreichte jedoch zu keinem Zeitpunkt das Signifikanzniveau [136]. Tierexperimentell konnten Maldonado et al. diese Beobachtungen bestätigen. Die Gabe von *L. casei* an Mäusen erbrachte keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen von CD3-, CD4 -und CD8-positiven T-Zellen. Diese Daten einschließlich der sich daraus ergebenden T4/T8-Ratios sind mit den unseren vergleichbar.

Im Studienvergleich ist zu beachten, dass der probiotische Effekt zur Beurteilung des T4/T8-Ratios nicht sicher von den Effekten der Präbiotika abzugrenzen ist. In einer Studie von Chen et al. zeigte die alleinige Gabe von Präbiotika an Patienten mit großen abdominal-chirurgischen Eingriffen eine signifikante Erhöhung der T4/T8-Ratios, der Absolutzahlen von CD4-positiven T-Zellen und des Immunglobulinspiegels im Serum [35]. In der tierexperimentellen Studie von Roller et al. konnten *L. rhamnosus* und *B. lactis* in Kombination mit Präbiotika wiederum keine signifikanten Unterschiede der T4- und T8-Zellzahl im Vergleich zu Placebo ermitteln [142]. Es zeigte sich allerdings ein tendenzieller aber nicht signifikanter Anstieg des T4/T8-Ratios in der Verumgruppe, was auch in unserer Studie beobachtet wurde.

Es kann vermutet werden, dass Synbiotika die Zusammensetzung der zirkulierenden Lymphozyten nur minimal beeinflussen. Insgesamt zeigt sich eine Verlaufskurve der T4/T8-Ratios, welche mit der von Rayes et al. vergleichbar ist [136].

#### 5.6.4 $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen nehmen ca. 5% der zirkulierenden bzw. im Lymphknoten vorhandenen T-Zellen ein und stellen zusammen mit den  $\alpha\beta$ -T-Zellen (ca. 95%) eine Subpopulation der T-Lymphozyten dar. Die Einteilung in  $\alpha\beta$ - und  $\gamma\delta$ -T-Zellen beruht auf unterschiedliche Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors.

Die genaue Funktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihr Entstehungsmechanismus ist noch nicht endgültig geklärt. Es scheinen zwei Subpopulationen der  $\gamma\delta$ -T-Zellen zu existieren, welche sich auf genetischer Ebene unterscheiden. Eine Gruppe ist vor allem bei Zellen in Lymphknoten nachzuweisen, während die andere hauptsächlich in Epithelien des GIT und der Haut vorkommt. In ihrer Funktion ähneln sie den natürlichen Killerzellen, besitzen im Gegensatz zu diesen aber einen TCR.  $\gamma\delta$ -T-Zellen sind zytotoxisch, sezernieren multiple Zytokine, präsentieren Antigene und können eine Immunsuppression bewirken.

Natürliche Killerzellen wurden erstmalig in den frühen 70er Jahren als „Null-Zellen“ beschrieben, welche spontan Tumorzellen abtöten können. Forschungsergebnisse machten deutlich, dass diese Zellen nicht nur zytotoxische Fähigkeiten haben, sondern über Zell-zu-Zell Kontakt und mittels Zytokinen das adaptive Immunsystem beeinflussen. NK-Zellen entwickeln sich als eigenständige Lymphozyten-subpopulation unabhängig vom Thymus und machen 5% der peripheren Lymphozyten aus. Ihre Proliferation erfolgt im Knochenmark nach Stimulation durch IL-2, IL-15 und IL-21. Genauer ist hierüber nicht bekannt. Als typische Oberflächenmarker exprimieren reife NK-Zellen unter anderem CD56 und CD16. Im Gegensatz zu HLA-abhängigen Lymphozyten exprimieren NK-Zellen weder einen TCR noch CD3. Sie erkennen ihre Zielzellen somit MHC-unabhängig. NK-Zellen, welche MHC-I Moleküle registrieren, werden in ihrer eigenen Zytotoxizität und Zytokinsekretion gehemmt. Befinden sich auf infizierten oder tumorösen Zellen keine bzw. zu wenig MHC-I Moleküle und werden gleichzeitig aktivierende Rezeptoren gebunden, erfolgt die Elimination der Ziel-Zellen durch NK-Zellen. Aktivierende Rezeptoren sind zum Beispiel CD69, CD16 oder CD2. Wie im einzelnen Tumorzellen oder virusinfizierte Zellen erkannt und vernichtet werden, ist nicht komplett erforscht. NK-Zellen vernichten zudem Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Pilze, Protozoen und intrazelluläre Bakterien, wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis*.

Ihre Funktion als Killerzelle und ihre eigene Proliferation wird durch IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, IL-18 und vor allem durch Interferone stimuliert. Die NK-Zellen selbst produzieren IL-4, IL-12, TNF- $\alpha$  und INF- $\gamma$  und initiieren dadurch die TH1-Immunantwort. INF- $\gamma$  und IL-12 fördern wiederum die Proliferation von T4- und T8-Gedächtniszellen.

In Betrachtung der Ergebnisse ist auffällig, dass die Graphen der Abbildung 17 und 19 sowie 18 und 20 einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Das heißt, die Absolutzahlen der  $\gamma\delta$ - und NK- Zellen sinken bis zum vierten postoperativen Tag und steigen dann wieder leicht an, während der prozentuale Anteil beider Parameter in der Placebogruppe erst am 4. postoperativen Tag sinkt und auf diesem Niveau verharrt. In der Verumgruppe steigt der prozentuale Anteil der  $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen zunächst an und fällt am 4. postoperativen Tag auf ein Minimum ab. Der Verlauf entspricht dem prozentualen Anteil der CD8-positiven Lymphozyten. Obwohl die erwähnten prozentualen Werte zwischen der Verum- und Placebogruppe zum ersten postoperativen Tag different verlaufen, wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht.

Es gibt nur wenige Studien, welche sich mit der Assoziation von Synbiotika und diesen beiden Zellreihen befassen. Rayes et al. und Nagao et al. konnten in ihren Untersuchungen keine Veränderungen der NK-Zell-Anzahl im Rahmen einer Synbiotikaadministration bei operierten bzw. bei gesunden Probanden erkennen [136, 121]. Castellazzi et al. wiederum konnten in ihrer *in vitro* Studie einen signifikanten Anstieg der NK-Zellmenge nach Stimulation mit *L. paracasei* und *L. salivarius* nachweisen [34]. Gill et al. beobachteten eine signifikant erhöhte NK-Zellkonzentration bei älteren Menschen nach dreiwöchiger Einnahme von *B. lactis* HNO19 [59]. Da hier die LAB-Administration mehr als eine Woche betrug, ist es möglich, dass die Einnahmedauer von 5 Tagen in unserer Studie zu kurz war, um eine Veränderung der NK-Zellmenge in der Verumgruppe bewirken zu können.

In vielen anderen Studien wird anstatt der NK-Zell-Konzentration die NK-Zell-Aktivität bzw. Zytotoxizität gemessen. Sie beschreibt die Fähigkeit der NK-Zellen zur Lyse einer definierten Anzahl von zum Beispiel Tumorzellen innerhalb einer definierten Inkubationszeit. Im Bereich der Krebsforschung ist der Begriff Tumor-Killing-Test geläufig und gilt als Maß für die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen. Erkrankungen an altersbedingten Tumoren oder malignen Infektionen im Alter ab 75 Jahren wird beispielsweise auf eine Reduktion der NK-Zell-Zytotoxizität zurückgeführt [118]. Auf welche Weise NK-Zellen „altern“ ist nicht im Detail geklärt.

In einer Studie von Ben-Eliyahu et al. zeigten Mäuse nach einem chirurgischen Eingriff einen innerhalb von Stunden einsetzenden Abfall der NK-Zellaktivität [13]. Eine Woche nach der Operation lagen die Werte wieder im Normbereich. Eine Steigerung der NK-Aktivität wurde tierexperimentell in einer Untersuchung von Tsai et al. 2008 demonstriert, in welcher Mäuse bis zu 9 Wochen LAB erhalten hatten. Bei wöchentlichen Pausen zwischen den Gaben konnte keine NK-Affektion festgestellt werden, so dass der Autor eine zeitabhängige Affektion der NK-Aktivität annimmt [177]. Den gleichen Effekt von LAB auf die NK-Zellaktivität wies Hori et al. 2003 nach. In ihrer Studie erhielten Mäuse 2 Monate L. casei [71]. In der Untersuchung von Nagao et al. an gesunden Probanden, welche für 3 Wochen täglich Yakult 400® getrunken hatten, konnte ebenfalls eine Steigerung der NK-Zellaktivität gemessen werden, welche nach einer Administration von 3 Wochen am stärksten ausgeprägt und bei Probanden mit initial sehr niedriger NK-Zellaktivität (<45%) besonders effektiv war [121]. Die Autoren schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass besonders Menschen mit niedriger NK-Aktivität von einer LAB-Gabe profitieren könnten. Hierunter fallen zum Beispiel Patienten mit autoimmunen oder malignen Erkrankungen sowie ältere Menschen. Die Ergebnisse wurden allerdings in der tierexperimentellen Studie von Roller et al. nicht bestätigt. Eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität oder eine Veränderung der Lymphozytenpopulation konnte durch eine vierwöchiger Administration von Synbiotika nicht bewirkt werden [142].

Bezüglich der  $\gamma\delta$ -T-Zellen gibt es nur sehr wenige Arbeiten, mit welchen unsere Ergebnisse zu vergleichen sind. Ahlers et al. ermittelten 2005 in ihrer klinischen Arbeit eine passagere Steigerung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen unter einer induzierten Hyperthermie des Körpers von 41,8 bis 42,2°C. Die erhöhte Konzentration wurde als Reaktion einer allgemeinen Stresssituation gewertet [2]. Aussagekräftige Studien bezüglich einer möglichen Beeinflussung der  $\gamma\delta$ -T-Zellen durch Synbiotika gibt es nicht. Insgesamt ergaben sich in unserer Studie keine Hinweise für eine auf die Synbiotika zurückzuführende Veränderung der NK- oder  $\gamma\delta$ -T-Zellen.

## **5.7 Aktivierungsmarker**

### **5.7.1 CD25-positive T-Zellen und HLA-DR-positive T-Zellen**

CD25 ist ein Bestandteil des IL-2 Rezeptors und wird von T- und B-Zellen mit Effektorfunktionen sowie von aktivierten Monozyten exprimiert bzw. freigesetzt. In löslicher Form üben CD25-Moleküle eine regulatorische Funktion aus, indem sie mit

Zell-gebundenen CD25-Molekülen um IL-2 konkurrieren und so zum Beispiel die Aktivierung von T4-Zellen hemmen.

CD25-positive T4-Zellen werden im Thymus geformt, nehmen im Verlauf 5 bis 10% der peripheren T4-Zellen ein und sind bei der Differenzierung von „eigen“ und „fremd“ von besonderer Bedeutung. Funktionell gelten die T4-Zellen als regulatorische Zellen, welche eine überschießende Immunantwort verhindern können. Defekte dieser Zellfunktionen führen u.a. zu polyautoimmunen Syndromen.

Mittels Zell-zu-Zell-Kontakt können aktivierte CD25-positive T4-Zellen die Zytokinproduktion und die Zellproliferation von T4- und T8-Zellen hemmen. Der Hauptmechanismus liegt dabei in der Inhibition der IL-2-Produktion. Interleukin-2 dient vor allem dem Wachstum von T-, B- und NK-Zellen und fördert zudem deren Effektorfunktionen. Erstmals wurde IL-2 1976 als „T cell growth factor“ beschrieben. Aufgrund der stimulierenden Fähigkeiten wird IL-2 in der Klinik immunmodulatorisch zur Bekämpfung von malignen Tumorzellen intravenös verabreicht.

CD25 und HLA-DR gelten als Marker für den Aktivierungszustand von T-Zellen. Hierbei steht HLA für „humane Leukozyten-Antigen“ und ist ein Glykoprotein, welches entsprechend dem kodierenden Genort (major histocompatibility complex) auch MHC-Molekül genannt und der Ig-Superfamilie zugeordnet wird. Es ist Bestandteil der Leukozytenmembran und weist einen großen Polymorphismus auf, weswegen es nach neueren Erkenntnissen eher eine polymorphe peptidpräsentierende Struktur ist. Die HLA-Moleküle werden je nach ihrem strukturellen Aufbau in Klasse I und Klasse II eingeteilt. Peptide endogenen Ursprunges werden an HLA-Klasse-I-Strukturen gebunden und auf diesem Wege von kernhaltigen Zellen auf Ihrer Oberfläche präsentiert. Da HLA der Klasse I an CD8-Moleküle bindet, werden hauptsächlich T8-Zellen von HLA-I stimuliert. HLA-II-Moleküle präsentieren Peptide von endogenem und exogenem Ursprunges. Zudem werden sie hauptsächlich von antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Lymphozyten exprimiert und binden vor allem CD4-Moleküle. HLA-II aktiviert somit T4-Zellen spezifisch.

Wie auch CD25 spiegelt die Konzentration von HLA-DR-Molekülen auf der Zellmembran die Zellaktivität wider. Zum Beispiel zeigten Untersuchungen an Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa signifikant erhöhte Konzentrationen von T4- und T8-Zellen sowie von HLA-DR-positiven T4-Zellen in der Lamina propria.

Des Weiteren wurden bei diesen Patienten signifikant erhöhte CD25-Konzentrationen im Serum gemessen [151]. Bei behandelter oder nicht aktiver Colitis trat dies nicht auf. Aufgrund ihrer Funktion sind HLA-Moleküle u.a. wichtige Faktoren bei der Erkennung von „eigen“ und „fremd“ und spielen eine große Rolle bei Autoimmunerkrankungen, Allergien und Transplantationsabstoßungen.

Da CD25 und HLA-DR auf einer Vielzahl von Zellen vorkommt, ist die Aktivität gegenüber deaktivierten Zellen durch eine vermehrte Expression zu erkennen. Deshalb ist die Dichte der CD25- und HLA-DR-Strukturen in der Membran von Bedeutung und kann zytometrisch erfasst werden.

In unseren Messungen wurde am ersten postoperativen Tag bei den T-Lymphozyten ein signifikanter Unterschied des prozentualen Anteiles der CD25-positiven und der HLA-DR-positiven T-Lymphozyten in der Placebogruppe ermittelt. Während es bei den CD25-positiven T-Zellen in der Placebogruppe zu einem deutlichen Anstieg kam, blieb die Konzentration in der Verumgruppe am zweiten Messtag fast unverändert. Bezüglich der HLA-DR-Signifikanz stieg der prozentuale Anteil aktivierter Lymphozyten in der Verumgruppe nicht so stark wie in der Placebogruppe. Ein Anstieg der CD25- und HLA-DR-Expression nach einer Operation oder Verletzung ist physiologisch und wurde in einer *in vitro* Untersuchung von Reddy et al. gut dargestellt. Nach separater Stimulation von Lymphozyten mit Phytohämagglutinin (PHA) oder Staphylococcus Enterotoxin stieg die CD25- und HLA-DR-Expression innerhalb von 24 Stunden stark an [139]. In einer *in vivo* Untersuchung von Wakefield et al. zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Anstieg der HLA-DR-Expression einen Tag nach einer Operation [185].

In unserer Studie konnte der postoperative Anstieg der Aktivierungsmarker bestätigt werden. Allerdings wurde die Expression in der Verumgruppe signifikant supprimiert. Eine reduzierte Expression von HLA-DR erhöht nach Wakefield et al. das Risiko einer postoperativen Infektion. Andererseits war der prozentuale Anteil an HLA-DR positiven Lymphozyten bei Sepsispatienten in der Studie von Tschakowsky et al. signifikant erhöht, insbesondere bei denen, die nicht überlebt haben [178]. In einer Untersuchung von Gill et al. an älteren Menschen bewirkte die orale Einnahme von *B. lactis* HNO19 einen Anstieg der CD25-positiven Lymphozyten, was mit einer verbesserten zellulären Immunität bewertet wurde [59]. Zudem konnte in der Studie von Pronio et al. nach 3, 6 und 12 Monaten Synbiotikaadministration bei Patienten mit indizierter OP bei Pouchitis an allen Messzeitpunkten keine signifikanten

Unterschiede bezüglich der CD25-positiven T4-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden [135]. Roessler et al. führten eine Studie durch, in der Patienten mit atopischer Dermatitis 8 Wochen *L. paracasei*, *L. acidophilus* und *Bifidobacterium lactis* erhielten. Ähnlich den unseren Ergebnissen konnten die Autoren keine signifikanten Unterschiede bezüglich der CD3-positiven T-Zellen, der CD19-positiven B-Zellen, der CD3-positiven T8-Zellen und der NK-Zellen feststellen [141]. Im Gegensatz zu unserer Studie zeigte sich dort keine Veränderung der HLA-DR-positiven T-Zellen. Tierexperimentell führte die Gabe von *L. plantarum* bei Ratten mit induzierter Enterokolitis zu einer Zunahme CD25-positiver Zellen in der Lamina propria [119].

Zusammenfassend scheint eine verminderte Expression von HLA-DR und CD25 auf T-Lymphozyten ein Zeichen einer verminderten Immunität zu sein. Da in der Verumgruppe am zweiten Messtag eine signifikant verminderte Expression dieser Aktivierungsmarker im Vergleich zu Placebo gemessen worden ist, kann ein immunstabilisierender Effekt der Synbiotika angezweifelt werden.

#### 5.7.2 CD45RA- und CD45RO-positive T-Zellen

CD45 ist ein auf allen Leukozyten vorkommendes Membranmolekül, welches in der CD45RO-Isoform Gedächtnis-T-Zellen und in der CD45RA-Isoform ruhende (naive) T-Zellen charakterisiert. Die Differenzierung gestattet somit eine Beurteilung der Zellaktivität in „ruhend“ und „aktiv“. Nach antigener oder mitogener Stimulation bildet sich zunächst eine Übergangsform der Membranmoleküle heraus, in welchen beide Isoformen in der Zellmembran einer Zelle vorkommen. Diese Zellen können entsprechend ihrer Isoformen mit dem Zusatzkürzel „high“ oder „low“ versehen werden, wie zum Beispiel  $CD45RO^{low}/RA^{low}$ . Ruhende T-Zellen produzieren vornehmlich IL-2, während aktivierte T-Zellen zusätzlich IL-3, IL-4, IL-6 und INF- $\gamma$  sezernieren. IL-2 wird deshalb als zusätzlicher Marker der Aktivität von CD45RO- bzw. CD45RA-positiven T-Zellen verwendet. Die Umwandlung der T-Zell-Isoformen nach Aktivierung beanspruchte in einer *in vitro* Studie einige Tage, wobei der „RA-RO-Switch“ nie komplett war, d.h. immer beide Isoformen auf einer Zelle nachzuweisen waren [116].

CD45RA-Isoformen sind stärker auf den TH1-Zellen zu finden und CD45RO-Isoform kennzeichnen TH2-Zellen. T-Zellen mit einer hohen Helferfunktion besitzen kaum CD45RA-Antigene, während solche mit geringem Helferpotential einen hohen Anteil

von CD45RA-Antigenen besitzen. In den sekundären Lymphorganen finden sich hauptsächlich T-Zellen mit hoher Helferfunktion, d.h. solche mit vielen CD45RO-Strukturen. Und da die Mehrheit der intestinalen Lymphozyten Gedächtnis-T-Zellen sind, exprimieren auch diese CD45RO. Da die Gedächtnis-T-Zellen meist HLA-DR-II auf ihrer Oberfläche tragen, differenzieren sie zu TH1-Lymphozyten, welche vorrangig INF- $\gamma$  sezernieren [155].

In unseren Messungen sinken die CD45RO mean Werte der T4-Lymphozyten in der Placebogruppe bis zum 8 postoperativen Tag kontinuierlich ab, während in der Verumgruppe ein inkonstanter Verlauf zu erkennen ist. Nach einem kurzzeitigen Anstieg der CD45RO-Expression der T4-Zellen am ersten postoperativen Tag, sinkt die Expression, um am 8 postoperativen Tag wieder deutlich anzusteigen.

Die CD45RA-Expression auf T4-Zellen verändert sich in ihrem Ausmaß bis zum ersten postoperativen Tag kaum und steigt am 4. postoperativen Tag in beiden Gruppen an. Während am 8. postoperativen Tag ein Abfall in der Placebogruppe vorliegt, steigt die Expression in der Verumgruppe weiter an, ohne dass ein signifikanter Unterschied auftrat.

In einer *in vitro* Studie von Akbar et al. stieg die CD45RO-Expression nach 3 Tagen Stimulation mit PHA kontinuierlich von ca. 5% auf 95% der Zellen an. Bei anhaltender Stimulation mit PHA verblieb die Isoform CD45RO der CD4- und CD8 - positive Zellen bei über 95% [3]. Eine kontinuierliche Stimulation der T4- und T8-Lymphozyten ist nach Akbar et al. in unserer Untersuchung somit unwahrscheinlich, da CD45RO auf beiden Zellpopulationen kontinuierlich sinkt. Andererseits kann die Messdauer zu kurz sein, um einen Wiederanstieg registrieren zu können. Bezüglich der CD45-Isoformen der T8-Zellen ist insgesamt ein tendenzieller Anstieg von CD45RA auf Kosten von CD45RO zu beobachten, wobei keine Signifikanzen im Gruppenvergleich gemessen wurden.

Begründungen für diesen Verlauf sind rein spekulativ, da nur wenige Untersuchungen bezüglich einer Assoziation zwischen CD45-Isoformen und der Einnahme von Synbiotika existieren. Es ist jedoch auffällig, dass unsere Messwerte der CD45RO-positiven T-Lymphozyten eine große Streubreite aufweisen. Insgesamt ergaben sich zwischen der Verum und der Placebo keine Signifikanzen, so dass die Ergebnisse von Rayes et al. durch unsere Messungen bestätigt werden [136].

## 5.8 Zytokine

Zytokine sind Proteine, welche von Zellen des Immunsystems freigesetzt werden und an bestimmte Zytokinrezeptoren anderer Zellen oder der eigenen mit hoher Affinität binden. Sie üben proinflammatorische oder immunregulatorische Funktionen aus und können als Wachstumsfaktor fungieren. Manche Transmitterstoffe dienen der Zelldifferenzierung (TH1, TH2) und manche helfen bei der Zellidentifizierung, wie zum Beispiel IL-2 bei der Erkennung aktivierter CD45RA-positiver T-Zellen.

In ihrer Nomenklatur besteht keine Einigkeit. Einige Zytokine werden Interleukine (IL) und andere Interferone (INF) oder Tumornekrosefaktoren (TNF) genannt. Die in dieser Studie untersuchten Zytokine Interleukin 10, Interleukin 12 und Interferon  $\gamma$  werden hauptsächlich von aktivierten CD4- und CD8-positiven T-Zellen gebildet und sind Transmitterstoffe mit regulatorischer Wirkung auf unspezifische Effektorzellen, wie z.B. Phagozyten, Neutrophile und NK-Zellen. IL-12 und INF- $\gamma$  fördern zudem das Wachstum und die Differenzierung der Lymphozyten.

In den Diagrammen wird deutlich, dass der Verlauf von IL-10 gegensätzlich zu denen von IL-12 und INF- $\gamma$  ist. Die IL-12- und die INF- $\gamma$ -Konzentrationen sinken in unseren Messungen im Gegensatz zur IL-10-Konzentration zunächst ab. Am 8. postoperativen Tag haben sich die Konzentrationen der einzelnen Interleukine auf das Ursprungsniveau zurückgebildet. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Verum- und Placebogruppe ließ sich zu keinem Zeitpunkt eruieren.

Maassen et al. untersuchten verschiedene LAB-Stämme auf ihre Fähigkeit, die mukosalen Konzentrationen von INF- $\gamma$  und IL-10 zu beeinflussen. Sie konnten immunhistologisch keine signifikante Induktion von INF- $\gamma$  und IL-10 durch LAB feststellen [99]. Für das negative Ergebnis könnte die Wahl der Probiotika verantwortlich gewesen sein, welche zu den physiologischen Darmmikroben gehören und so als geringgradig immunogen gelten. Hessle et al. untersuchten nicht Probiotika im eigentlichen Sinne, sondern beobachteten die Wirkung von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien auf die IL-10- und IL-12-Konzentrationen. Dabei erwiesen sich Gram-positive Bakterien, wozu auch Milchsäurebakterien gehören, als deutlich stärkere IL-12-Stimulatoren und Gram-negative Bakterien als Stimulatoren einer vermehrten IL-10-Produktion. Ob es sich hierbei um tote, lebende, aerobe oder anaerobe Bakterien handelte, hatte keinen Einfluss auf die Stärke der Stimulation. Nach Gabe von AK gegen IL-10 änderte sich das Verhältnis nicht; Gram-positive Bakterien führten weiterhin zu einer deutlich höheren IL-12-

Konzentration [66]. Eine aufgrund ihrer gegensätzlichen Funktion anzunehmenden Interaktion von IL-10 und IL-12 konnte in der Untersuchung von Hesse et al. nicht gezeigt werden. Zeuthen et al. konnten in ihrer Studie allerdings beobachten, dass Gram-positive Bifidobakterien im Vergleich zu allen anderen getesteten Bakterien die IL-10-Produktion signifikant steigerten. Die Familie der Gram-negativen Enterobacteriaceae hingegen induzierte stark die IL-10-Immunantwort. Insgesamt fanden Zeuthen et al. heraus, dass sich die Kapazitäten der Bakterien proinflammatorische oder antiinflammatorische Zytokine zu produzieren, stark in Abhängigkeit von der Gattung, der Art und des Stammes unterscheiden [196]. Die genauen Mechanismen der durch Milchsäurebakterien induzierten differentiellen Immunantworten sind noch nicht abschließend geklärt.

#### 5.8.1 Interleukin 10

IL-10 wird auch Cytokine-Synthesis Inhibitory Factor (CSIF) genannt und v.a. von TH2-Zellen und Monozyten sezerniert. IL-10 hemmt die Bildung von TNF- $\alpha$ , IL-2 und IL-6 durch AG-präsentierende Zellen. Es behindert so indirekt die Aktivierung von T-Lymphozyten, stimuliert die B-Lymphozyten zur Proliferation und fördert die TH2-Antwort. In Anwesenheit von Monozyten und APC hemmt IL-10 die INF- $\gamma$  Produktion in NK-Zellen. In Anwesenheit von IL-12 hingegen stimuliert IL-10 die INF- $\gamma$  Produktion mittels NK-Zellen. Insgesamt zählt es zu den antiinflammatorischen Zytokinen und spielt eine große Rolle bei der Immuntoleranz [61].

Bei unseren Messungen steigt die IL-10 Konzentration am ersten postoperativen Tag in beiden Gruppen deutlich an. Am 3. Messtag liegt die Konzentration im Bereich des Ausgangswertes und ist zum 8. postoperativen Tag wieder leicht angestiegen. Ähnliche Beobachtungen haben Grzelak et al. gemacht [62, 125]. Sie untersuchten Veränderungen der Zytokinkonzentrationen im Rahmen kleinerer elektiver Operationen und beobachteten, dass IL-10 am ersten und dritten postoperativen Tag leicht anstieg. Eine erhöhte Konzentration von IL-10 zeigte sich auch bei Septikämien, wobei die Höhe der Konzentration mit der Schwere der Erkrankung korrelierte [55, 109, 110]. Es wurde geschlossen, dass eine gesteigerte IL-10-Produktion eine überschießende Immunantwort verhindert.

In einer Studie von Drake et al. wurde deutlich, dass die Freisetzung von IL-10 abhängig von der Milchsäurebakterienart, der verabreichten Dosis und der Substitutionsdauer ist. Probiotika stimulierten in ihrer Studie die IL-10-Produktion

deutlich besser als Phosphat Buffered Saline (PBS) oder E. coli [47]. Wobei erst ab einer Konzentration von  $10^7$  Organismen/ml ein signifikanter IL-10-Anstieg beobachtet wurde. Zudem konnten Drakes et al. erst nach drei Tagen Substitution einen positiven Effekt zugunsten der Verumgruppe messen. Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Untersuchung von Christensen et al., wo sich zeigte, dass dosisabhängig L. casei die Produktion von IL-12 fördert und L. reuteri diese hemmt [37]. Die Freisetzung von IL-10 wurde hingegen von beiden Stämmen additiv stimuliert. Madsen et al. konnten 2001 in ihrer Studie mit IL-10-Knock-out-Mäusen eine Normalisierung der Magendarmintegrität und eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokinproduktion durch die Administration von Synbiotika nachweisen [102].

Zusammenfassend führen bereits kleinere Traumata zu einem Anstieg der immunregulatorisch wirksamen IL-10-Konzentration. Einige Studien weisen darauf hin, dass Probiotika die Freisetzung von IL-10 in Abhängigkeit von der Probiotikazusammensetzung, der verabreichten Dosis und der Substitutionsdauer stimulieren können. In unserer Studie konnte eine Modulation der IL-10-Konzentration durch Synbiotika nicht belegt werden und bestätigt somit die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchung von Pathmakanthan et al. und die der *in vivo* Studie von Yokoyama et al. [129, 194].

### 5.8.2 Interleukin 12

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin, welches hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert wird. Die Hauptfunktion besteht in der Initiierung und Stimulierung der TH1-Immunantwort. Es fördert zudem die Zytotoxizität von NK-Zellen und die Differenzierung von T8-Zellen zu reifen zytotoxischen T-Zellen. Da IL-12 die TH1-Immunantwort polarisiert, spielt IL-12 eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen. Bei Probanden, welche an einer Autoimmunerkrankung litten, verstärkte die Gabe von IL-12 die Beschwerden. Tierexperimentell führte die Neutralisation von IL-12 zur Verbesserung der Symptome einer induzierten Nussallergie [175]. Therapeutisch besteht der Ansatz, IL-12-Antikörper beim Morbus Crohn einzusetzen [108].

In unserer Untersuchung nimmt die Konzentration von IL-12 zum ersten postoperativen Tag in beiden Gruppen ab. Anschließend steigt in der Placebogruppe die Konzentration bis zum letzten Messtag leicht an, wohingegen die Konzentration

in der Verumgruppe etwas absinkt und zum 8. postoperativen Tag wieder steigt. Das Signifikanzniveau von 0,05 wird nicht erreicht.

Im Gegensatz hierzu wiesen Hessle et al. in einer *in vitro* Studie nach, dass *L. paracasei* und *L. plantarum* die IL-12-Produktion dosisabhängig stimulieren [66]. Zudem hatte sich gezeigt, dass Milchsäurebakterien humane dendritische Zellen (DC) zu einer vermehrten IL-12-Produktion stimulieren und auf diesem Weg die TH1-Immunantwort fördern. *E. coli*-LPS hingegen stimulierte nicht ein bestimmtes Interleukin, sondern bewirkte eine vermehrte Ausschüttung von IL-10 und IL-12. Die Stimulation von DC mit *L. reuteri* führte bei Mäusen zu einer bevorzugten TH2-Immunantwort [37]. Kato et al. hatten in ihrer tierexperimentellen Studie eine durch *L. casei* induzierte erhöhte IL-12-Konzentration gemessen und herausgefunden, dass diese Konzentrationserhöhung von einer gesteigerten Sekretion der Makrophagen herrührte. *L. casei* förderte somit über die Aktivierung von Makrophagen die TH1-Immunantwort [82]. Zeuthen et al. belegten, dass die durch Milchsäurebakterien induzierte Zytokinproduktion je nach Stamm variieren kann und Gram-negative Bakterien wie *E. coli* ähnliche Konzentration von IL-10 und IL-12 hervorbringen. Im Gegensatz zu Hessle et al. konnte jedoch keine generelle Einteilung in Gram-negativ oder Gram-positiv induzierter Immunreaktion anhand der Zytokinausschüttung gemacht werden [196]

Bisher konnten die tierexperimentellen und die *in vitro* Ergebnisse nicht in humanen Studien bestätigt werden. Auch in unserer Studie zeigte sich kein Unterschied zwischen Placebo und Verum bezogen auf die IL-12-Konzentration.

### 5.8.3 Interferon $\gamma$

INF- $\gamma$  ist ein Protein, welches v.a. von TH1-Zellen nach Kontakt mit Makrophagen und NK-Zellen gebildet wird. Es wirkt immunstimulierend, antiviral und antihumoral. INF- $\gamma$  stimuliert MHC I und MHC II vieler Zellen, so dass es die humorale und die zelluläre Immunantwort verstärkt. Zudem fördert es die Differenzierung der TH1-Zellen und hemmt die der TH2-Zellen. Die Produktion von INF- $\gamma$  und Proliferation mononukleärer Zellen, welche Interferon  $\gamma$  produzieren, werden MHC II abhängig v.a. von Gram-positiven Bakterien stimuliert [65]. In der Klinik dient INF- $\gamma$  u.a. als Therapieoption bei TH2-dominierenden Krankheitsformen, wie zum Beispiel Infektionen mit Mykobakterien und wird, weil es auch die IgE-Produktion blockiert, bei allergischen Erkrankungen eingesetzt. Eine INF- $\gamma$ -Therapie ist zudem bei

Infektion mit dem Hepatitis B Virus indiziert. Die von INF- $\gamma$  supprimierten TH2-Lymphozyten produzieren in hohem Maße IL-10. Eine TH1/TH2-Imbalance konnte bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen, Infektionen und Tumoren beobachtet werden. Für eine Verschiebung in Richtung TH2-Immunantwort bei postoperativen Komplikationen wird INF- $\gamma$  verantwortlich gemacht [111].

Im Verlauf ergaben sich in unserer Studie, wie auch für die anderen gemessenen Transmitterstoffe keine Signifikanzen zwischen Verum und Placebo. In beiden Gruppen sank die INF- $\gamma$ -Konzentration kontinuierlich bis zum 3. Messtag ab. Am 8. postoperativen Tag waren die Werte mit den präoperativen Messungen vergleichbar. Pathmakanthan et al. untersuchten 2004 die Zytokinproduktion durch mononukleare Zellen im gesunden Kolon nach Administration von *L. plantarum*. Sie konnten einen signifikanten Anstieg von INF- $\gamma$ -Konzentration nach Stimulation mit *E. coli* beobachten. In einer tierexperimentellen Studie von Perdigon et al. wurden 7 Tage LAB oral verabreicht und unter anderen die Zytokinkonzentrationen sowie die TH1- und TH2-Populationen gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte die Verumgruppe eine dosisabhängige signifikante Erhöhung der IFN- $\gamma$ -Konzentration. Das Ausmaß variierte in Abhängigkeit des untersuchten LAB-Stammes. Eine Erhöhung der TH2-Population konnte für *L. acidophiles*, *L. bulgarius* und *L. casei* nachgewiesen werden. Ein Anstieg der TH1-Population wurde nur bei *L. acidophiles* beobachtet [131, 132, 113]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen ergaben sich bei den Untersuchungen von Nagao et al. an gesunden Probanden keine Unterschiede bezüglich der IFN- $\gamma$ -Konzentration nach dreiwöchiger oraler LAB-Einnahme [121]. Die differenten Ergebnisse sind am ehesten auf ein unterschiedliches Studiendesign zurückzuführen. Nagao et al. hat die Konzentrationen im humanen peripheren Blut, Perdigon et al. in histologischen Proben des menschlichen Dünndarmes und McCarthy des tierischen Darmes gemessen.

Cima et al. fanden tierexperimentell heraus, dass eine Verringerung der intestinalen Glukokortikoidsynthese zu einem signifikanten Anstieg der T-Zell-Aktivität führt und parallel die INF- $\gamma$ -Ausschüttung zunimmt. Lokal gebildete Kortikosteroide wirken immunsuppressiv, indem sie die Aktivierung der T-Zellen im GIT eingrenzen [38]. Dieser Effekt war nur 3 Stunden nach Glukokortikoidstimulation nachzuweisen, so dass eine Geninduktion den Anstieg nicht erklärt. Es wurde vermutet, dass kostimulierende Effekte der Glukokortikoide die TCR-vermittelte intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen und so die T-Zell-Aktivität steigern.

Die genannten Studien unterstützen die Theorie, dass Probiotika die Produktion von antientzündlichen Zytokinen fördern und dieser Effekt von der Dauer, der Art und der Konzentration der Probiotika abhängig ist. Im Vergleich zu unserer Studie ist zu erwähnen, dass die Bestimmungen der Zytokinkonzentrationen der angegebenen Quellen hauptsächlich auf mukosaler Seite, tierexperimentell oder *in vitro* gemessen wurden. In unserer Studie konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum und Placebo bezüglich der INF- $\gamma$ -Konzentrationen ermittelt werden.

## 5.9 IgA im Serum

In den Plasmazellen des Knochenmarkes und den sekundären Lymphorganen werden monomere Immunglobuline gebildet, zu welchen auch Immunglobulin A (IgA) gehört. Die Plasmazellen des Stratum proprium produzieren hingegen ein dimeres IgA, welches zusätzlich eine „sekretorische Komponente“ aufweist und sekretorisches IgA (slgA) genannt wird. Die erwähnte Komponente hat eine besonders hohe Affinität zu den „polymeric Ig-receptor“ der Mukosazellen und ist Voraussetzung für das Durchschleusen von luminalen slgA durch die Mukosa. slgA überzieht die Mukosa wie ein Schutzfilm und ist für die Bakterienagglutination verantwortlich. Zudem kann slgA ohne Anwesenheit von Komplement oder Makrophagen bakterielle Toxine binden und virusneutralisierend wirken. Lokal kann slgA die Attraktion von Neutrophilen, Eosinophilen und Monozyten supprimieren und die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  reduzieren. Es verhindert somit eine überschießende Immunantwort auf Nahrungsbestandteile. Da slgA im Gegensatz zum Serum-IgA vorwiegend Immunkomplexe bildet, können Antigene vor Ort eliminiert werden, ohne eine Sensibilisierung hervorzurufen. Funktionsdefizite auf dieser Ebene spielen eine wichtige Rolle bei Nahrungsmittelallergien. Über die Lymphbahnen gelangt das slgA z.T. in die Blutbahn. Zwischen Serum- und sekretorischen IgA wurde in unserer Studie nicht differenziert.

Aus unseren Berechnungen geht hervor, dass nach einem deutlichen Abfall der IgA-Konzentration am ersten postoperativen Tag am letzten Messtag eine Annäherung an den Ursprungswert erreicht wurde. Eine signifikante Konzentrationsveränderung zwischen Verum und Placebo stellte sich nicht dar.

Im Vergleich zu den Berechnungen von Möller et al. zum gleichen Patientengut wie in dieser Studie steigt die IL-6-Konzentration in beiden Gruppen auf das 250fache

am ersten postoperativen Tag an. Da IL-6 die Entwicklung von IgA-produzierenden B-Zellen fördert, ist ein Anstieg der IgA-Konzentration postoperativ zu erwarten.

Perdigon et al. konnten in einer tierexperimentellen Studie eine dosisabhängige Zunahme von IgA-produzierenden Zellen an histologischen Proben nach oraler LAB- und Joghurtgabe nachweisen. Dieses Phänomen begründeten sie mit einer lokal vermehrten Zytokinproduktion durch TH-Zellen [130]. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten Roller et al. In ihrer tierexperimentellen Studie konnte in der Verumgruppe eine gesteigerte sIgA Konzentration im Ileum ermittelt werden. Im peripheren Blut spiegelte sich dies nicht wider [142]. In einer der unseren ähnlich aufgebauten Studie von Woodstock et al. an 22 Patienten mit großen abdominal-chirurgischen Eingriffen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der IgA-Konzentration der Lamina propria und der mukosalen IgA-Spiegel bei Administration von *L. plantarum* 299v gezeigt werden [193]. Unsere Ergebnisse bestätigen somit die Resultate von Woodstock et al. und Roller et al.

Zusammenfassend konnte in tierexperimentellen Arbeiten eine lokale darmassoziierte Beeinflussung der IgA-Konzentration gesichert werden. Eine Veränderung der IgA-Konzentration im peripheren Blut infolge einer LAB Administration konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

## 6 KLINISCHER AUSBLICK

Die im Rahmen wissenschaftlicher Untersuchungen erlangten Ergebnisse führen uns einerseits zu neuen Möglichkeiten der Anwendung von Synbiotika und werfen andererseits neue Fragen auf. Vordringlich gilt es zu klären, welches Patientenklientel von welcher Kombination aus Prä- und Probiotika profitiert. In Anbetracht der großen Vielfalt von Probiotika, der großen Interaktionsbreite zwischen Prä- und Probiotika sowie die immense Anzahl beeinflussbarer Faktoren des Immunsystems wird deutlich, wie schwierig es ist, diese Anforderungen zu erfüllen. Zudem ist noch nicht abschließend geklärt, inwieweit individuelle Eigenschaften des Konsumenten, wie Vorerkrankungen, Ernährungszustand oder Lebensumstände Einfluss auf die Wirksamkeit von Synbiotika haben.

In Metaanalysen, welche klinisch-experimentelle Studien von 2006 und 2007 analysierten, zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse [73, 97, 187, 24]. Einigkeit herrschte allein darüber, dass *in vitro* Studien nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragbar sind. Meydani et al. diskutieren in ihrem Reviewartikel diese Problematik übersichtlich und machen auf Schwierigkeiten im Vergleich von Studien aufmerksam [117]. Bemängelt werden unter anderem die stark differierenden Studiendesigns, die zum Teil fehlenden Kontrollgruppen, die oft sehr kurze Dauer der Untersuchungen und die allgemein geringe Anzahl an *in vivo* Studien.

In unserer *in vivo* Studie wurde untersucht, inwieweit Synbiotic2000® ausgewählte Parameter des Immunsystems beeinflusst. Hierfür wurden Patienten nach zuvor definierten Ein- und Ausschlusskriterien in die Studie eingeschlossen und das perioperativ entnommene Blut analysiert. Zweimal täglich erhielten die Probanden für mindestens 5 Tage Synbiotic2000® via Magensonde oder nahmen diese selbstständig ein. Ein überzeugendes Ergebnis für eine positive Wirkung von Synbiotic2000® konnte nicht erbracht werden. Die signifikante Reduzierung der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR auf T-Lymphozyten in der Verumgruppe könnte gar auf eine negative Beeinflussung des adaptiven Immunsystems hindeuten. Das Fehlen weiterer signifikanter Unterschiede kann durch viele Aspekte begründet werden. Zunächst könnte die Konzentration der verabreichten LAB zu gering gewesen sein. Zu schwache Dosen eines Antigenes werden meist durch dendritische Zellen nur in den Peyer Plaques und mesenterialen LK präsentiert, wohin gegen bei hohen Dosen Antigene von DC, Makrophagen und B-Zellen systemisch präsentiert werden können [90]. Diesbezüglich haben Tiermodelle und

klinische Studien gezeigt, dass eine nach Stimulation mit Probiotika erfolgte Immunmodulation im Bereich der Darmmukosa nicht zwangsläufig zu einer Beeinflussung von Immunparametern im peripheren Blut führt [135]. Da die von uns gewählten LAB-Dosen in anderen Studien Veränderungen des Immunsystems bewirkt hatten, ist eine zu geringe Dosis unwahrscheinlich [138, 137, 59].

Insgesamt gibt es nur wenige *in vivo* Studien, welche sich mit dem Thema Synbiotika und ihr Einfluss auf Immunparameter befassen. Insbesondere fehlt es an Stellungnahmen bezüglich der  $\gamma\delta$ -T-Zellen. Klinische Aspekte waren hingegen häufiger Thema von *in vivo* Studien. In einer Untersuchung von Anderson et al. mit 144 Patienten, welche sich einer großen abdominalen Operation unterzogen, konnten trotz einer deutlich längeren Studiendauer keine Unterschiede zwischen Verum und Placebo in Bezug auf eine bakterielle Translokation, dem Auftreten systemischer Infektionen, einer Sepsis oder der gastralen Kolonisation von Probiotika gefunden werden [4]. Zudem ergaben sich keine auf die Synbiotika zurückzuführenden Veränderungen der CRP- und IL-6-Messungen. Chermesh et al. untersuchten den Einfluss von Synbiotic2000® an 30 Patienten mit Morbus Crohn. Das postoperative Auftreten eines Rezidives, anderer klinischer Aspekte oder Veränderungen von Laborparametern wurden durch die Administration nicht beeinflusst [36]. Synbiotic2000® konnte des weiteren in einer im Oktober 2008 beendeten Multizenterstudie mit 259 Patienten die Rate an Ventilations-assoziierten Pneumonien, der Mortalität und der ICU-Aufenthaltsdauer nicht verringern [85]. Isakow et al. bemängelten in ihrem Übersichtsartikel, dass es bis zum Erscheinen des Artikels im Jahre 2007 keine gut durchdachte klinische Studie gab, welche beweisen konnte, dass Probiotika das Auftreten von nosokomialen Pneumonien oder Clostridien difficile-assoziierten Diarrhoen verhindert [73, 187]. Watkinson et al. fassten in ihrem Übersichtsartikel von 2006 die Ergebnisse placebokontrollierter Studien bei ICU-Patienten zusammen und konnten keinen statistisch signifikanten Vorteil bezüglich der Inzidenz nosokomialer Infektionen, der Dauer des Aufenthaltes auf der Intensivstation, der Sterblichkeit und dem Auftreten von Pneumonien bei der Verwendung von Prä-, Pro- oder Synbiotika erkennen [187]. Besselink et al. führten eine Multicenter-Studie durch, um die Wirksamkeit von Synbiotika bei Patienten mit schwerer Pankreatitis näher zu ermitteln. Die randomisierte, doppelblinde und placebo-kontrollierte Studie an 296 Patienten wurde im Jahre 2008 beendet. Vorteile einer Synbiotikaadministration konnten nicht nachgewiesen werden [21]. Am Beispiel

der Antibiotika-assoziierten Diarrhoe führten McFarland et al. eine Metaanalyse durch, in welcher eine Probiotikaadministration das Auftreten einer Antibiotika-assoziierten Diarrhoe in 13 Studien reduzierte und in 12 Studien die Verumkost keine Vorteile erbrachte [114]. McFarland et al. führten die divergenten Ergebnisse auf die unterschiedlichen Studienpopulationen und -dauer sowie auf die unterschiedlich ausgewählten Bakterienstämme und deren Konzentrationen zurück.

Zusammenfassend ist eine klare Stellungnahme zur Beeinflussung von Synbiotika auf Parameter des Immunsystems nicht möglich. Hierfür ist es notwendig, weitere randomisierte, kontrollierte und multizentrische klinische Studien mit einem gut durchdachten Studiendesign durchzuführen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die Mehrzahl der veröffentlichten Arbeiten, welche sich mit dem Thema Synbiotika und ihr Einfluss auf Parameter des Immunsystems befassen, sind *in vitro* oder tierexperimentelle Studien, die widersprüchliche Ergebnisse erbrachten. Die Autoren sind sich allerdings einig, dass eine direkte Übertragung der Erkenntnisse auf den Menschen nicht möglich ist. In dieser klinischen Studie wurden Parameter des Immunsystems bei 33 Patienten mit großen abdominal-chirurgischen Eingriffen untersucht, um folgende Fragen zu beantworten:

1. Beeinflussen enteral aufgenommene Synbiotika die Konzentration von CD4-positiven und CD8-positiven T-Zellen?
2. Kann die enterale Aufnahme von Synbiotika die Subpopulationen der CD45RO- und CD45RA-positiven T-Zellen beeinträchtigen?
3. Führt die enterale Einnahme von Synbiotika zu einer Aktivierung der T-Lymphozyten gemessen an den Aktivierungsmarkern CD25 und HLA-DR?
4. Wie verhalten sich die Transmitterstoffe Interleukin 10, Interleukin 12 und Interferon  $\gamma$  während des Untersuchungszeitraumes?
5. Welchen Einfluss hat die perioperative Gabe von Synbiotika auf die IgA-Konzentration im Serum?

Am ersten postoperativen Tag konnte in der Verumgruppe eine signifikante Reduktion der Aktivierungsmarker CD25 und HLA-DR nachgewiesen werden. Nach heutiger Studienlage ist dies ein Zeichen einer verminderten Immunität und stellt somit eine positive Wirkung in Frage. Vergleichbare Studien mit ähnlichen Ergebnissen wurden bisher nicht veröffentlicht.

Weitere Signifikanzen konnten nicht ermittelt werden. Insbesondere zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Placebo- und Verumgruppe bezüglich der Konzentrationen von CD4- und CD8-positiven T-Zellen sowie der Konzentrationen von IL-10, IL-12 und INF- $\gamma$ . Des weiteren konnten keine differenten Verläufe der zu vergleichenden Gruppen in der IgA-Konzentration oder der CD45RA- bzw. CD45RO-positiven T-Lymphozyten ermittelt werden.

Als Kritikpunkt dieser Studie sind v.a. die geringe Fallzahl und die kurze Einnahmedauer von mindestens 5 Tagen zu benennen.

Zusammenfassend konnte ein positiver Effekt von Synbiotic2000® auf Parameter des Immunsystems bei Patienten mit abdominal-chirurgischen Eingriffen nicht ermittelt werden.

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungen

AB	Antibiotika
AG	Antigen
AK	Antikörper
APC	Antigen Presenting Cell
ASA	American Society of Anesthesiology
AUC	Area Under the Curve
CD	Cluster of Differentiation
CFU	Colony-Forming Units
CTL	Cytotoxic T Lymphocyt
DC	Dendritic Cell
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FACScan®	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometer
FAE	Follikel-assoziiertes Epithel
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FSC	Forward Scatter
GIT	Gastrointestinaltrakt
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ITN	Intubationsnarkose
LAB	Lactic Acid Bacterium
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LTX	Lebertransplantation
MHC	Major Histocompatibility Complex
MW	Mittelwert

M-Zellen	Microfold oder Membranous Cell
NKA	Aktivität der natürlichen Killerzellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OP	Operation
p	Wahrscheinlichkeit zur Annahme der Nullhypothese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDK	Periduraler Dauerkatheter
PE	Phytoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PPPD	Pylorus-Preserving Pancreaticoduodenectomy
RA	Kennzeichnung für naive bzw. ruhende T-Lymphozyten
RO	Kennzeichnung aktivierte T- Lymphozyten
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of Mean = Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Sideward Scatter
TCR	T-Zell-Rezeptor
TH-Zelle	T-Helfer-Zelle
VRE	Vancomycin Resistente Enterokokken
ZVK	Zentraler Venenkatheter
$\gamma\delta$ -T-Zellen	T-Lymphozyten, die den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor exprimieren
$\alpha\beta$ -T-Zellen	T-Lymphozyten, die den $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor exprimieren

## 8.2 Literaturverzeichnis

- 1 M.R. Adams: Safety of industrial lactic acid bacteria, *J Biotechnol*, 68: 171-178, 1999
- 2 O. Ahlers, B. Hildebrandt, A. Dieing, M. Deja, T. Bohnke, P. Wust, H. Riess, H. Gerlach and T. Kerner: Stress induced changes in lymphocyte subpopulations and associated cytokines during whole body hyperthermia of 41.8-42.2 degrees C, *Eur J Appl Physiol*, 95: 298-306, 2005
- 3 A.N. Akbar, N. Borthwick, M. Salmon, W. Gombert, M. Bofill, N. Shamsadeen, D. Pilling, S. Pett, J.E. Grundy and G. Janossy: The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory, *J Exp Med*, 178: 427-438, 1993
- 4 A.D. Anderson, C.E. McNaught, P.K. Jain and J. MacFie: Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients, *Gut*, 53: 241-245, 2004
- 5 S. Antony, S. Dummer and C. Stratton: *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis, *Clin Infect Dis*, 26: 1483-1484, 1998
- 6 S.J. Antony, C.W. Stratton and J.S. Dummer: *Lactobacillus* bacteremia: description of the clinical course in adult patients without endocarditis, *Clin Infect Dis*, 23: 773-778, 1996
- 7 E. Apostolou, P.V. Kirjavainen, M. Saxelin, H. Rautelin, V. Valtonen, S.J. Salminen and A.C. Ouwehand: Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia?, *FEMS Immunol Med Microbiol*, 31: 35-39, 2001
- 8 T.B. Arne Rodloff: Sensibel, inermidiär und resistent - Wirkintensität von Antibiotika, *Deutsches Ärzteblatt*, 105/39: 657-662, 2008
- 9 M. Arpi, M. Vancanneyt, J. Swings and J.J. Leisner: Six cases of *Lactobacillus* bacteraemia: identification of organisms and antibiotic susceptibility and therapy, *Scand J Infect Dis*, 35: 404-408, 2003
- 10 K. Atisook and J.L. Madara: An oligopeptide permeates intestinal tight junctions at glucose-elicited dilatations. Implications for oligopeptide absorption, *Gastroenterology*, 100: 719-724, 1991
- 11 A.S. Bayer, A.W. Chow, D. Betts and L.B. Guze: *Lactobacillemia*--report of nine cases. Important clinical and therapeutic considerations, *Am J Med*, 64: 808-813, 1978
- 12 A.S. Bayer, A.W. Chow, N. Concepcion and L.B. Guze: Susceptibility of 40 *lactobacilli* to six antimicrobial agents with broad gram-positive anaerobic spectra, *Antimicrob Agents Chemother*, 14: 720-722, 1978
- 13 S. Ben-Eliyahu, G.G. Page, R. Yirmiya and G. Shakhari: Evidence that stress and surgical interventions promote tumor development by suppressing natural killer cell activity, *Int J Cancer*, 80: 880-888, 1999
- 14 S. Bengmark: Bio-ecological control of perioperative and ITU morbidity, *Langenbecks Arch Surg*, 389: 145-154, 2004
- 15 S. Bengmark: Ecoimmunonutrition: a challenge for the third millennium, *Nutrition*, 14: 563-572, 1998
- 16 S. Bengmark: Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora, *Gut*, 42: 2-7, 1998
- 17 R.D. Berg: Bacterial translocation from the gastrointestinal tract, *Adv Exp Med Biol*, 473: 11-30, 1999

- 18 R.D. Berg: Promotion of the translocation of enteric bacteria from the gastrointestinal tracts of mice by oral treatment with penicillin, clindamycin, or metronidazole, *Infect Immun*, 33: 854-861, 1981
- 19 R.D. Berg and A.W. Garlington: Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model, *Infect Immun*, 23: 403-411, 1979
- 20 C.M. Bernardis: Rostral spread of epidural morphine: the expected and the unexpected, *Anesthesiology*, 92: 299-301, 2000
- 21 M.G. Besselink, H.C. van Santvoort, E. Buskens, M.A. Boermeester, H. van Goor, H.M. Timmerman, V.B. Nieuwenhuijs, T.L. Bollen, B. van Ramshorst, B.J. Witteman, C. Rosman, R.J. Ploeg, M.A. Brink, A.F. Schaapherder, C.H. Dejong, P.J. Wahab, C.J. van Laarhoven, E. van der Harst, C.H. van Eijck, M.A. Cuesta, L.M. Akkermans and H.G. Gooszen: Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet*, 371: 651-659, 2008
- 22 L. Blomquist, T. Bark, G. Hedenborg, T. Svenberg and A. Norman: Comparison between the lactulose/mannitol and <sup>51</sup>Cr-ethylenediaminetetraacetic acid/<sup>14</sup>C-mannitol methods for intestinal permeability. Frequency distribution pattern and variability of markers and marker ratios in healthy subjects, *Scand J Gastroenterol*, 28: 274-280, 1993
- 23 Y. Bouhnik, L. Raskine, G. Simoneau, D. Paineau and F. Bornet: The capacity of short-chain fructo-oligosaccharides to stimulate faecal bifidobacteria: a dose-response relationship study in healthy humans, *Nutr J*, 5: 8, 2006
- 24 R.J. Boyle, R.M. Robins-Browne and M.L. Tang: Probiotic use in clinical practice: what are the risks?, *Am J Clin Nutr*, 83: 1256-1264; quiz 1446-1257, 2006
- 25 P. Brandtzaeg: Development and basic mechanisms of human gut immunity, *Nutr Rev*, 56: S5-18, 1998
- 26 P. Brandtzaeg, T.S. Halstensen, K. Kett, P. Krajci, D. Kvale, T.O. Rognum, H. Scott and L.M. Sollid: Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes, *Gastroenterology*, 97: 1562-1584, 1989
- 27 C.E. Brathwaite, S.E. Ross, R. Nagele, A.J. Mure, K.F. O'Malley and F.A. Garcia-Perez: Bacterial translocation occurs in humans after traumatic injury: evidence using immunofluorescence, *J Trauma*, 34: 586-589; discussion 589-590, 1993
- 28 S. Breznitz, H. Ben-Zur, Y. Berzon, D.W. Weiss, G. Levitan, N. Tarcic, S. Lischinsky, A. Greenberg, N. Levi and O. Zinder: Experimental induction and termination of acute psychological stress in human volunteers: effects on immunological, neuroendocrine, cardiovascular, and psychological parameters, *Brain Behav Immun*, 12: 34-52, 1998
- 29 M. Brown and C. Wittwer: Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology, *Clin Chem*, 46: 1221-1229, 2000
- 30 E. Bruzzese, M. Volpicelli, M. Squaglia, A. Tartaglione and A. Guarino: Impact of prebiotics on human health, *Dig Liver Dis*, 38 Suppl 2: S283-287, 2006
- 31 W.B. Cannon: The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions, *Am J Physiol*, 33: 356-372, 1914
- 32 A. Caridi: Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, *J Ind Microbiol Biotechnol*, 29: 303-308, 2002
- 33 S.L. Carlson, S. Fox and K.M. Abell: Catecholamine modulation of lymphocyte homing to lymphoid tissues, *Brain Behav Immun*, 11: 307-320, 1997

- 34 A.M. Castellazzi, C. Valsecchi, L. Montagna, P. Malfa, G. Ciprandi, M.A. Avanzini and G.L. Marseglia: In vitro activation of mononuclear cells by two probiotics: *Lactobacillus paracasei* I 1688, *Lactobacillus salivarius* I 1794, and their mixture (PSMIX), *Immunol Invest*, 36: 413-421, 2007
- 35 D.W. Chen, Z. Wei Fei, Y.C. Zhang, J.M. Ou and J. Xu: Role of enteral immunonutrition in patients with gastric carcinoma undergoing major surgery, *Asian J Surg*, 28: 121-124, 2005
- 36 I. Chermesh, A. Tamir, R. Reshef, Y. Chowers, A. Suissa, D. Katz, M. Gelber, Z. Halpern, S. Bengmark and R. Eliakim: Failure of Synbiotic 2000 to prevent postoperative recurrence of Crohn's disease, *Dig Dis Sci*, 52: 385-389, 2007
- 37 H.R. Christensen, H. Frokiaer and J.J. Pestka: Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells, *J Immunol*, 168: 171-178, 2002
- 38 I. Cima, N. Corazza, B. Dick, A. Fuhrer, S. Herren, S. Jakob, E. Ayuni, C. Mueller and T. Brunner: Intestinal epithelial cells synthesize glucocorticoids and regulate T cell activation, *J Exp Med*, 200: 1635-1646, 2004
- 39 C.D. Cooper, A. Vincent, J.N. Greene, R.L. Sandin and L. Cobian: *Lactobacillus* bacteremia in febrile neutropenic patients in a cancer hospital, *Clin Infect Dis*, 26: 1247-1248, 1998
- 40 M.A. Cox, K.O. Lewis and B.T. Cooper: Measurement of small intestinal permeability markers, lactulose, and mannitol in serum: results in celiac disease, *Dig Dis Sci*, 44: 402-406, 1999
- 41 J.H. Cummings, J.M. Antoine, F. Azpiroz, R. Bourdet-Sicard, P. Brandtzaeg, P.C. Calder, G.R. Gibson, F. Guarner, E. Isolauri, D. Pannemans, C. Shortt, S. Tuijtelaars and B. Watzl: PASSCLAIM--gut health and immunity, *Eur J Nutr*, 43 Suppl 2: II118-II173, 2004
- 42 S. Cunningham-Rundles, S. Ahrne, S. Bengmark, R. Johann-Liang, F. Marshall, L. Metakis, C. Califano, A.M. Dunn, C. Grasse, G. Hinds and J. Cervia: Probiotics and immune response, *Am J Gastroenterol*, 95: S22-25, 2000
- 43 E.A. Deitch, K. Maejima and R. Berg: Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats, *J Trauma*, 25: 385-392, 1985
- 44 E.A. Deitch, J. Winterton and R. Berg: Effect of starvation, malnutrition, and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation, *Arch Surg*, 122: 1019-1024, 1987
- 45 E.A. Deitch, J. Winterton and R. Berg: Thermal injury promotes bacterial translocation from the gastrointestinal tract in mice with impaired T-cell-mediated immunity, *Arch Surg*, 121: 97-101, 1986
- 46 A. Donnet-Hughes, F. Rochat, P. Serrant, J.M. Aeschlimann and E.J. Schiffrin: Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose, *J Dairy Sci*, 82: 863-869, 1999
- 47 M. Drakes, T. Blanchard and S. Czinn: Bacterial probiotic modulation of dendritic cells, *Infect Immun*, 72: 3299-3309, 2004
- 48 A.L. D'Souza, C. Rajkumar, J. Cooke and C.J. Bulpitt: Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis, *Bmj*, 324: 1361, 2002
- 49 C. Dunne, L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E.M. Quigley, G.C. O'Sullivan, F. Shanahan and J.K. Collins: Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 279-292, 1999

- 50 E. Faist, C. Schinkel, S. Zimmer, J.P. Kremer, S. Alkan, C. Rordorf, H. von Donnersmarck and F.W. Schildberg: The influence of major trauma on the regulatory levels of interleukin-1 (IL-1) and IL-2 in human mononuclear leukocytes, *Zentralbl Chir*, 118: 420-431, 1993
- 51 P.G. Falk, L.V. Hooper, T. Midtvedt and J.I. Gordon: Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology, *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 1157-1170, 1998
- 52 D. Florescu, L. Hill, D. Sudan and P.C. Iwen: *Leuconostoc* bacteremia in pediatric patients with short bowel syndrome: case series and review, *Pediatr Infect Dis J*, 27: 1013-1019, 2008
- 53 Ford: The bacteriology of healthy organs, *Trans Assoc Am Physicians*, 15: 389-415, 1900
- 54 D. Franchimont: Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies, *Ann N Y Acad Sci*, 1024: 124-137, 2004
- 55 G. Friedman, S. Jankowski, A. Marchant, M. Goldman, R.J. Kahn and J.L. Vincent: Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock, *J Crit Care*, 12: 183-187, 1997
- 56 R. Fuller: Probiotics in man and animals, *J Appl Bacteriol*, 66: 365-378, 1989
- 57 D. Gemsa, C. Kubelka, K.M. Debatin and P.H. Krammer: Activation of macrophages by lymphokines from T-cell clones: evidence for different macrophage-activating factors, *Mol Immunol*, 21: 1267-1276, 1984
- 58 G.R. Gibson and M.B. Roberfroid: Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *J Nutr*, 125: 1401-1412, 1995
- 59 H.S. Gill, K.J. Rutherford, M.L. Cross and P.K. Gopal: Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019, *Am J Clin Nutr*, 74: 833-839, 2001
- 60 C.V. Gould, N.O. Fishman, I. Nachamkin and E. Lautenbach: Chloramphenicol resistance in vancomycin-resistant enterococcal bacteremia: impact of prior fluoroquinolone use?, *Infect Control Hosp Epidemiol*, 25: 138-145, 2004
- 61 G. Grutz: New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression, *J Leukoc Biol*, 77: 3-15, 2005
- 62 I. Grzelak, W.L. Olszewski, M. Zaleska, M. Durluk, B. Lagiewska, M. Muszynski and W. Rowinski: Blood cytokine levels rise even after minor surgical trauma, *J Clin Immunol*, 16: 159-164, 1996
- 63 F. Hacini-Rachinel, H. Gheit, J.B. Le Luduec, F. Dif, S. Nancey and D. Kaiserlian: Oral probiotic control skin inflammation by acting on both effector and regulatory T cells, *PLoS ONE*, 4: e4903, 2009
- 64 D. Haller, C. Bode, W.P. Hammes, A.M. Pfeifer, E.J. Schiffrin and S. Blum: Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures, *Gut*, 47: 79-87, 2000
- 65 C. Hessle, B. Andersson and A.E. Wold: Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production, *Infect Immun*, 68: 3581-3586, 2000
- 66 C. Hessle, L.A. Hanson and A.E. Wold: Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production, *Clin Exp Immunol*, 116: 276-282., 1999
- 67 M. Heyman, G. Boudraa, S. Sarrut, M. Giraud, L. Evans, M. Touhami and J.F. Desjeux: Macromolecular transport in jejunal mucosa of children with severe malnutrition: a quantitative study, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 3: 357-363, 1984

- 68 M. Hickson, A.L. D'Souza, N. Muthu, T.R. Rogers, S. Want, C. Rajkumar and C.J. Bulpitt: Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial, *Bmj*, 335: 80, 2007
- 69 R.E. Holliman and G.P. Bone: Vancomycin resistance of clinical isolates of *lactobacilli*, *J Infect*, 16: 279-283, 1988
- 70 M.J. Hopkins and G.T. Macfarlane: Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection, *J Med Microbiol*, 51: 448-454, 2002
- 71 T. Hori, J. Kiyoshima and H. Yasui: Effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on the natural killer activity of blood mononuclear cells in aged mice, *Biosci Biotechnol Biochem*, 67: 420-422, 2003
- 72 C.A. Horwitch, H.A. Furseth, A.M. Larson, T.L. Jones, J.F. Olliffe and D.H. Spach: *Lactobacillemia* in three patients with AIDS, *Clin Infect Dis*, 21: 1460-1462, 1995
- 73 W. Isakow, L.E. Morrow and M.H. Kollef: Probiotics for preventing and treating nosocomial infections: review of current evidence and recommendations, *Chest*, 132: 286-294, 2007
- 74 E. Isolauri, P.V. Kirjavainen and S. Salminen: Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation?, *Gut*, 50 Suppl 3: III54-59, 2002
- 75 E. Isolauri, S. Rautava, M. Kalliomaki, P. Kirjavainen and S. Salminen: Role of probiotics in food hypersensitivity, *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2: 263-271, 2002
- 76 E. Isolauri, C. Ribeiro Hda, G. Gibson, J. Saavedra, S. Salminen, J. Vanderhoof and W. Varavithya: Functional foods and probiotics: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 35 Suppl 2: S106-109, 2002
- 77 E. Isolauri, Y. Sutas, P. Kankaanpaa, H. Arvilommi and S. Salminen: Probiotics: effects on immunity, *Am J Clin Nutr*, 73: 444S-450S, 2001
- 78 B.R. Jean-Baptist du Prel: Studiendesign in der medizinischen Forschung, *Deutsches Ärzteblatt*, 106/11: 184-189, 2009
- 79 B.R. Jean-Baptist du Prel: Studententypen in der medizinischen Forschung, *Deutsches Ärzteblatt*, 106/15: 262-268, 2009
- 80 M. Juntunen, P.V. Kirjavainen, A.C. Ouwehand, S.J. Salminen and E. Isolauri: Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection, *Clin Diagn Lab Immunol*, 8: 293-296, 2001
- 81 S. Kanwar, A.C. Windsor, F. Welsh, G.R. Barclay, P.J. Guillou and J.V. Reynolds: Lack of correlation between failure of gut barrier function and septic complications after major upper gastrointestinal surgery, *Ann Surg*, 231: 88-95, 2000
- 82 I. Kato, K. Tanaka and T. Yokokura: Lactic acid bacterium potently induces the production of interleukin-12 and interferon-gamma by mouse splenocytes, *Int J Immunopharmacol*, 21: 121-131., 1999
- 83 R.J. Kennedy, M. Hoper, K. Deodhar, S.J. Kirk and K.R. Gardiner: Probiotic therapy fails to improve gut permeability in a hapten model of colitis, *Scand J Gastroenterol*, 35: 1266-1271, 2000
- 84 P.V. Kirjavainen, E.M. Tuomola, R.G. Crittenden, A.C. Ouwehand, D.W. Harty, L.F. Morris, H. Rautelin, M.J. Playne, D.C. Donohue and S.J. Salminen: In

- vitro adhesion and platelet aggregation properties of bacteremia-associated lactobacilli, *Infect Immun*, 67: 2653-2655, 1999
- 85 D.J. Knight, D. Gardiner, A. Banks, S.E. Snape, V.C. Weston, S. Bengmark and K.J. Girling: Effect of synbiotic therapy on the incidence of ventilator associated pneumonia in critically ill patients: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Intensive Care Med*, 35: 854-861, 2009
- 86 K. Kompan: Effects of early enteral nutrition on intestinal permeability and the development of multiple organ failure after multiple injury, *Intensive Care Med*, 25: 156-161, 1999
- 87 L. Kompan and D. Kompan: Importance of increased intestinal permeability after multiple injuries, *Eur J Surg*, 167: 570-574, 2001
- 88 K. Kotzampassi, E.J. Giamarellos-Bourboulis, A. Voudouris, P. Kazamias and E. Eleftheriadis: Benefits of a synbiotic formula (Synbiotic 2000Forte) in critically ill trauma patients: early results of a randomized controlled trial, *World J Surg*, 30: 1848-1855, 2006
- 89 S. Kruszewska: Selection of lactic acid bacteria as probiotic strains by in vitro tests, *Microecol*, 29?: 37-351?, 2002
- 90 D. Kunkel, D. Kirchhoff, S. Nishikawa, A. Radbruch and A. Scheffold: Visualization of peptide presentation following oral application of antigen in normal and Peyer's patches-deficient mice, *Eur J Immunol*, 33: 1292-1301, 2003
- 91 K. Laiho, U. Hoppu, A.C. Ouwehand, S. Salminen and E. Isolauri: Probiotics: on-going research on atopic individuals, *Br J Nutr*, 88 Suppl 1: S19-27, 2002
- 92 J. Levy: The Effects of Antibiotic Use on Gastrointestinal Function, *The American Journal of Gastroenterology*, 95: 8-10, 2000
- 93 S.M. Lichtman: Bacterial [correction of bacterial] translocation in humans, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 33: 1-10, 2001
- 94 D.M. Lilly and R.H. Stillwell: Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms, *Science*, 147: 747-748, 1965
- 95 H. Liu, S. Zhang, A. Yu, L. Qu, Y. Zhao, H. Huang and J. Li: Studies on intestinal permeability of cirrhotic patients by analysis lactulose and mannitol in urine with HPLC/RID/MS, *Bioorg Med Chem Lett*, 14: 2339-2344, 2004
- 96 A. Ljungh: Isolation, selection and characteristics of *Lactobacillus paracasei* sp. paracasei isolate FI9, *Microbial Ecol health disease*, 3: 4-6, 2002
- 97 A. Ljungh and T. Wadstrom: Lactic acid bacteria as probiotics, *Curr Issues Intest Microbiol*, 7: 73-89, 2006
- 98 D. Lo: Exploiting immune surveillance mechanisms in mucosal vaccine development, *Expert Opin Biol Ther*, 4: 397-406, 2004
- 99 C.B. Maassen, J.C. van Holten, F. Balk, M.J. Heijne den Bak-Glashouwer, R. Leer, J.D. Laman, W.J. Boersma and E. Claassen: Orally administered *Lactobacillus* strains differentially affect the direction and efficacy of the immune response, *Vet Q*, 20 Suppl 3: S81-83, 1998
- 100 G.T. Macfarlane and J.H. Cummings: Probiotics, infection and immunity, *Curr Opin Infect Dis*, 15: 501-506, 2002
- 101 S. Macfarlane, G.T. Macfarlane and J.H. Cummings: Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract, *Aliment Pharmacol Ther*, 24: 701-714, 2006
- 102 K. Madsen, A. Cornish, P. Soper, C. McKaigney, H. Jijon, C. Yachimec, J. Doyle, L. Jewell and C. De Simone: Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function, *Gastroenterology*, 121: 580-591, 2001

- 103 K.L. Madsen, J.S. Doyle, L.D. Jewell, M.M. Tavernini and R.N. Fedorak: Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice, *Gastroenterology*, 116: 1107-1114., 1999
- 104 K. Maejima, E. Deitch and R. Berg: Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of mice, *Arch Surg*, 119: 166-172, 1984
- 105 M. Malin, H. Suomalainen, M. Saxelin and E. Isolauri: Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with Lactobacillus GG, *Ann Nutr Metab*, 40: 137-145, 1996
- 106 F.F. Mandy, M. Bergeron and T. Minkus: Principles of flow cytometry, *Transfus Sci*, 16: 303-314, 1995
- 107 G. Mangiante, G. Colucci, P. Canepari, C. Bassi, N. Nicoli, A. Casaril, P. Marinello, C. Signoretto and S. Bengmark: Lactobacillus plantarum reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis, *Dig Surg*, 18: 47-50, 2001
- 108 P.J. Mannon, I.J. Fuss, L. Mayer, C.O. Elson, W.J. Sandborn, D. Present, B. Dolin, N. Goodman, C. Groden, R.L. Hornung, M. Quezado, Z. Yang, M.F. Neurath, J. Salfeld, G.M. Veldman, U. Schwertschlag and W. Strober: Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease, *N Engl J Med*, 351: 2069-2079, 2004
- 109 A. Marchant, M.L. Alegre, A. Hakim, G. Pierard, G. Marecaux, G. Friedman, D. De Groote, R.J. Kahn, J.L. Vincent and M. Goldman: Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock, *J Clin Immunol*, 15: 266-273, 1995
- 110 A. Marchant, J. Deviere, B. Byl, D. De Groote, J.L. Vincent and M. Goldman: Interleukin-10 production during septicaemia, *Lancet*, 343: 707-708, 1994
- 111 A. Matsuda, K. Furukawa, H. Takasaki, H. Suzuki, H. Kan, H. Tsuruta, S. Shinji and T. Tajiri: Preoperative oral immune-enhancing nutritional supplementation corrects TH1/TH2 imbalance in patients undergoing elective surgery for colorectal cancer, *Dis Colon Rectum*, 49: 507-516, 2006
- 112 L. Mazari and B.M. Lesourd: Nutritional influences on immune response in healthy aged persons, *Mech Ageing Dev*, 104: 25-40, 1998
- 113 J. McCarthy, L. O'Mahony, L. O'Callaghan, B. Sheil, E.E. Vaughan, N. Fitzsimons, J. Fitzgibbon, G.C. O'Sullivan, B. Kiely, J.K. Collins and F. Shanahan: Double blind, placebo controlled trial of two probiotic strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance, *Gut*, 52: 975-980, 2003
- 114 L.V. McFarland: Beneficial microbes: health or hazard?, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 12: 1069-1071, 2000
- 115 C.E. McNaught, N.P. Woodcock, J. MacFie and C.J. Mitchell: A prospective randomised study of the probiotic Lactobacillus plantarum 299V on indices of gut barrier function in elective surgical patients, *Gut*, 51: 827-831, 2002
- 116 L. McNeill, R.L. Cassady, S. Sarkardei, J.C. Cooper, G. Morgan and D.R. Alexander: CD45 isoforms in T cell signalling and development, *Immunol Lett*, 92: 125-134, 2004
- 117 S.N. Meydani and W.K. Ha: Immunologic effects of yogurt, *Am J Clin Nutr*, 71: 861-872, 2000
- 118 E. Mocchegiani and M. Malavolta: NK and NKT cell functions in immunosenescence, *Aging Cell*, 3: 177-184, 2004

- 119 G. Molin: Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v, *Am J Clin Nutr*, 73: 380S-385S, 2001
- 120 D.A. Möller: Modulation des unspezifischen Immunsystems durch perioperative Gabe von Milchsäurebakterien bei Patienten mit großen abdominalen Eingriffen: Ergebnisse einer prospektiven, placebokontrollierten, randomisierten Studie, Dissertation, 2005
- 121 F. Nagao, M. Nakayama, T. Muto and K. Okumura: Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects, *Biosci Biotechnol Biochem*, 64: 2706-2708, 2000
- 122 M. Naruszewicz, M.L. Johansson, D. Zapolska-Downar and H. Bukowska: Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers, *Am J Clin Nutr*, 76: 1249-1255, 2002
- 123 K. Niedzielin, H. Kordecki and B. Birkenfeld: A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 13: 1143-1147, 2001
- 124 C.J. O'Boyle, J. MacFie, C.J. Mitchell, D. Johnstone, P.M. Sagar and P.C. Sedman: Microbiology of bacterial translocation in humans, *Gut*, 42: 29-35, 1998
- 125 M. Ogata, K. Okamoto, K. Kohriyama, T. Kawasaki, H. Itoh and A. Shigematsu: Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery, *Crit Care Med*, 28: 3166-3170, 2000
- 126 A. Olah, T. Belagyi, A. Issekutz, M.E. Gamal and S. Bengmark: Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis, *Br J Surg*, 89: 1103-1107, 2002
- 127 F. Olguin, M. Araya, S. Hirsch, O. Brunser, V. Ayala, R. Rivera and M. Gotteland: Prebiotic ingestion does not improve gastrointestinal barrier function in burn patients, *Burns*, 31: 482-488, 2005
- 128 R. Patel, F.R. Cockerill, M.K. Porayko, D.R. Osmon, D.M. Ilstrup and M.R. Keating: Lactobacillemia in liver transplant patients, *Clin Infect Dis*, 18: 207-212, 1994
- 129 S. Pathmakanthan, C.K. Li, J. Cowie and C.J. Hawkey: *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon, *J Gastroenterol Hepatol*, 19: 166-173, 2004
- 130 G. Perdigon, S. Alvarez, M. Rachid, G. Agüero and N. Gobato: Immune system stimulation by probiotics, *J Dairy Sci*, 78: 1597-1606, 1995
- 131 G. Perdigon, C. Maldonado Galdeano, J.C. Valdez and M. Medici: Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system, *Eur J Clin Nutr*, 56 Suppl 4: S21-26, 2002
- 132 G. Perdigon, E. Vintini, S. Alvarez, M. Medina and M. Medici: Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria, *J Dairy Sci*, 82: 1108-1114, 1999
- 133 C. Prantera, M.L. Scribano, G. Falasco, A. Andreoli and C. Luzzi: Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*, *Gut*, 51: 405-409, 2002
- 134 Prof. Dr. med. H.-H. Peter and P.D.m.W.J. Pichler: *Klinische Immunologie*, 2. Auflage: 1995
- 135 A. Pronio, C. Montesani, C. Butteroni, S. Vecchione, G. Mumolo, A. Vestri, D. Vitolo and M. Boirivant: Probiotic administration in patients with ileal pouch-

- anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells, *Inflamm Bowel Dis*, 14: 662-668, 2008
- 136 N. Rayes, D. Seehofer, S. Hansen, K. Boucsein, A.R. Muller, S. Serke, S. Bengmark and P. Neuhaus: Early enteral supply of lactobacillus and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients, *Transplantation*, 74: 123-127., 2002
- 137 N. Rayes, D. Seehofer, T. Theruvath, M. Mogl, J.M. Langrehr, N.C. Nussler, S. Bengmark and P. Neuhaus: Effect of enteral nutrition and synbiotics on bacterial infection rates after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy: a randomized, double-blind trial, *Ann Surg*, 246: 36-41, 2007
- 138 N. Rayes, D. Seehofer, T. Theruvath, R.A. Schiller, J.M. Langrehr, S. Jonas, S. Bengmark and P. Neuhaus: Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation--a randomized, double-blind trial, *Am J Transplant*, 5: 125-130, 2005
- 139 M. Reddy, E. Eirikis, C. Davis, H.M. Davis and U. Prabhakar: Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function, *J Immunol Methods*, 293: 127-142, 2004
- 140 M.B. Roberfroid: Introducing inulin-type fructans, *Br J Nutr*, 93 Suppl 1: S13-25, 2005
- 141 A. Roessler, U. Friedrich, H. Vogelsang, A. Bauer, M. Kaatz, U.C. Hipler, I. Schmidt and G. Jahreis: The immune system in healthy adults and patients with atopic dermatitis seems to be affected differently by a probiotic intervention, *Clin Exp Allergy*, 38: 93-102, 2008
- 142 M. Roller, G. Rechkemmer and B. Watzl: Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats, *J Nutr*, 134: 153-156, 2004
- 143 R.M. Roumen, T. Hendriks, R.A. Wevers and J.A. Goris: Intestinal permeability after severe trauma and hemorrhagic shock is increased without relation to septic complications, *Arch Surg*, 128: 453-457, 1993
- 144 R. Saadia, M. Schein, C. MacFarlane and K.D. Boffard: Gut barrier function and the surgeon, *Br J Surg*, 77: 487-492, 1990
- 145 M.K. Salminen, H. Rautelin, S. Tynkkynen, T. Poussa, M. Saxelin, V. Valtonen and A. Jarvinen: *Lactobacillus* bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG, *Clin Infect Dis*, 38: 62-69, 2004
- 146 M.K. Salminen, S. Tynkkynen, H. Rautelin, M. Saxelin, M. Vaara, P. Ruutu, S. Sarna, V. Valtonen and A. Jarvinen: *Lactobacillus* bacteremia during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland, *Clin Infect Dis*, 35: 1155-1160, 2002
- 147 S. Salminen, C. Bouley, M.C. Boutron-Ruault, J.H. Cummings, A. Franck, G.R. Gibson, E. Isolauri, M.C. Moreau, M. Roberfroid and I. Rowland: Functional food science and gastrointestinal physiology and function, *Br J Nutr*, 80 Suppl 1: S147-171, 1998
- 148 S. Salminen, A. von Wright, L. Morelli, P. Marteau, D. Brassart, W.M. de Vos, R. Fonden, M. Saxelin, K. Collins, G. Mogensen, S.E. Birkeland and T. Mattila-Sandholm: Demonstration of safety of probiotics -- a review, *Int J Food Microbiol*, 44: 93-106, 1998

- 149 M.E. Sanders: Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health, *J Nutr*, 130: 384S-390S, 2000
- 150 M.E. Sanders: Probiotics: considerations for human health, *Nutr Rev*, 61: 91-99, 2003
- 151 T. Sasakawa, H. Takizawa, H. Bannai, R. Narisawa and H. Asakura: Activated CD4+ and CD8+ cells in the colonic mucosa of ulcerative colitis patients: their relationship to HLA-DR antigen expression on the colonic epithelium and serum soluble CD25 levels, *Digestion*, 56: 516-522, 1995
- 152 M. Saxelin, N.H. Chuang, B. Chassy, H. Rautelin, P.H. Makela, S. Salminen and S.L. Gorbach: Lactobacilli and bacteremia in southern Finland, 1989-1992, *Clin Infect Dis*, 22: 564-566, 1996
- 153 E.J. Schiffrin and S. Blum: Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa, *Eur J Clin Nutr*, 56 Suppl 3: S60-64, 2002
- 154 E.J. Schiffrin, D. Brassart, A.L. Servin, F. Rochat and A. Donnet-Hughes: Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection, *Am J Clin Nutr*, 66: 515S-520S, 1997
- 155 A. Schmit, A. Van Gossum, M. Carol, J.J. Houben and F. Mascart: Diversion of intestinal flow decreases the numbers of interleukin 4 secreting and interferon gamma secreting T lymphocytes in small bowel mucosa, *Gut*, 46: 40-45, 2000
- 156 K.E. Scholz-Ahrens and J. Schrezenmeir: Inulin, oligofructose and mineral metabolism - experimental data and mechanism, *Br J Nutr*, 87 Suppl 2: S179-186, 2002
- 157 J. Schrezenmeir and M. de Vrese: Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition, *Am J Clin Nutr*, 73: 361S-364S, 2001
- 158 M. Schultz, C. Veltkamp, L.A. Dieleman, W.B. Grenther, P.B. Wyrick, S.L. Tonkonogy and R.B. Sartor: Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice, *Inflamm Bowel Dis*, 8: 71-80, 2002
- 159 S. Sen, M.M. Mullan, T.J. Parker, J.T. Woolner, S.A. Tarry and J.O. Hunter: Effect of Lactobacillus plantarum 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome, *Dig Dis Sci*, 47: 2615-2620, 2002
- 160 B. Sheil, F. Shanahan and L. O'Mahony: Probiotic effects on inflammatory bowel disease, *J Nutr*, 137: 819S-824S, 2007
- 161 M.S. Slade, R.L. Simmons, E. Yunis and L.J. Greenberg: Immunodepression after major surgery in normal patients, *Surgery*, 78: 363-372, 1975
- 162 J.D. Snyder and W.A. Walker: Structure and function of intestinal mucin: developmental aspects, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 82: 351-356, 1987
- 163 J.D. Soderholm and M.H. Perdue: Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 280: G7-G13, 2001
- 164 A. Spindler-Vesel, S. Bengmark, I. Vovk, O. Cerovic and L. Kompan: Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients, *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 31: 119-126, 2007
- 165 T. Standl: [Peridural anesthesia in postoperative pain therapy], *Zentralbl Chir*, 120: 916-926, 1995
- 166 E.K. Steffen and R.D. Berg: Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes, *Infect Immun*, 39: 1252-1259, 1983

- 167 S. Sun, K. Yang, X. He, J. Tian, B. Ma and L. Jiang: Probiotics in patients with severe acute pancreatitis: a meta-analysis, *Langenbecks Arch Surg*, 394: 171-177, 2009
- 168 N. Taneja, P. Rani, R. Emmanuel, B.Y. Khudaier, S.K. Sharma, R. Tewari and M. Sharma: Nosocomial urinary tract infection due to *Leuconostoc mesenteroides* at a tertiary care centre in north India, *Indian J Med Res*, 122: 178-179, 2005
- 169 G.W. Tannock: Analysis of the intestinal microflora: a renaissance, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76: 265-278, 1999
- 170 G.W. Tannock: Molecular assessment of intestinal microflora, *Am J Clin Nutr*, 73: 410S-414S, 2001
- 171 G.W. Tannock: Probiotic properties of lactic-acid bacteria: plenty of scope for fundamental R & D, *Trends Biotechnol*, 15: 270-274, 1997
- 172 G.W. Tannock: A special fondness for lactobacilli, *Appl Environ Microbiol*, 70: 3189-3194, 2004
- 173 G.W. Tannock, K. Munro, H.J. Harmsen, G.W. Welling, J. Smart and P.K. Gopal: Analysis of the fecal microflora of human subjects consuming a probiotic product containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20, *Appl Environ Microbiol*, 66: 2578-2588, 2000
- 174 G.W. Tannock and D.C. Savage: Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract, *Infect Immun*, 9: 591-598, 1974
- 175 J.N. Temblay, E. Bertelli, J.L. Arques, M. Regoli and C. Nicoletti: Production of IL-12 by Peyer patch-dendritic cells is critical for the resistance to food allergy, *J Allergy Clin Immunol*, 120: 659-665, 2007
- 176 D. Tok, O. Ilkgul, S. Bengmark, H. Aydede, Y. Erhan, F. Taneli, C. Ulman, S. Vatansever, C. Kose and G. Ok: Pretreatment with pro- and synbiotics reduces peritonitis-induced acute lung injury in rats, *J Trauma*, 62: 880-885, 2007
- 177 Y.T. Tsai, P.C. Cheng, C.K. Fan and T.M. Pan: Time-dependent persistence of enhanced immune response by a potential probiotic strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU 101, *Int J Food Microbiol*, 128: 219-225, 2008
- 178 K. Tschaikowsky, M. Hedwig-Geissing, A. Schiele, F. Bremer, M. Schywalsky and J. Schuttler: Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients, *Crit Care Med*, 30: 1015-1023, 2002
- 179 K.M. Tuohy, H.M. Probert, C.W. Smejkal and G.R. Gibson: Using probiotics and prebiotics to improve gut health, *Drug Discov Today*, 8: 692-700, 2003
- 180 S. Tynkkynen, K.V. Singh and P. Varmanen: Vancomycin resistance factor of *Lactobacillus rhamnosus* GG in relation to enterococcal vancomycin resistance (*van*) genes, *Int J Food Microbiol*, 41: 195-204, 1998
- 181 J. Vanderhoof, D. Whitney and D. Antonson: In children receiving antibiotics, does coadministration of *Lactobacillus* GG reduce the incidence of diarrhea?, *West J Med*, 173: 397, 2000
- 182 J.A. Vanderhoof: Probiotics and intestinal inflammatory disorders in infants and children, *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 30 Suppl 2: S34-38, 2000
- 183 H. Wacha: [Wound infections in abdominal surgery: aetiology, risk factors, antibiotic prophylaxis], *Zentralbl Chir*, 132: 400-410, 2007

- 184 H. Wacha, T. Hau, R. Dittmer and C. Ohmann: Risk factors associated with intraabdominal infections: a prospective multicenter study. *Peritonitis Study Group, Langenbecks Arch Surg*, 384: 24-32, 1999
- 185 C.H. Wakefield, P.D. Carey, S. Foulds, J.R. Monson and P.J. Guillou: Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery, *Br J Surg*, 80: 205-209, 1993
- 186 W.A. Walker: Antigen handling by the small intestine, *Clin Gastroenterol*, 15: 1-20, 1986
- 187 P.J. Watkinson, V.S. Barber, P. Dark and J.D. Young: The use of pre- and synbiotics in adult intensive care unit patients: systematic review, *Clin Nutr*, 26: 182-192, 2007
- 188 J. Wehkamp: Angeborene Immunabwehr, *Deutsches Ärzteblatt*, 5: B-228-233, 2007
- 189 C.L. Wells, M.A. Maddaus and R.L. Simmons: Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria, *Rev Infect Dis*, 10: 958-979, 1988
- 190 I. Welters: [Opioids and immunosuppression. Clinical relevance?], *Anaesthesist*, 52: 442-452, 2003
- 191 WHO: Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002
- 192 S.T. Wolbach SB: A new anaerobic spore-bearing bacterium commonly present in the livers of healthy dogs and believed to be responsible for many changes attributed to aseptic autolysis of liver tissue, *J Med Res*, 21: 267-278, 1909
- 193 N.P. Woodcock, C.E. McNaught, D.R. Morgan, K.L. Gregg and J. MacFie: An investigation into the effect of a probiotic on gut immune function in surgical patients, *Clin Nutr*, 23: 1069-1073, 2004
- 194 M. Yokoyama, Y. Itano, H. Katayama, H. Morimatsu, Y. Takeda, T. Takahashi, O. Nagano and K. Morita: The effects of continuous epidural anesthesia and analgesia on stress response and immune function in patients undergoing radical esophagectomy, *Anesth Analg*, 101: 1521-1527, 2005
- 195 M. Yokoyama, Y. Itano, S. Mizobuchi, H. Nakatsuka, R. Kaku, T. Takashima and M. Hirakawa: The effects of epidural block on the distribution of lymphocyte subsets and natural-killer cell activity in patients with and without pain, *Anesth Analg*, 92: 463-469, 2001
- 196 L.H. Zeuthen, H.R. Christensen and H. Frokiaer: Lactic acid bacteria inducing a weak interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha response in human dendritic cells inhibit strongly stimulating lactic acid bacteria but act synergistically with gram-negative bacteria, *Clin Vaccine Immunol*, 13: 365-375, 2006

### **8.3 Danksagung**

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Herwig Gerlach, Direktor der Klinik für Anästhesie, operativen Intensivmedizin und Schmerztherapie im Vivantes – Klinikum Neukölln (seinerzeit tätig in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité Campus - Virchow-Klinikum Berlin) für die Überlassung des Themas, der fachlichen Unterstützung und die Geduld bei der Fertigstellung dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. K. J. Falke gebührt mein Dank für die Bereitstellung des unter seiner Leitung stehenden Labors für Anästhesiologie der Charité – Campus Virchow-Klinikum, ohne welche die Erstellung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Mein Dank gilt des Weiteren Herrn Priv.-Doz. Dr. Keh, welcher mir durch seine fachliche Kompetenz und konstruktive Kritik helfend zur Seite stand. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Dr. Olaf Ahlers für seine Geduld bei der Lösung statistischer Fragestellungen und unserer Studienassistentin, Anne Gössinger, für ihren Einsatz und ihren Fleiß im Labor danken.

Ich möchte Frau Priv.-Doz. Nada Rayes und den Mitarbeitern der chirurgischen Klinik für die gute Kooperation bei der Studiendurchführung danken.

Frau Dr. Anke Möller danke ich für ihre ansteckende Zielstrebigkeit und die gute Zusammenarbeit. Die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und Archiv sind mir angenehm in Erinnerung geblieben.

Meinen Eltern möchte ich insbesondere für ihre Geduld und Unterstützung danken, die mir die Beendigung des Studiums und die Fertigstellung der Dissertation erst ermöglichten.

## **8.4 Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **8.5 Erklärung an Eides Statt**

Ich, Synke Lüdemann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Perioperativ verabreichte Milchsäurebakterien und ihr Einfluss auf Parameter des Immunsystems bei Patienten mit abdominal-chirurgischen Eingriffen: Ergebnisse einer prospektiven, randomisierten und placebokontrollierten Studie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift