

## 2. LITERATUR

### 2.1 Geschichte der Probiotika

Die Anwendung von fermentierten Milchprodukten ist in vielen Kulturen bereits seit Jahrtausenden Tradition. Den individuellen gesundheitlichen Nutzen von in Nahrungsmitteln enthaltenen lebenden Mikroorganismen kann man heute zwar nur abschätzen, jedoch wird der dadurch oft verbundene Schutz vor Verderb der Nahrungsmittel nützlich für die Gesundheit aller Anwender gewesen sein (Fuller, 1992).

Der direkte positive Effekt von Nahrungsmitteln mit enthaltenen lebenden Mikroben wurde erkannt und so wurden in der volkstümlichen Heilkunde noch Anfang des letzten Jahrhunderts Aufgüsse aus Heu oder Kuhdung gezielt gegen Diarrhöen eingesetzt (Schmöger, 1960). Auch das Wissen um die Wirkung von Joghurt zur Stabilisierung einer gestörten Darmflora wurde weiterhin genutzt (Fuller, 1992; Raffle, 1956).

Mit der Einführung von Antibiotika verschwand jedoch das wissenschaftliche und allgemeine Interesse an probiotischen Präparaten.

Erst als durch die anfänglich euphorisch eingesetzten Antibiotika Nebenwirkungen in Form von zum Teil starken gastrointestinalen Störungen zum Problem wurden, erinnerte man sich an die stabilisierende Wirkung der Probiotika auf die Darmflora.

Mit der Entwicklung des Präparats Bactisubtil® kam in den 50er Jahren in Frankreich erstmalig ein Stabilisator der Darmflora auf den Markt: der altbewährte apathogene Heukeim *Bacillus subtilis* (Schmöger, 1960).

Auch wenn Metchnikoff bereits 1908 fermentierte Milchprodukte zur gezielten Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen empfahl, ist das Wissen über die Wirkungsweise der Präparate doch lückenhaft. Er stellte zwar die Theorie auf, dass zwischen der ungewöhnlich hohen Lebenserwartung bulgarischer Bauern und deren hohem Konsum von Laktobazillen in angesäuerter Milch ein Zusammenhang bestehe, konnte jedoch keine Erklärung dafür finden. Dennoch kann Metchnikoff als Begründer des probiotischen Gedankens angesehen werden. Seine Definition für Probiotika lautete: Mikroben, die aufgenommen werden mit dem Ziel, die Gesundheit zu verbessern (Metchnikoff, 1907).

Das Wort „Probiotika“ stammt ursprünglich von dem griechischen Ausdruck „für Leben“ (pro bios) ab, jedoch hat sich die Bedeutung des Wortes über die Jahre mehrfach gewandelt.

Lilly und Stillwell definierten Probiotika 1965 als Substanzen, die von einem Mikroorganismus sezerniert werden und das Wachstum eines anderen stimulieren (Lilly und Stillwell, 1965).

Erst 1974 wurde diese Definition von Parker eingegrenzt; er bezeichnete Probiotika als Substanzen und Organismen, die zum Gleichgewicht der intestinalen mikrobiellen Flora beitragen (Parker, 1974).

Damit war zumindest die Eingrenzung auf die Anwendung in Bezug auf die intestinale Mikroflora gegeben, jedoch erlaubte das Wort „Substanzen“ ebenso die Einordnung von Antibiotika in diese Definition.

Gedek nannte 1986 Probiotika Keimarten, die regulativ in die Besiedlung des Darmes eingreifen und auf diese Weise die Belastung des Tieres durch eine unerwünschte Keimbesiedelung vermindern (Gedek, 1986).

In der Tierernährung wird heute die Definition von Fuller anerkannt und benutzt. Demnach sind Probiotika lebende mikrobielle Futterzusätze, die sich begünstigend auf das Gleichgewicht der intestinalen Mikroflora auswirken (Fuller, 1989).

Durch Görke wurde diese Definition um den Zusatz „oder den Wirtsorganismus direkt beeinflussen“ erweitert (Görke und Liebler-Tenorio, 2001).

## **2.2 Probiotika in der Veterinärmedizin**

Zwar wurden bereits früher Versuche an Tieren durchgeführt mit dem Ziel, den Wirkungsmechanismus aufzudecken, jedoch lag der Einsatzbereich der Probiotika zunächst nur in der Behandlung von Diarrhöen verschiedener Genese beim Menschen (z. B. Antibiotika-assoziierte Diarrhöe) (Kirchhelle *et al.*, 1996).

Erst in jüngerer Zeit finden Probiotika bei vielen Erkrankungen, deren Pathogenese durch Störungen der Intestinalflora bestimmt ist, auch Anwendung in der Kleintiermedizin.

Beim Einsatz in der Tierernährung spielt neben positiven gesundheitlichen Aspekten auch die Verbesserung der zotechnischen Leistungen eine Rolle.

Bis zum Jahre 2006 plant die Europäische Union ein völliges Verbot von Antibiotika als Futterzusatzstoff in der Mast, um Antibiotikaresistenzen bei Bakterien zu verhindern. Auch dadurch wurde das Interesse der Veterinärmedizin an alternativen Methoden immer größer und Probiotika bekamen Einzug in die Tierernährung.

Die in der Tierernährung zum jetzigen Zeitpunkt als Futterzusatzstoffe zugelassenen Probiotika sind in Tabelle 1 dargestellt.

Da sich die Anforderungen an die Mikroorganismen mit dem Wissensstand relativ schnell ändern, variiert auch die Zahl der zugelassenen Probiotika. Zur Zeit sind 21 probiotische Zusatzstoffe im Europäischen Gesetz erlaubt, manche von ihnen sind unbefristet.

Die Präparate können sowohl lebende oder tote Bakterien als auch deren Stoffwechselprodukte oder Sporen enthalten. Neben Monopräparaten sind auch Mischpräparate mit mehreren Mikroorganismen verschiedener Gattungen im Handel.

**Tabelle 1:** Als Futterzusatzstoff zugelassene Probiotika (nach EU-RL 70/524 EWG, Stand Juli 2004)

1	Toyocerin® (Bazillus cereus var. toyoi)	Masthühner, Legehennen, Kälber, Mastrinder, Zuchtkaninchen, Mastkaninchen, Ferkel, Mastschweine, Sauen
2	Biosaf® (Saccharomyces cerevisiae)	Mastkaninchen, Sauen, Ferkel, Mastrinder, Milchkühe
3	Yea Sacc® (Saccharomyces cerevisiae)	Kälber, Mastrinder, Milchkühe, Pferde
4	Levucell SB® (Saccharomyces cerevisiae)	Sauen, Ferkel
5	Levucell SC® (Saccharomyces cerevisiae)	Milchkühe, Mastrinder
6	Pioneer PDFM® (Enterococcus faecium)	Masthühner
7	Bactocell PA®, Fermaid PA® (Pediococcus acidilactici)	Masthühner, Ferkel, Mastschweine
8	Cylactin®, LBC® (Enterococcus faecium)	Masthühner, Mastschweine, Sauen, Mastrinder, Ferkel, Kälber
9	Microferm® (Enterococcus faecium)	Ferkel, Masthühner, Kälber
10	Biacton® (Laktobazillus farciminis)	Ferkel

11	Oralin® (Enterococcus faecium)	Ferkel, Kälber, Masthühner, Mastputen, Hunde
12	Biosprint Natural Yeast® (Saccharomyces faecium)	Ferkel, Mastrinder, Milchkühe
13	Lactiferm® (Enterococcus faecium)	Ferkel, Kälber
14	Provita LE® (Laktobazillus rhamnosus, Enterococcus faecium)	Ferkel, Kälber
15	Gardion® (Laktobazillus casei, Enterococcus faecium)	Kälber
16	Fecinor Plus® (Enterococcus faecium)	Ferkel, Kälber
17	Adjulact® (Streptococcus infantarius, Lactobacillus plantarum)	Kälber
18	Bio Plus 2B® (Bazillus subtilis, Bazillus licheniformis)	Sauen, Mastschweine, Masthühner, Masttruthühner, Kälber
19	Biomin IMB 52® (Enterococcus faecium)	Kälber
20	Bonvital® (Enterococcus faecium)	Ferkel, Mastschweine, Sauen
21	Lactobacillus acidophilus D2/CSL	Legehennen

Gemäss den Zulassungsvorschriften der Europäischen Union (Richtlinie 70/52/EWG über Zusatzstoffe in der Tierernährung und Richtlinie 87/153/EWG zur Festlegung von Leitlinien zur Beurteilung von Zusatzstoffen), müssen die Hersteller umfangreiche Untersuchungen durchführen und nachweisen, um eine Zulassung zu beantragen.

Neben dem Nachweis der Wirksamkeit muss auch die Sicherheit des Präparates belegbar sein. Die Unschädlichkeit für Mensch und Tier ist dabei unerlässlich.

Probiotika dürfen die Gesundheit des Wirtes und der Personen, die mit dem Präparat umgehen, nicht beeinträchtigen. Sie müssen apathogen sein und dürfen auch keine Toxine produzieren. Ferner dürfen sie nicht invasiv sein, d.h. sie dürfen nicht über die Blutbahn z. B. Muskelpartien besiedeln, weil für die weitere Verwertung der Tiere eine Unbedenklichkeit der Schlachtkörper ebenfalls unerlässlich ist.

Eine Förderung von Resistenzbildung von Mikroorganismen gegenüber Antibiotika durch den Einsatz eines Probiotikums ist ebenfalls auszuschließen.

Ein effektives Probiotikum muss unter einer Vielzahl von unterschiedlichen Umweltbedingungen und in zahlreichen verschiedenen Medien überleben.

Es muss eine Stabilität gegenüber industriellen, technischen Prozessen in der Produktion der Futtermittel (Pelletierung, darunter auch Lagerung) als auch eine Lebensfähigkeit im Magen-Darm-Trakt für die Wirksamkeit vorhanden sein (Collins und Gibson, 1999; Fuller, 1989).

## **2.3 Wirkungen von Probiotika *in vivo*: Versuche mit Nutztieren**

Neben der Verwendung von Probiotika zur gezielten Behandlung von Magen-Darm-Erkrankungen wurde seit den 80iger Jahren auch ihr Einsatz als Zusatzstoff von immer größerer Bedeutung.

Die propagierten Wirkungen von Probiotika ergeben sich aus der Verbesserung verdauungsphysiologischer Parameter wie der Erhöhung der scheinbaren Verdaulichkeit, der Futtermittelverwertung und der Wachstumsraten (Freitag *et al.*, 1999; Kirchgessner *et al.*, 1993; Vanbelle *et al.*, 1990) sowie infolge der Abnahme von Erkrankungen des Magen-Darm-Kanals (Bomba *et al.*, 1998).

Zur Aufklärung dieser angenommenen Wirkungen wurden zahlreiche Untersuchungen mit verschiedenen Nutztieren durchgeführt.

### **2.3.1 Geflügel**

Ursprünglich stammt die Idee des prophylaktischen Einsatzes von lebenden Mikroorganismen aus der Geflügelproduktion. Für die Küken ist es notwendig, über den Kot der adulten Tiere eine gesunde Darmflora zu erwerben. Dies ist allerdings durch die zunehmende Automatisierung des Brutprozesses und die damit einhergehende fast vollständige Trennung der Altersgruppen nicht mehr möglich. Damit sind die Jungtiere sehr anfällig für eine Besiedelung mit pathogenen Keimen. Durch die Verabreichung verschiedener Bakterienstämme an Jungtiere kann man diese Besiedelung mit pathogenen Keimen verhindern, wobei sich die Applikation

des Darminhaltes von adulten Tieren als besonders wirksam herausgestellt hat (Barrow, 1992; Rantala und Nurmi, 1973). Dies ist das Konzept der kompetitiven Exklusion (CE).

Aber nicht nur die Gabe von Mischungen verschiedener Bakterienstämme inhibieren das Wachstum von Enterobakterien beim Geflügel. Jin et al. bewiesen, dass verschiedene Laktobazillus-Stämme das Wachstum von mehreren Salmonella-Stämmen reduzieren können (Jin *et al.*, 1996). Die Verabreichung von *Lactobacillus acidophilus* bei gnotobiotischen Küken ergab bei Watkins et al. eine geringere Mortalität bei Infektion mit *E. coli* (Watkins *et al.*, 1982).

Auch *Enterococcus faecium* steigert die Überlebensrate bei einer Infektion mit *Salmonella pullorum* (Carina Audisio *et al.*, 2000). Bei Pascual et al. ergaben die Untersuchungen an Küken mit Gaben von *Lactobacillus salivarius* eine reduzierte Besiedelung mit Salmonellen (Pascual *et al.*, 1999).

Auch bei adulten Tieren verhindern zwei Laktobazillus-Stämme die Anheftung von *Salmonella typhimurium* an caecalen Mukus (Craven und Williams, 1997).

Supplementierung mit *Saccharomyces cerevisiae* unterdrücken die Effekte einer Aflatoxikose bei adulten Hühnern (Stanley *et al.*, 1993).

Bei anderen Autoren steht die vermehrte Eiproduktion, erhöhte Schalendicke und erniedrigte Cholesterolkonzentrationen im Serum und im Eidotter im Vordergrund (Mohan *et al.*, 1996; Nahashon *et al.*, 1994; Panda *et al.*, 2003).

### **2.3.2 Kälber**

Bei den Studien über den Zusatz von verschiedenen Probiotika zum Milchaustauscher bei Kälbern liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Während bei Abe et al. von einem reduzierten Vorkommen von Durchfällen, höheren Körpergewichtszunahmen und besserer Futtermittelverwertung bei Gabe von *Bifidobacterium longum* und *Lactobacillus acidophilus* berichtet wird, steht bei Jenny et al. eine erhöhte Futteraufnahme und Tageszunahme bei Fütterung eines *Bacillus subtilis*-Konzentrates im Vordergrund (Abe *et al.*, 1995; Jenny *et al.*, 1991).

Bei den meisten Untersuchungen lag jedoch nur eine tendenzielle Erhöhung der Tageszunahmen vor. So fanden Cruywagen et al. bei ihren Arbeiten heraus, dass keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die gesamte Gewichtszunahme innerhalb von 6 Wochen vor dem Absetzen zwischen den Kontrollgruppen und den mit Probiotika (*Lactobacillus acidophilus*) gefütterten Kälbern vorlagen. In den ersten zwei Wochen nach der Geburt zeigten die mit *Lactobacillus acidophilus* behandelten Kälber jedoch deutlich weniger Gewichtsverlust als die Tiere der Kontrollgruppe (Cruywagen *et al.*, 1996).

Morrill et al. erkannten eine Verbesserung der Wachstumsrate bei ihren mit Laktobazillus-Stämmen behandelten Tieren gegenüber mit Antibiotika gefütterten Gruppen (Morrill *et al.*, 1995).

Bei Arbeiten über Kälber, deren Milchaustauscher mit *Enterococcus faecium* versetzt war, liegen Aussagen von erhöhter Futteraufnahme und erniedrigter Durchfallrate vor (Ozawa *et al.*, 1983).

Erhard et al. legten bei ihren Untersuchungen über die Anwendung von *Bacillus cereus* bei neugeborenen Kälbern, hinsichtlich der Durchfallhäufigkeit und der Wachstumsraten, konträre Ergebnisse vor. Sie zeigten, dass eine Behandlung mit Probiotika allein keinerlei Wirkungen hat, jedoch in Kombination mit Kolostrum- und Dotterantikörpern zwar eine erhöhte Körpergewichtszunahme, aber keinerlei Unterschiede hinsichtlich der Durchfallhäufigkeit vorliegt (Erhard *et al.*, 2000).

### **2.3.3 Milchkühe**

Wie bei den Mastkälbern, so sind ebenfalls bei den Milchkühen hauptsächlich Untersuchungen mit *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus oryzae* durchgeführt worden. Auch hier sind die Ergebnisse unterschiedlich.

McGilliard und Stallings beschreiben sowohl signifikante Zunahmen als auch signifikante Abnahmen der Milchleistung nach der Fütterung von *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Saccharomyces cerevisiae* und *Aspergillus oryzae*. Ebenso unterschiedlich sind bei ihnen auch die Ergebnisse in Bezug auf die Milchzusammensetzung und die Futteraufnahme (McGilliard und Stallings, 1998).

Nach Williams et al. kommt es nach Zufütterung mit *Saccharomyces cerevisiae* zu einer Steigerung der Futteraufnahme, jedoch nur zu einer gering vermehrten Milchleistung (Williams et al., 1991).

Nocek et al. berichten sowohl von einer erhöhten Milchleistung, Futteraufnahme und Anstieg des Milchproteins als auch einer positiven Beeinflussung metabolischer Profile wie Glucose und Insulin bei einer Gabe von *Saccharomyces cerevisiae* und zwei *Enterococcus faecium*-Stämmen in einem bestimmten Zeitraum (21 Tage prepartum bis 70 Tage postpartum) (Nocek et al., 2003).

### 2.3.4 Ferkel

Wie auch bei den Kälbern steht bei den Ferkeln vor allem die Senkung der Durchfallhäufigkeit bei der Wirksamkeit der Probiotika im Vordergrund. Besonders in den Wochen nach dem Absetzen von Ferkeln wurden die Effekte von Probiotika geprüft, da Durchfallerkrankungen in dieser Phase besonders häufig auftreten. Auch in dieser Hinsicht ergibt sich kein einheitliches Bild.

Kirchgessner et al. beobachten keine Beeinflussung der Durchfallhäufigkeit bei ihren Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen von *Bazillus cereus*-Gaben. Ebenso konnten sie keine Unterschiede in Bezug auf den Futteraufwand im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellen. Dagegen waren die täglichen Zunahmen und die Futteraufnahme verbessert; Die  $\text{NH}_3$ -Konzentration, die Menge an flüchtigen Fettsäuren und der Lactat-Gehalt im Dünndarm waren reduziert, ebenso die Konzentrationen an Essig- und Propionsäure im Caecum (Kirchgessner et al., 1993).

Die Resultate von Shu et al. hingegen zeigen eine erniedrigte Durchfallrate (assoziiert mit Rotaviren und *E. coli*) und eine erhöhte Futterverwertung bei Versuchen mit *Bifidobacterium lactis* (Shu et al., 2001).

Auch bei Kyriakis et al. liegen positive Ergebnisse in Bezug auf die Durchfallhäufigkeit nach dem Absetzen und die täglichen Zunahmen vor. Sie behandelten 256 Ferkel mit *Bazillus cereus* var. *toyoi* bzw. *Bazillus licheniformis* (Kyriakis et al., 1999).

Jin et al. legen ebenfalls eine statistisch gesicherte Reduzierung der Anheftung von *E. coli* im Mukus von Ferkeln bei Zufütterung von *Enterococcus faecium* vor (Jin et al., 2000).

### **2.3.5 Mastschweine**

Zu Versuchen mit Probiotika bei Mastschweinen liegen wenig Ergebnisse vor. Hier stehen natürlich die Parameter Wachstumsrate und Futterverwertung im Vordergrund. Die verbesserte Gewichtszunahme wird meist in Zusammenhang mit der verringerten Durchfallrate dargestellt.

Alexopoulos et al. berichten bei ihren Versuchen mit *Bacillus cereus* von einer geringeren Mortalität, höheren Gewichtszunahmen und verbesserter Futterverwertung. In bestimmten Gruppen behandelten sie bereits die Muttersau mit dem Probiotikum, hier hatten die Ferkel höhere Geburtsgewichte als in den Kontrollgruppen (Alexopoulos et al., 2001). Diese Effekte könnten auch für Mastschweine von Bedeutung sein.

Bei van Winsen et al. stehen bei ihren Versuchen mit *Laktobazillus plantarum* an Mastschweinen die Reduzierung der enteropathogenen Bakterien und damit der Durchfallhäufigkeit im Vordergrund. Sie gehen davon aus, dass der bei Mastschweinen durch die Futterumstellung nach dem Absetzen hervorgerufene Durchfall und der damit einhergehende Gewichtsverlust durch die Gabe von Probiotika reduziert werden kann (van Winsen et al., 2002).

Bei Urlings et al., die Mastschweine ebenfalls mit *Laktobazillus plantarum* (zusammen mit Geflügel-Nebenprodukten) behandelten, sieht man signifikant verbesserte Futterverwertung, erhöhtes Schlachtkörpergewicht und erhöhte Rückenfettdicke (Urlings et al., 1993).

Auch Freitag et al. sprechen von verbesserter Futterverwertung bei Anwendung von Milchsäurebakterien in der Schweinemast (Freitag et al., 1999).

## 2.4 Diskutierte Wirkungsmechanismen

Wie schon aus der Definition von Fuller (1989) hervorgeht, liegt die Wirkung von Probiotika unter anderem in einem begünstigenden Einfluss auf die intestinale Mikroflora (Fuller, 1989).

Die Beschreibung „begünstigender Einfluss“ muss durch die Vielzahl von verschiedenen Bakterien, welche als Probiotika Anwendung finden, sehr weit gefasst werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass Keime, welche natürlicherweise schon im Darm vorkommen (z. B. *Enterococcus faecium*) und von daher schon in diesem Habitat ihre volle Stoffwechselaktivität entfalten können, in anderer Weise wirken als z. B. Sporen von Bodenbakterien (*Bazillus spp.*), welche erst durch Keimung in stoffwechselaktive, vegetative Zellen überführt werden müssen. Auch die als Probiotika eingesetzten Hefen (z. B. *Saccharomyces cerevisiae*) kommen ursprünglich nicht im Darm vor (Simon und Breves, 2000).

Daher kommen die nachfolgend genannten angenommenen Wirkungsweisen nicht für alle Probiotika in gleichem Maße in Betracht.

Auch ist dabei zu beachten, dass diese Wirkungen sowohl sehr individuell als auch dosisabhängig sind. Auch können Zeitpunkt und Ort der Probenahme das Ergebnis erheblich beeinflussen (Gedek *et al.*, 1993).

### 2.4.1 Interaktionen mit anderen Mikroorganismen

Die bei den meisten Laktobazillus-Arten von mehreren Autoren festgestellte Fähigkeit zur Auto-Aggregation wird als Voraussetzung für die Anheftung an intestinale Epithelzellen angesehen (Ehrmann *et al.*, 2002; Kos *et al.*, 2003).

Die damit meist einhergehende erhöhte Rate an Ko-Aggregation mit enteropathogenen Bakterien hindert diese an einer Kolonisation des Darmes. Eine signifikante Abnahme der Zahl von enteropathogenen Bakterien in verschiedenen Darmabschnitten wird ebenfalls von verschiedenen Verfassern beschrieben (Jadamus *et al.*, 2002; Männer und Spieler, 1997).

Mack *et al.* beschreiben als Mechanismus zur Unterdrückung der Anheftung von *E. coli* eine erhöhte Genexpression für Muzinbildung durch zwei Laktobazillus-Arten.

Die damit vermehrte Muzinproduktion (Muzin ist ein Glykoprotein auf der Schleimhaut) verbessert den Schutz der Epithelzellen und vermindert die Anheftung von pathogenen Keimen (Mack *et al.*, 2003; Mack *et al.*, 1999).

Eine durch Probiotika induzierte vermehrte Muzinbildung könnte auch eine bakterielle Translokation verhindern. Unter normalen physiologischen Bedingungen absorbiert der Darm Nährstoffe, während die bakterielle Flora im Darmlumen verbleibt. Bei der bakteriellen Translokation kommt es zu einem Übergang von Bakterien aus dem Darm in regionale Lymphknoten, zum Teil verbreiten sie sich im ganzen Körper. Dies kann u.a. geschehen nach Darmverschlüssen, Schock oder Vergiftungen. Die Mechanismen liegen in einer erhöhten Darmpermeabilität und einem geschwächten Immunsystem des Wirtsorganismus. Dies ist auch häufig der Fall bei einer Zirrhose (Albillos und de la Hera, 2002).

Bei Chiva *et al.* wurde die bakterielle Translokation nach einer mit Tetrachlorkohlenstoff-induzierten Zirrhose mit Hilfe von Antioxidantien (Glutamat und Vitamin C) allein und zusammen mit *Lactobacillus johnsonii* signifikant reduziert. In welchem Maße die Milchsäurebakterien dafür verantwortlich sind, bedarf weiterer Klärung (Chiva *et al.*, 2002).

Auch nach einer operativen Entfernung von Darmabschnitten kommt es häufig zu vermehrtem Wachstum von Bakterien, mit der Folge einer bakteriellen Translokation. Garcia-Urkia *et al.* untersuchten die möglichen positiven Effekte von *Bifidobacterium lactis* bei Ratten, denen 80% des Darmes entfernt worden war. Ihre Ergebnisse zeigen, dass *Bifidobacterium lactis* das Vorkommen einer bakteriellen Translokation verringert (Garcia-Urkia *et al.*, 2002).

Bei einem *in vitro*-Versuch über die Wirkung von *Lactobacillus casei* an menschlichen Kolon-Karzinomzellen fanden Mattar *et al.* eine dosisabhängige, signifikante Verringerung der Translokation von *Escherichia coli*. Bei den Untersuchungen der möglichen Mechanismen dieser Hemmung stellten sie fest, dass *Lactobacillus casei* möglicherweise mit den Enterozyten selbst interagiert, um die bakterielle Translokation zu inhibieren (Mattar *et al.*, 2001).

In späteren Versuchen stellten Mattar *et al.* eine ebenfalls dosisabhängige, vermehrte Muzinproduktion bei karzinogenen, menschlichen Kolonzellen bei Zugabe von *Lactobacillus casei* dar. Bei diesen Studien wird deutlich, dass sich die Milchsäurebakterien möglicherweise an einen Zellrezeptor binden und dadurch eine gesteigerte Expression des Muzingens MUC-2 hervorrufen (Mattar *et al.*, 2002). Wie

oben bereits erwähnt, verringert eine vermehrte Muzinbildung eine bakterielle Translokation.

Die Anheftung von Probiotika an Rezeptoren der Darmwand (kompetitiv zu pathogenen Bakterien) und die Nährstoffkonkurrenz zwischen probiotischen und unerwünschten Keimen, sind ebenfalls Mechanismen zur Reduzierung der Kolonisation schädigender Keime (Simon und Breves, 2000).

#### **2.4.2 Veränderung des intestinalen Milieus**

Die Bildung inhibierender Stoffwechselprodukte wie  $H_2O_2$ , Milchsäure oder Essigsäure von verschiedenen Laktobazillus-Arten gilt schon lange als gesichert (Annuk *et al.*, 2003). Die damit einhergehende Senkung des pH-Wertes hemmt das Wachstum besonders von gramnegativen Bakterien.

Die Fähigkeit der antioxidativen Aktivität zum Schutz biologischer Membranen gegenüber Oxidation wird bei Laktobazillus acidophilus und Bifidobacterium longum beschrieben (Lin und Yen, 1999).

De Smet *et al.* fanden bei ihren Versuchen an Schweinen mit Lactobacillus reuteri signifikante erniedrigte LDL-Cholesterol-Werte im Plasma im Gegensatz zu den Kontrolltieren. Die Tiere wurden fett- und cholesterolreich gefüttert, um den Einfluss von Probiotika auf den Cholesterol-Wert zu prüfen. Sie nehmen an, dass eine bakterielle Hydrolase, welche Gallensalze abbaut, durch die Milchsäurebakterien in ihrer Aktivität gesteigert wird (De Smet *et al.*, 1998).

Bei Fukushima und Nakano wiesen die mit verschiedenen Probiotika-Bakterien behandelten Ratten verringerte Serum-Werte von sowohl LDL als auch VLDL und IDL-Cholesterol auf. Auch war die Konzentration von Cholesterol in der Leber erniedrigt.

Der Gehalt von Neutralfetten und Fettsäuren im Kot war bei den mit Probiotika behandelten Tieren höher als in der Kontrollgruppe, was auf einen verbesserten Fettstoffwechsel hinweist (Fukushima und Nakano, 1995).

### 2.4.3 Neutralisation von Toxinen

Bei Versuchen zur Neutralisation von Toxinen fand man sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei verschiedenen Milchsäurebakterien positive Ergebnisse.

Pierides et al. testeten die Fähigkeit von spezifischen Milchsäurebakterien, den Aflatoxin M1-Gehalt in Milch zu reduzieren. Das Mykotoxin Aflatoxin M1 ist in vielen Entwicklungsländern in der Milch enthalten und führt bei Kleinkindern zu lebensbedrohlichen Erkrankungen. Alle getesteten Milchsäurebakterien konnten sowohl lebend als auch hitzegetötet den Aflatoxin M1-Gehalt signifikant erniedrigen (Pierides et al., 2000).

Bei El-Nezami et al. führten Versuche am Hühner-Darm ebenfalls zu einer erniedrigten Konzentration an Aflatoxin B. Dabei waren die getesteten Laktobazillen effizienter als Propionibakterien (El-Nezami et al., 2000).

Bei Versuchen an Ratten stellten Castagliuolo et al. fest, dass eine Protease von *Saccharomyces boulardii* in der Lage ist, das Toxin A von *Clostridium difficile* sowohl proteolytisch zu zerstören als auch seine Bindung zum Membran-Rezeptor zu hemmen. Ebenso wurden andere schädigende Folgen durch *Clostridium difficile*, wie die vermehrte Sekretion (Flüssigkeitsverlust über den Darm, Diarrhøe), Erhöhung der Darmpermeabilität und histologische Läsionen durch die Hefe verringert (Castagliuolo et al., 1996).

Diese positiven Auswirkungen von *Saccharomyces boulardii* zum Schutz vor *Clostridium difficile* Toxin A wurden später auch beim Menschen nachgewiesen (Castagliuolo et al., 1999).

Dahan et al. wiesen bei Versuchen mit *Saccharomyces boulardii* an einer menschlichen T84-Colonzelllinie nach, dass durch die Hefe der Wirkmechanismus von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* (EHEC) unterbrochen wird. Enterohämorrhagische *Escherichia coli*-Infektionen führen u.a. zu einem Verlust der tight-junction-Strukturen und zu einer gesteigerten Produktion von Entzündungsmediatoren. *Saccharomyces boulardii* greift in die intrazellulären Signalwege ein und hemmt so die Bildung der EHEC-typischen Läsionen (Dahan et al., 2003).

Dies wurde ebenfalls in Bezug auf enteropathogene *Escherichia coli* (EPEC) – Infektionen bewiesen (Czerucka et al., 2000).

#### **2.4.4 Sekretion von antibiotisch wirksamen Substanzen**

Neben den oben beschriebenen inhibierenden Stoffwechselprodukten bilden Milchsäurebakterien auch antimikrobiell wirksame Substanzen, die Bakteriozine.

Diese werden unterteilt in die Lantibiotika (Klasse I) und die Nicht-Lantibiotika (Klasse II) (Eijsink *et al.*, 2002). Ihre Wirkungsweise basiert auf einer Interaktion mit der Bakterienmembran, in dessen Folge diese zerstört wird (Hechard und Sahl, 2002).

Der Begriff Lantibiotika stammt vom Ausdruck ‚Lanthionin-enthaltende Antibiotika‘ (Brotz und Sahl, 2000).

Die Bakteriozine der Klasse II wie Bulgaricin, Acidolin, Laktocidin oder Reuterin sind aktiv gegen ein breites Spektrum von grampositiven und gramnegativen Bakterien, Hefen und Pilze (Nemcova, 1997).

Ebenfalls wirksam gegen grampositive und gramnegative Bakterien wirken die von Milchsäurebakterien gebildeten Lantibiotika (Klasse I) wie z. B. Nisin oder Epidermin (Hoffmann *et al.*, 2002).

#### **2.4.5 Veränderung der Darmmorphologie**

Bezüglich der möglichen Veränderungen der Permeabilität des Darmes bei Versuchen mit Probiotika sind die Ergebnisse widersprüchlich. Castagliuolo *et al.* fanden nach einer Behandlung mit *Saccharomyces boulardii* an Ratten mit einer *Clostridium difficile*-Infektion eine erniedrigte Durchlässigkeit von Mannit (ein Marker für parazelluläre Permeabilität, siehe unten) (Castagliuolo *et al.*, 1996).

Bei Versuchen mit *Saccharomyces boulardii* und *Bacillus cereus* var. *toyoi* fanden Winckler *et al.* bei ihren Ussing-Kammer-Versuchen ebenfalls eine verringerte parazelluläre Permeabilität bezüglich Mannit bei behandelten Dünndärmen von Schweinen (Winckler *et al.*, 1998).

Bei Kennedy *et al.* ergaben Versuche mit *Lactobacillus plantarum* keinerlei Verbesserung der Permeabilität bei Ratten mit einer Säure-induzierten Kolitis (Kennedy *et al.*, 2000).

Lu und Walker berichten bei ihren Versuchen mit verschiedenen enteropathogenen Bakterien, dass Probiotika die tight junctions zwischen den Enterozyten stärken können (Lu und Walker, 2001).

Mangell et al. untersuchten die Fähigkeit zur Verringerung der Permeabilität von *Lactobacillus plantarum* an Ratten. Ihre Ergebnisse zeigen, dass *Lactobacillus plantarum* den Darm vor einer Steigerung der Permeabilität, hervorgerufen durch eine Infektion mit *Escherichia coli*, schützen kann. Jedoch war bei der Kontrollgruppe (ohne *E. coli*-Infektion) keinerlei Verbesserung der intestinalen Permeabilität durch *Lactobacillus plantarum* allein sichtbar (Mangell et al., 2002).

In verschiedenen Studien zeigte sich auch der positive Effekt von Probiotika auf die Schleimhautdifferenzierung.

So beschreibt Görke bei ihren mit *Bacillus cereus* var. *toyoi* behandelten Schweinen signifikante Abweichungen zu der Kontrollgruppe in Form von längeren Zotten im Jejunum. Dies hat eine größere resorbierende Schleimhautoberfläche zur Folge. Auch bei *Saccharomyces boulardii* zeigten sich diese Veränderungen tendenziell (Görke, 2000).

Auch in den Untersuchungen von Thelen zeigte sich bei Schweinen, denen *Bacillus cereus* var. *toyoi* verabreicht worden war, eine Verlängerung der Duodenumzotten bei histoplanimetrischer Messung. Bei diesen Versuchen ergab die Supplementierung mit *Bacillus cereus* var. *caron* keinerlei Veränderung der Darmmorphologie (Thelen, 1997).

Auch sind Einflüsse auf Enzymaktivitäten nach Behandlung mit Probiotika sichtbar.

Die Aktivität der Bürstensaumenzyme Laktase,  $\alpha$ -Glukosidase und alkalischer Phosphatase im Duodenum vom Menschen waren bei Jahn et al. nach Behandlung mit *Saccharomyces boulardii* erhöht (Jahn et al., 1996).

Bei Buts et al. konnte nach Gabe derselben Hefe im Jejunum von Menschen und Ratten ebenfalls eine gesteigerte Aktivität von Saccharase, Laktase und Maltase festgestellt werden (Buts et al., 1986).

Bei den Versuchen von Thoreux et al. an Mäusen mit Joghurt (fermentiert mit *Streptococcus thermophilus* und *Lactobacillus bulgaricus*) und Milch (fermentiert mit *Lactobacillus casei*) ergaben sich signifikante Vergrößerungen der Zotten im Jejunum und Duodenum bei Zufütterung mit *Lactobacillus casei*. Die Supplementierung mit Joghurt ergab eine Zunahme der Zottenanzahl im Duodenum.

Die histologischen Untersuchungen ergaben weiterhin eine Hypertrophie der Panethschen Zellen in den Darmkrypten des Dünndarms, mit Zunahme ihrer sekretorischen Granula bei Fütterung von *Lactobacillus casei* und Joghurt. Eine Zunahme und Vergrößerung der Becherzellen im Jejunum sowie eine Zunahme der mitotischen Aktivitäten wurde ebenfalls bei diesen beiden Fütterungsvarianten festgestellt (Thoreux *et al.*, 1998).

Thoreux *et al.* berichten auch von signifikant verstärkter Aktivität der Bürstensaumenzyme Laktase, Aminopeptidase und alkalischer Phosphatase im Dünndarm bei der Behandlung mit *Lactobacillus casei*.

Wie Yan und Polk (Yan und Polk, 2002) berichten, wird durch Probiotika auch die Apoptose, also der Zelltod, durch Zytokine, welche zum Beispiel durch viele enteropathogene Bakterien freigesetzt werden, verringert. *Lactobacillus rhamnosus* wirkt sowohl an Zelllinien des Kolons von Mäusen als auch vom Menschen den intrazellulären pro-apoptotischen Mechanismen (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) entgegen und aktiviert die zelleigenen anti-apoptotischen Enzyme (Proteinkinase B). Dadurch verhindert *Lactobacillus rhamnosus* den Tod von intestinalen Epithelzellen durch eine Regulation dieser beiden Signalwege.

#### **2.4.6 Veränderung der Transportphysiologie**

Die Transportraten verschiedener Stoffe werden durch eine Probiotikabehandlung ebenfalls beeinflusst.

So ist die Na<sup>+</sup>-gekoppelte Resorption von Glucose im Dünndarm bei Probiotikagabe (*Saccharomyces boulardii* und *Bazillus cereus*) erhöht. Dies bewiesen Breves *et al.* bei ihren Untersuchungen am Jejunum von Schweinen mit Hilfe der Ussing-Kammer-Technik (Breves *et al.*, 2000).

Die Frage, ob diese Erhöhung aufgrund einer vermehrten Dichte von Transportern durch eine Vergrößerung der Oberfläche oder eines erhöhten Umsatzes der einzelnen Transporter zustande kommt, bedarf weiterer Klärung.

In der selben Studie ist die Stromzunahme in den Ussing-Kammern bei Zugabe von Glycyl-L-Glutamin und Glycyl-L-Sarcosin ebenfalls erhöht, was darauf schließen

lässt, dass auch hier eine erhöhte Resorption (in Form eines H<sup>+</sup>-Kotransportes) vorliegt (Breves *et al.*, 2000).

Auf die Transportmechanismen der in unseren Versuchen eingesetzten Stoffe wird im Kapitel „Transportphysiologie“ näher eingegangen.

Der Mechanismus der sekretorischen Diarrhöe liegt in einer vermehrten Sekretion von Chlorid in das Darmlumen, wodurch Wasser osmotisch getrieben folgt. Als eine Ursache kann zum Beispiel die Wirkung von Bakterientoxinen (*E. coli*) angesehen werden.

Krammer und Karbach wiesen bei ihren Ussing-Kammer-Versuchen mit *Saccharomyces boulardii* im Dünndarm und Dickdarm von Ratten eine antisekretorische Wirkung in Bezug auf Chlorid nach. Die sekretionsstimulierende Wirkung von PGE<sub>2</sub> auf Chlorid im Jejunum wird bei Zugabe von *Saccharomyces boulardii* aufgehoben (Krammer und Karbach, 1993).

Da Prostaglandin die Chlorid-Sekretion über eine Erhöhung von intrazellulären Botenstoffen (cAMP und Ca<sup>2+</sup>) steigert, könnte die antisekretorische Wirkung von *Saccharomyces boulardii* in einer Hemmung von cAMP und/oder Ca<sup>2+</sup> liegen (Czerucka und Rampal, 1999).

Auch hier bedarf der genauere Mechanismus noch weiterer Aufklärung.

#### **2.4.7 Immunologische und antikanzerogene Wirkungen**

Die positiven Auswirkungen der Gabe von Milchsäurebakterien auf das Immunsystem sind seit längerem bekannt, wobei sich diese sowohl lokal auf den Darm als auch systemisch auf das gesamte Immunsystem erstrecken können. Auch hier scheint eine individuelle, spezifische Wirkungsweise der verschiedenen als Probiotika angewendeten Bakterien vorzuliegen (Vitini *et al.*, 2000).

In Bezug auf das unspezifische Immunsystem zeigte sich bei Mäusen, welche acht Tage lang oral mit *Lactobacillus casei* behandelt wurden, gegenüber der Kontrollgruppe eine erhöhte Phagozyten- und Makrophagenaktivität im retikuloendothelialen System (Perdigon *et al.*, 1986).

Verschiedene als Probiotika eingesetzte Milchsäurebakterien zeigten *in vitro* die Fähigkeit zur Freisetzung von Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und Interleukin 6, welche stimulierend auf die unspezifische Abwehr wirken (Miettinen *et al.*, 1996).

Positiv wirkten sich auf das spezifische Immunsystem bei Perdigon *et al.* die Milchsäurebakterien *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* und *Lactobacillus plantarum* aus. Sie bewirkten einen Anstieg der IgM-produzierenden Zellen im Darmepithel. Perdigon *et al.* stellten ebenfalls einen Anstieg von IgA-produzierenden Zellen in den lymphatischen Zellen des Darmes nach Behandlung mit *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus salivarius ssp. bulgaricus* und *Lactobacillus lactis* fest, welcher dosisabhängig zu sein scheint (Perdigon *et al.*, 1999).

Ebenfalls dosisabhängig ist der Effekt von Milchsäurebakterien auf die Hemmung der Sekretion von Typ 2-Zytokinen. Diese sind mitverantwortlich für das Entstehen von allergischen Reaktionen. Pochard *et al.* testeten dies an Monozyten von Blutproben von Menschen mit einer Hausstaubmilben-Allergie (Pochard *et al.*, 2002).

Bei Studien über die antikanzerogene Wirkung von Probiotika erkannte man ebenfalls einen protektiven Mechanismus. Verschiedene darmansässige Bakterien produzieren Enzyme, welche prekarzinogene Substanzen in Karzinogene umwandeln (Goldin, 1990).

Probiotika schützen den Wirt, indem sie 1. diese enzymproduzierenden Bakterien hemmen, 2. Tumorzellaktivität direkt unterdrücken und 3. sich an Karzinogene binden und/oder diese inaktivieren (Lidbeck *et al.*, 1992; Orrhage *et al.*, 1994; Rolfe, 2000).

Bei ihren Versuchen an Mäusen mit implantierten Blasen-Zell-Tumoren stellten Lim *et al.* einen antikanzerogenen Effekt fest, welcher über das Immunsystem moduliert wird. Die von ihnen mit *Lactobacillus rhamnosus* behandelten Mäuse entwickelten kleinere, einige sogar gar keine Tumore. Die Zahl der Lymphozyten und Granulozyten war in dieser Gruppe ebenfalls höher als in der Kontrollgruppe (Lim *et al.*, 2002).

### 2.4.8 Modellstudien

In verschiedenen Modellstudien wird der prinzipiell protektive Mechanismus auf den Gastrointestinaltrakt durch Probiotika dargelegt.

Interleukin-10 Gen-defiziente Mäuse entwickeln bei normaler Haltung eine unregelmäßige, chronische Colitis, welche als Modell vergleichbar ist zum menschlichen Morbus Crohn (Madsen *et al.*, 1999).

Wenn diese Mäuse unter sterilen Bedingungen gehalten werden, entwickelt sich keine Colitis. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die bakterielle Besiedlung eine Bedeutung beim Ausbruch dieser Darmentzündung spielt.

Bei ihren Versuchen fanden Madsen *et al.* heraus, dass eine Behandlung (oral oder rektal) mit *Laktobazillus reuteri* die Ausbildung der Colitis verhindert. Sie nehmen an, dass eine erhöhte Zahl von aeroben und eine verminderte Zahl von „schützenden“ Bakterien (z. B. *Bifidobakterium* und *Laktobazillus*) den Ausbruch der Krankheit bedingt. Durch Gabe von *Laktobazillus* wird diese verschobene Bakterienpopulation wieder normalisiert (Madsen *et al.*, 1999).

Eine Verschiebung der Bakterienpopulation wird ebenfalls als Auslöser für weitere entzündliche Darmerkrankungen (IBD) angesehen (Gionchetti *et al.*, 2000).

Die genauere Wirkungsweise von Probiotika bei Behandlungen von Darmerkrankungen, speziell der Mechanismus der Verhinderung von Entzündungen, ist nach wie vor unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Auch bei Fabia *et al.* verhinderte die Gabe von *Laktobazillus reuteri* die Entwicklung einer durch Essigsäure experimentell verursachten Colitis. Die Permeabilität des Darmes war ebenfalls signifikant erniedrigt (Fabia *et al.*, 1993).

Bei einer Studie mit Probiotika (*Streptococcus thermophilus* und *Laktobazillus acidophilus*) an menschlichen Darmzelllinien, welche mit enteroinvasiven *Escherichia coli* (EIEC) infiziert wurden, bewiesen Resta-Lenert und Barrett eine signifikant erniedrigte Adhäsion, Invasion und Dysfunktion des infizierten Darmes durch EIEC. Hier wurde zwar keine direkte Verringerung der Chlorid-Sekretion zur Verminderung einer sekretorischen Diarrhöe nachgewiesen, jedoch wird auch hier der generelle protektive Mechanismus von Probiotika auf die Darmschleimhaut diskutiert (Resta-Lenert und Barrett, 2003).

Gionchetti et al. beschrieben bei Patienten nach einer Proktokolektomie zur Prophylaxe einer Proktitis den Einsatz von Probiotika. Bei ihrer Placebo-kontrollierten Studie stellten sie fest, dass sowohl der Grad der Entzündung als auch die Lebensqualität bei den mit vier verschiedenen Laktobazillus-Arten, drei verschiedenen Bifidobakterium-Arten und einer Streptococcus-Art behandelten Patienten signifikant verbessert war (Gionchetti *et al.*, 2003).

Auch Katz empfiehlt zur längerandauernden, prophylaktischen Behandlung nach einer Proktokolektomie den Einsatz von Probiotika (Katz, 2003).

Bei Nagaoka et al. wird die Heilung eines Säure-induzierten Magengeschwürs durch die Behandlung mit verschiedenen Bifidobakterium-Arten stark beschleunigt. In diesen Versuchen wird deutlich, dass diese positive Wirkung auf den Wirt durch den Polysaccharid-Anteil (speziell Rhamnose) in der Zellwand dieser Milchsäurebakterien hervorgerufen wird (Nagaoka *et al.*, 1994).

## 2.5 Transportphysiologie

Zur Untersuchung der absorptiven Eigenschaften des Jejunumepithels wurden Glucose (ein Kohlenhydrat) und L-Glutamin (eine Aminosäure) eingesetzt.

Als Endprodukt der chemischen Verdauung von Kohlenhydraten fällt unter anderem Glucose an. Zur Absorption können auch andere Monosaccharide anfallen, wenn sie in freier, ungebundener Form mit dem Futter aufgenommen und nicht vorher mikrobiell abgebaut worden sind.

Die Absorption von Glucose erfolgt über einen luminalen Carrier, der den passiven  $\text{Na}^+$ -Einstrom an die Monosaccharid-Aufnahme koppelt: SGLT1 (sodium dependent glucose transporter 1). Dabei handelt es sich um einen Kotransport (sekundär aktiver Transport) (Wood und Trayhurn, 2003).

Die Energie des elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten wird dazu benutzt, die Monosaccharide aktiv, entgegen ihrem Gradienten, ins Zellinnere zu transportieren. Der elektrochemische  $\text{Na}^+$ -Gradient wird durch die basolaterale  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase aufrechterhalten.

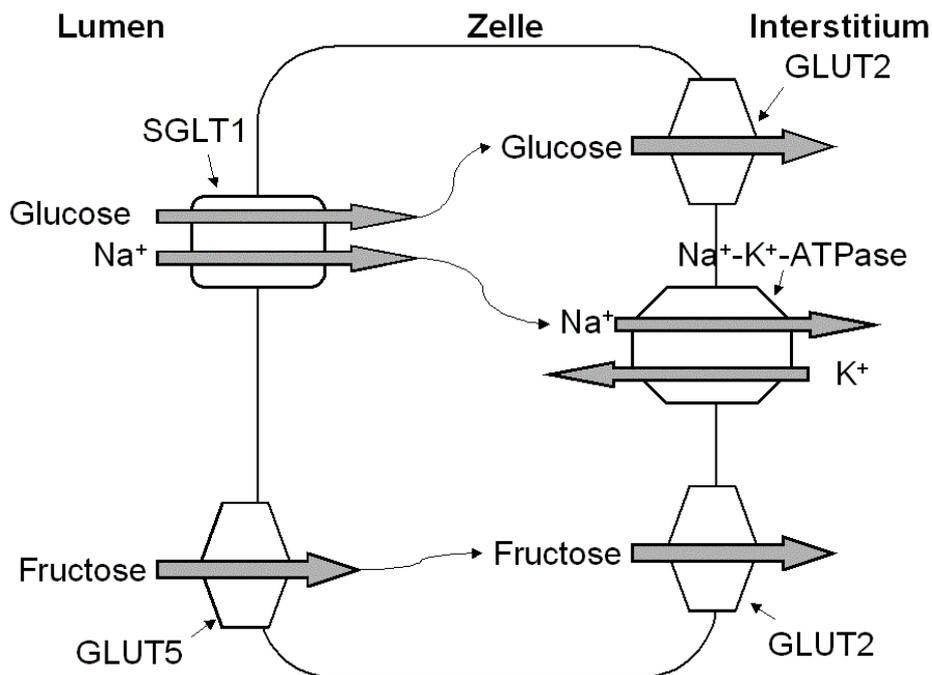
Da  $\text{Na}^+$  geladen, Glucose aber ungeladen ist, wird die luminal Membran depolarisiert (elektrogener Transport). Die Folge ist ein lumen negatives transepitheliales Potential, welches die parazelluläre Absorption von  $\text{Cl}^-$  ermöglicht.

Glucose verlässt die Zelle basolateral über einen passiven Carrier (GLUT2, glucose transporter 2) (Wood und Trayhurn, 2003; Wright, 1993).

Der zweite Bürstensaumcarrier ist  $\text{Na}^+$ -unabhängig und wird vor allem für Fructose genutzt (GLUT5) (Deetjen und Speckmann, 1994; Klinke und Silbernagel, 2001; Scheunert und Trautmann, 1987; Wright, 1993).

Bei vorherigen Untersuchungen von isoliertem Schweinedarm in Ussing-Kammern stellte sich heraus, dass der Glucose-Einstrom konzentrationsabhängig ist und der Michaelis-Menten-Kinetik folgt (Holtug und Skadhauge, 1991). Dies wurde in unserem Versuchsaufbau berücksichtigt.

**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Glucose-Absorption im Dünndarm



Auch die Absorption von Aminosäuren erfolgt (zumindest teilweise) über das bereits erwähnte sekundär aktive Transportschema. Die Aminosäuren werden durch spezifische Carrierproteine in der Bürstensaummembran mittels  $\text{Na}^+$ -Kotransport in der Zelle sekundär aktiv akkumuliert und verlassen diese an der basolateralen Membran durch passiven Ausstrom über einen  $\text{Na}$ -unabhängigen Carrier.

Es existieren mindestens fünf verschiedene natriumabhängige Transportsysteme für verschiedene Gruppen von Aminosäuren.

Eine Gemeinsamkeit all dieser Aminosäuretransportsysteme ist, dass sie die L-Formen als Transportsubstrate bevorzugen (Deetjen und Speckmann, 1994; Klinke und Silbernagel, 2001; Scheunert und Trautmann, 1987).

Um die sekretorischen Veränderungen bei der Behandlung mit Probiotika untersuchen zu können, nutzten wir die Chlorid-sekretionsstimulierenden Eigenschaften von PGE<sub>2</sub>.

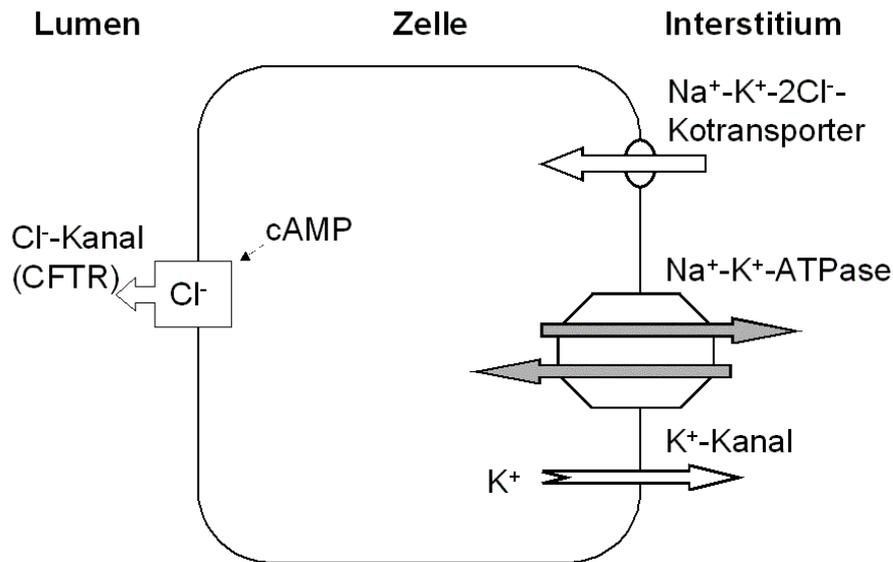
Chlorid wird durch einen Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>-Kotransporter an der basolateralen Zellseite aus dem Gewebe entgegen seines elektrochemischen Gradienten aufgenommen. Dieser wird angetrieben durch den chemischen Na<sup>+</sup>-Gradienten, welchen wiederum die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase aufrechterhält. Während die K<sup>+</sup>-Ionen, die sowohl mit dem Kotransporter als auch mit der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in die Zelle gelangen, über ebenfalls basolateral gelegene K<sup>+</sup>-Kanäle rezirkulieren, verlässt Cl<sup>-</sup> die Zelle über luminale Cl<sup>-</sup> Kanäle (CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), wobei cAMP der intrazelluläre Botenstoff ist (Currid *et al.*, 2003). Na<sup>+</sup> folgt auf parazellulärem Weg. Die erhöhte luminale NaCl-Konzentration zieht schließlich wieder Wasser hinterher (Klinke und Silbernagel, 2001).

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), ein Abkömmling der Arachidonsäure, gehört zur Gruppe der Eicosanoide. Dies sind Mediatoren, welche z.B. beim Entstehen von Entzündungen und Allergien beteiligt sind. Bei Darmerkrankungen, wie z.B. der ulzerativen Colitis, sind die Konzentrationen von PGE<sub>2</sub> im Dün- und Dickdarm erhöht (Ahrenstedt *et al.*, 1994; Lauritsen *et al.*, 1988).

Dort wirkt PGE<sub>2</sub> sekretionsstimulierend auf Chlorid bei Versuchen am Dün- und Dickdarm von Ratten, Schweinen und Menschen (Krammer und Karbach, 1993; Larsen *et al.*, 2001; Traynor *et al.*, 1993; Unmack *et al.*, 2001).

Auf diesem Mechanismus, der vermehrten Sekretion von Chlorid ins Darmlumen, basiert die sekretorische Diarrhöe. Es soll also untersucht werden, ob das Probiotikum einer solchen Diarrhöe entgegenwirken könnte.

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Sekretion von Chloridionen in Krypten des Darmepithels



Mannit, ein chemisch inertes, nicht resorbierbarer Zucker, wird ausschließlich parazellulär transportiert und gilt daher als Marker für die parazelluläre Durchlässigkeit.

Die parazelluläre Durchlässigkeit wird hauptsächlich durch die tight junctions zwischen den Enterozyten definiert. Bei vielen enteralen Erkrankungen, wie z.B. der ulzerativen Colitis, Virusinfektionen und Durchfallerkrankungen verschiedener Genese, werden diese tight junctions gelockert und es kommt zur einer erhöhten parazellulären Durchlässigkeit des Darmepithels z.B. auch für Giftstoffe.

In Versuchen mit *Saccharomyces boulardii* waren die unidirektionalen Fluxraten von Mannit signifikant niedriger als bei Schweinen ohne vorherige Behandlung mit diesem Probiotikum (Winckler *et al.*, 1998).

Dies deutet darauf hin, dass Probiotika auch auf diesem Wege einer Diarrhöe entgegenwirken könnten.

Auch bei Versuchen an Ratten, welche mit *Saccharomyces boulardii* vorbehandelt wurden, konnten die Effekte des Toxins A von *Clostridium difficile* in Bezug auf die parazelluläre Permeabilität deutlich verringert werden (Castagliuolo *et al.*, 1996).

Theophyllin, ein Purinderivat, kommt in geringen Mengen im Tee vor.

Am Darm bewirkt Theophyllin eine Steigerung der NaCl-Sekretion ins Lumen, diese scheint insbesondere beim Schwein altersabhängig zu sein (Erlwanger *et al.*, 1999).

Diese Tatsache kann als sogenannter „viability test“ genutzt werden, da diese Sekretion natürlich nur am noch lebenden Gewebe hervorgerufen wird (Winckler *et al.*, 1998).

Auch soll durch Theophyllin eine Erhöhung der parazellulären Permeabilität hervorgerufen werden (Perez *et al.*, 1997).